

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791810

研究課題名（和文） 唾液腺多形性腺腫における低酸素応答性増殖機構：SM-AP 細胞系による解析

研究課題名（英文） Survival of salivary pleomorphic adenoma cells in hypoxic condition

研究代表者

丸山 智 (SATOSHI MARUYAMA)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30397161

研究成果の概要（和文）：唾液腺多形性腺腫の間質表現は多彩であるが、乏血管性であることも特徴である。したがって間質をふくめて多形性腺腫組織は低酸素状態であるという仮説をたて、これを証明するために多形性腺腫由来細胞の増殖における低酸素依存性を試験管内で検討した。その結果、多形性腺腫由来細胞では、低酸素下での HIF-1 α 蛋白質の高発現および VHL 遺伝子・蛋白質の低発現により HIF-1 α の分解抑制機構がはたらいっており、低酸素状態で核移行した HIF-1 α により VEGF の高発現レベルを維持されることが示された。試験管内でえられた以上の結果は、ヌードマウス移植腫瘍組織・ヒト多形性腺腫組織手術材料の生体組織でも追認され、ヌードマウス背部皮下移植腫瘍内酸素分圧は周囲皮下組織に比して有意に低いことも確認された。以上の機序によって、低酸素環境で増殖さらには転移形質が誘導されている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：研究成果の概要（英文）：Salivary pleomorphic adenoma (PA) is histopathologically characterized by its colorful stroma with myxoid appearances, which are poorly vascularized, and PA cells are supposed to be able to survive in hypoxic conditions. To understand the hypoxia-dependent manner of cellular proliferation, we determined both protein and gene expression levels of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF), and von Hippel-Lindau (vHL), which degrades HIF-1 α . SM-AP cells, which I established from a human parotid pleomorphic adenoma, showed more enhanced levels of HIF-1 α , and their VEGF protein levels were kept higher in hypoxic conditions than in aerobic ones. SM-AP cells showed lower expression levels for the vHL gene. Likewise, tumor tissue masses of transplanted SM-AP cells were lower in O₂ concentration than normal subcutaneous tissue. The results indicate that pleomorphic adenoma cells can proliferate in the hypoxic condition in which HIF-1 α protein levels were maintained in higher levels because the degradation of HIF-1 α was inhibited due to the lower vHL protein levels. It is thus concluded that hypoxia is more beneficial for PA cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の生存・増殖・転移の分子機構の解明には、試験管内で個々の分子の相互作用機序を解明していくミクロの作業と同時に、生体内における癌の微小環境を理解する総合的な視点も必要である。すなわち、発癌初期であれば基底膜で境界された血管の侵入し得ない環境、浸潤癌では無秩序で脆弱な血管網にともなう酸素の拡散限界、いずれの場合も低酸素環境が想定される。腫瘍組織の低酸素環境を背景とした細胞活動の特異性という観点から、これまで研究をおこなってきた。低酸素関連遺伝子としては、これまでに Semenza により低酸素応答性の転写因子である hypoxia-inducible factor(HIF)が発見され、そのサブタイプ HIF-1 α の標的遺伝子としての vascular endothelial growth factor (VEGF)や HIF-1 α の分解を制御する von Hippel-Lindau 蛋白質(pVHL)の機能が判明してきた。とくに pVHL の機能は、がん抑制遺伝子 p53 の調節や細胞外基質(ECM)構築の促進、微小管調節と多岐にわたり、VHL 遺伝子はがん原遺伝子としても注目されるようになった。このように、低酸素関連分子の機能には腫瘍細胞形質発現にきわめて本質的な役割を果たしていることが推測されるものの、依然として不明な点が多い。また実験レベルにおいても、低酸素環境適応性をしめす癌細胞系が樹立されておらず、試験管内で癌の内部環境を再現することも技術的に困難であるために癌の低酸素研究の障壁となっていた。

これまで唾液腺でもっとも高頻度に発生する良性腫瘍である多形性腺腫について多面的に解析を重ねてきた。その経緯で、多形性腺腫には病理組織学的に乏血管性という特徴があり、低酸素状態におかれた腫瘍組織の解析には最適な実験材料であるということが判明した。しかし、多形性腺腫の乏血管性すなわち低酸素環境に注目した研究は国の内外に存在しなかった。それは、多形性腺腫から細胞株の樹立は困難で機能的実験は不可能だったからでもある。しかし近年、申請者は多形性腺腫由来細胞系 SM-AP1～SM-AP5 の樹立に成功し、腺腫から癌腫へと発がん経路が存在し、その癌化には p53 の変異、遺伝子欠質や新生キメラ遺伝子が関与することを明らかにするとともに、ヌードマウス移植腫瘍組織で、乏血管性間質と導管様構造の誘導が特徴的な多形性腺腫・多形性腺腫内癌腫類似の腫瘍構築を再現しえた。

