

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21792018

研究課題名 (和文) 腺様嚢胞癌における ADAM17 を介した転移機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the mechanism of metastasis mediated ADAM-17 in adenoid cystic carcinoma.

## 研究代表者

高宗 康隆 (TAKAMUNE YASUO)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50467982

## 研究成果の概要 (和文)：

口腔癌のなかでも間葉組織の細胞外基質を強く分解しながら、著明な浸潤増殖をしていく腺様嚢胞癌に着目し、当研究室内で培養したいくつかの腺様嚢胞癌細胞株を樹立し、この細胞株にTNF $\alpha$ で処理し、細胞の状態を検索した。特に接着分子CD44を特異的に切断するプロテアーゼADAM-17の発現とその活性をWestern Blotting法を用いて調べた。結果、ADAM-17の活性は認められなかった。同時にCD44の切断も確認することができなかった。これはわずかな種類の腺様嚢胞癌細胞株でしか実験しておらず、今後まったく別のタイプの腺様嚢胞癌細胞株を培養し、繰り返し本研究を継続していく必要がある。ADAM-17のDNA抽出およびRNAに関する実験を予定している。さらに様々な口腔癌細胞の浸潤能を検索するべく、インベージョンアッセイの実験も付加していくことを検討中である。また、口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、TNF $\alpha$ 刺激後のCD44の細胞内での局在を明らかにし、更なる解析を要すると考えている。

## 研究成果の概要 (英文)：

We were cultured in Adenoid cystic carcinoma cells. In this study, After the effects of TNF $\alpha$  cytokines on CD44 cleavage were examined in several Adenoid cystic carcinoma cell lines using Western blotting. And we examined relationship between expression of ADAM17 and CD44 cleavage in mechanism for the tumor progression of ACC cell.

The treatment of ACC cells with TNF $\alpha$  did not induce the generation of CD44 cleaved.

We have to consider that cell lines after stimulation with TNF $\alpha$ , we are looking for localization of CD44 intracellular domain location details.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：歯科口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：腺様嚢胞癌、細胞接着、プロテアーゼ、癌の浸潤・転移

### 1. 研究開始当初の背景

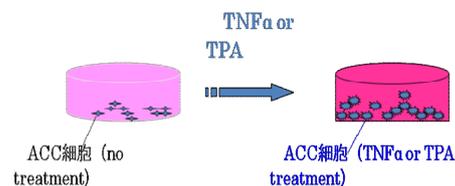
口腔内における主要な悪性腫瘍は全癌に対する1~3%程度で、頭頸部領域の悪性腫瘍のうちでは35%以上を占める。口腔癌に罹患すると食事や嚥下、会話などが困難となり、患者の生活の質(Q.O.L)は著しく低下する。また、口腔癌患者の予後は癌の進展度、すなわち癌転移に左右され、時として不幸な転帰を迎えることも少なくない。一般に口腔癌患者の5年累積生存率はstage I,II 80%以上であるが、stage III,IV になると60%以下となる。日本の口腔・咽頭癌による死亡者数は1985年では2000人であったが、2007年には6400人に増加し、比較的良好に知られている癌の子宮癌や膀胱癌の死亡者数より多い。その口腔癌の治療として、外科療法、放射線治療、化学療法などがあり、主にこれらの治療法を組み合わせた集学的治療が行われているが、これらの治療法の進歩にも関わらず近年の口腔癌の治療成績はほとんど向上していない。その原因は癌転移の制御の失敗にあり、特に転移巣には放射線も抗癌剤も効果が乏しい。したがって口腔癌の浸潤・転移に関連する分子を明らかにし、口腔癌の分子標的療法を確立すれば、今後の治療成績を向上させる上でも極めて重要であると考えられる。

これまでの研究で、培養したヒト口腔扁平上皮癌細胞をTNF $\alpha$ で処理した結果、接着分子CD44は小さな断片へと切断され、またTNF $\alpha$ はADAM-17のproformをmature formに変換することでCD44を切断し、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移を促進することを解明してきた。

### 2. 研究の目的

口腔癌の中でも進行性の高い腺様嚢胞癌は、神経周囲浸潤と再発率が比較的高く、予後不良である。その腺様嚢胞癌が浸潤・転移するためには細胞間、細胞-細胞外基質の接着から切り離される必要がある。これまでの研究で接着分子CD44や切断酵素ADAM17が浸潤転移に重要な働きをしていることが解明されてきている。そこで腺様嚢胞癌の浸潤・転移に対するCD44及びADAM-17の関与を検討し、メカニズムを解明することで、将来的に癌の浸潤・転移を臨床的に制御することを