そこで、「乏血管性の間質を特徴とする唾液腺多形性腺腫には低酸素状態があり、その中で腫瘍細胞増殖が維持されている」という仮説をたてた。これを実証すべく、まず SM-AP 細胞系を通常の培養条件下で検討したところ、HIF-1 α 遺伝子発現が確認された。ついで、顕微鏡用培養装置を用いた低酸素培養条件下 (5% CO₂/1% O₂/94% N₂) では、HIF-1 α 遺伝子は同様の発現レベルながら、蛋白質レベルが有意に高いことが確認された。このことから、多形性腺腫由来細胞は定常的に低酸素応答スイッチが入っているだけでなく、低酸素環境において HIF-1 α 分解を抑制する機構が備わっているとみなすことができた。さらに HIF-1 α により誘導される関連遺伝子の一つである VEGF の遺伝子発現を定量的 PCR で比較したところ低酸素培養条件下で 4～5 倍の発現をしめすとともに蛋白質発現レベルも高いことも確認できたので、HIF-1 α が転写因子として機能しうることも予測しえた。さらに HIF-1 α の分解を制御する VHL 蛋白質発現を比較検討したところ、SM-AP 細胞系のなかに低酸素環境で発現低下をしめす傾向の細胞系を選択することができた。そこで申請者は、低酸素応答機構が備わっている SM-AP 細胞系を用いれば、VHL の機能解析を中心に低酸素環境で癌細胞の生存・増殖を促進している分子機構を明らかにできるのではないかと思考し、本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

本研究課題では、低酸素培養条件下で有意に高い発現が確認しえた HIF-1 α 蛋白質の分解抑制機構の解明を第一にあげ、HIF-1 α の分解を制御する VHL 遺伝子発現および遺伝子異常さらには蛋白質発現レベルを培養条件下と低酸素培養条件下で比較して解析することで、低酸素下で高い HIF-1 α 蛋白質レベルを維持している機構を多角的に解明する。第二に、上記分子機構が生体内においても機能しているのかを検証するため、ヌードマウス移植腫瘍組織およびヒト多形性腺腫組織手術材料を含むヒト癌組織材料を用いて、移植腫瘍組織内の酸素分圧を測定することで低酸素環境が維持されているかを確認するとともに、各分子機構に関連する分子を免疫組織化学的に解析したい。これにより多形性腺腫の低酸素環境で細胞生存・増殖が維持増進されている分子機構を実証したい。

3. 研究の方法

(1)細胞培養: ヒト唾液腺多形性腺腫より樹立した SM-AP1 から SM-AP5 細胞および転移能の異なるヒト腺様嚢胞癌由来細胞 ACC2/M の各細胞系について、通常の培養条件 (5% CO₂ 20% O₂) でこれまで確立した方法で培養維持した。さらに培養 5 日目の細胞に対し、通常の培養条件と低酸素 (5% CO₂ 1% O₂ 94% N₂) の条件下で、5 時間培養した後、各種遺伝子発現および免疫細胞化学および蛍光抗体法、免疫沈降法による各種蛋白質発現の検索をおこなった。通常培養には、所属研究室現有のマルチガスインキュベータを用いるが、低酸素培養実験には、高速で低酸素状態を可能とする小型顕微鏡用培養装置を用いた。

(2)HIF-1 α 分解関連分子 VHL 遺伝子解析: SM-AP 細胞を上記 1)項により培養し、通常の培養条件と低酸素条件下で、通法にて RNA を抽出し、フェノール・クロロホルム法により精製し、cDNA を調整し、定量的 RT-PCR 法にて、HIF 分解制御分子としてすでに報告されている pVHL について、遺伝子発現レベルを比較することで、VHL 遺伝子発現動態を解析した。SM-AP 細胞より通法にて DNA を抽出し、PCR 法にて HIF 分解制御分子 VHL 遺伝子の各 exon1~3 および各 exon 間の intron 領域を増幅し、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認したのちにカラム精製し、ダイレクト DNA シークエンス法にて、VHL 遺伝子の変異の有無を確認した。なお VHL 遺伝子の検索領域は、腎淡明細胞癌症例では exon1~3 に位置している Codon1~213 までの間に変異点を確認されていることを参考にしておこなった。