ヒト腺様嚢胞癌細胞株 (ACC cell line)



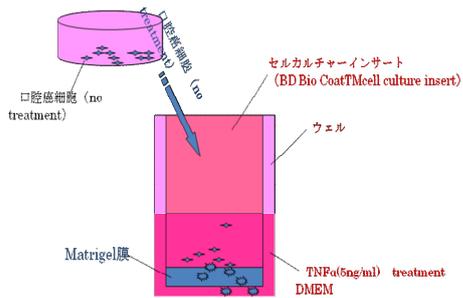
目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) いくつかの種類のアダマシヨウ癌細胞株を培養し、これらの細胞株に様々なサイトカインで処理し、接着分子CD44の状態の変化を観察するためCD44の細胞質内ドメインに対する抗体を使ったWestern Blotting法や蛍光染色を行う。サイトカイン刺激を介したCD44の状態変化、つまり切断が明らかになれば、そのプロテアーゼを同定するためサイトカイン刺激効果によるADAM-17の発現と

活性を Western Blotting 法で調べる。

(2) 次に腺様嚢胞癌細胞の浸潤能に及ぼす影響について検討する。これまでの報告で、CD44 切断は細胞の運動能および癌細胞の浸潤能と関連があることが報告されている。そこで腺様嚢胞癌細胞の浸潤能をインベージョンアッセイで確認する。すなわちタイプIVコラーゲンなど基底膜構成タンパクよりなる Matrigel™ をコートした膜上に腺様嚢胞癌細胞を播種し、膜の下室に TNF $\alpha$  などのサイトカインを添加するボイデンチャンバ変法にて測定し、腺様嚢胞癌細胞が Matrigel™ 内に浸潤し、Matrigel™ 膜の下面に移動していく様子を観察する。



(3) もし可能であれば、さらなる検索として、腺様嚢胞癌切除組織を用いてこれを2つに分け、①免疫組織化学的染色を行い、CD44の切断状態及び ADAM-17 の発現を検索。② Western Blotting 法によって CD44 タンパク切断の有無及び活性化 ADAM-17 タンパクを検出(扁平上皮癌での実験は既に済み)を行う。以上の①②の結果を臨床的予後因子、特に転移と比較検討する。

以上 (1) ~ (2) の実験を行い、予想された結果が得られた場合は、引き続き (3) を行い、臨床へとフィードバックしていく。

#### 4. 研究成果

当研究室内で培養したいくつかの腺様嚢胞癌細胞株を樹立し、この細胞株に TNF $\alpha$  および TPA で処理し、細胞の状態を検索した。特に接着分子 CD44 を特異的に切断するプロテアーゼ ADAM-17 の発現とその活性を Western Blotting 法を用いて調べた。結果、TNF $\alpha$  刺激群、TPA 刺激群、共に ADAM-17 の活性は認められなかった (proform のみのバンドしか検出されず、matureform のバンドは検出されなかった)。また CD44 の切断も確認することができなかった。CD44 は 98kDa の Full length Band のみ確認できて、切断後の cleavage band は認められなかった。刺激したサイトカインの濃度および刺激時間などあらゆる条件下で実験を繰り返したが、ADAM-17、CD44 ともに少なくとも、タンパクレベルでは変化は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Yoshitake, Y., Nakayama, H.,  
Takamune, Y., Yasunaga, M., Hiraki, A.,  
Shinohara, M.

Haemophilic pseudotumour of the  
mandible in a 5-year-old patient.  
Int J Oral Maxillofac Surg. 査読有り  
vol40 No.1 P120-123 2010 Aug 13.

[学会発表] (計2件)

① 永田将士、中山秀樹、吉武義泰、田中拓也、  
吉田遼司、福間大喜、高宗康隆、尾木秀直、  
太田和俊、平木昭光、大林武久、篠原正徳  
5-フルオロウラシル耐性口腔扁平上皮癌細胞  
の樹立とその細胞特性.

第 68 回日本癌学会 2009 年 10 月 1~3 日  
パシフィコ横浜.

② 永田将士、中山秀樹、田中拓也、吉武義泰、  
高宗康隆、福間大喜、吉田遼司、尾木秀直、  
篠原正徳

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いた 5-FU 耐  
性株の樹立と機能解析.

第 33 回日本頭頸部癌学会 2009 年 6 月 10  
~12 日 ロイトン札幌.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高宗 康隆 (TAKAMUNE YASUO)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50467982