(3)HIF-1 α 分解関連分子 VHL 蛋白質解析: SM-AP 細胞を上記 1)項により培養し、通常の培養条件と低酸素条件下で、通法にて細胞溶解液からそれぞれ蛋白質を抽出し、免疫沈降法およびウエスタンブロッティング法にて蛋白質発現レベルを比較することで、VHL 蛋白質発現動態を解析する。同時に各 SM-AP 細胞 1.2x10⁴ 個をチャンバースライドに植え込み、経時的に 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、抗 VHL 抗体をもちいて、その発現動態を蛍光抗体法にて検討した。

(4)ヌードマウス移植腫瘍組織およびヒト癌組織での低酸素分子機構解析: ヒト唾液腺多形性腺腫由来 SM-AP1/4 およびヒト腺様嚢胞癌由来 ACC2/M を、通常の培養条件 (10% FCS/5% CO₂) で培養した後、1.0x10⁶ 個/200 μ l に調整してヌードマウス背部皮下移植腫瘍を形成させ、腫瘍内の酸素分圧を測定した。生体内の腫瘍組織で低酸素環境が維持されているかどうかを確認するためであり、酸素分圧測定には、生物組織内酸素分圧連続測定

装置酸素モニターを設備備品費で導入して用いた。さらに腫瘍組織を切除、固定し、パラフィンブロックを作製し、切片を作製するとともに、ヒト多形性腺腫組織手術材料パラフィンブロックからも同様に切片を作製し、免疫組織化学的に各分子の発現パターンを確認した。

4. 研究成果

(2010 年)

(1)HIF-1 α 分解関連分子 VHL 遺伝子解析: 多彩な間質表現をしめず唾液腺多形性腺腫由来細胞系である SM-AP 細胞より通法にて DNA を抽出し、PCR 法にて HIF 分解制御分子 VHL 遺伝子の各 exon1~3 および各 exon 間の intron 領域を増幅し、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認したのちにカラム精製し、ダイレクト DNA シークエンス法にて、VHL 遺伝子の変異の有無を確認した。その結果、導管上皮細胞性格の SM-AP1 および筋上皮細胞性格の SM-AP4 とともに exon1~3 領域には遺伝子変異はなかったが、exon1 と 2 の間の intron 領域に 1 塩基変異がみとめられた。

(2)HIF-1 α 分解関連分子 VHL 蛋白質解析: SM-AP 細胞を 1.2x10⁴ 個をチャンバースライドに植え込み通法とおり 5 日培養したのち、さらに通常の培養条件 (10% FCS/5% CO₂) と低酸素条件 (1% O₂/5% CO₂/94% N₂) とで 5 時間培養した後、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、抗 VHL 抗体をもちいて、その発現動態を蛍光抗体法にて検討した。免疫沈降法/ウエスタンブロッティング法にて確認した結果と同様に、SM-AP のうち分化方向の互いに異なる導管上皮細胞性格 SM-AP1 ならびに筋上皮細胞性格 SM-AP4 のいずれにおいても、VHL 発現は低酸素条件下でより低下していた。

(3)SM-AP 細胞系の細胞外基質(ECM)遺伝子解析: ヌードマウス移植腫瘍実験に先立ち、SM-AP1 と SM-AP4 における ECM 発現について試験管内で比較した。両細胞を通常の培養条件 (10% FCS/5% CO₂) と低酸素条件 (1% O₂/5% CO₂/94% N₂) とで 5 時間培養後、RNA を抽出・精製し、cDNA を調整して定量的 RT-PCR 法にて比較した。その結果、両細胞間で、SM-AP1 では perlecan および fibronectin が、SM-AP4 では tenascin が高発現していることが確認された。

(2011 年)

(1)ヌードマウス移植腫瘍組織での低酸素分子機構解析: ヒト唾液腺多形性腺腫由来 SM-AP1/4 およびヒト腺様嚢胞癌由来 ACC2/M を、通常の培養条件 (10% FCS/5% CO₂) で培養した後、1.0x10⁶ 個/200 μ l に調整

してヌードマウス背部皮下移植腫瘍を形成させ、腫瘍内の酸素分圧を生物組織内酸素分圧連続測定装置にて測定した。その結果、SM-API 移植腫瘍内酸素分圧は周囲皮下組織に比して有意に低いことが確認され、SM-API 移植腫瘍の方が ACC2/M 移植腫瘍より低酸素であることが判明した。移植腫瘍組織より切片を作製し免疫組織化学的に検討した結果、腫瘍組織内に hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) および VEGF が発現していた。

(2) ヒト唾液腺多形性腺腫組織での低酸素分子機構解析：ヒト多形性腺腫組織手術材料からも切片を作製し、免疫組織化学的に HIF-1 α および VEGF の発現パターンを確認したところ、ヌードマウス移植腫瘍組織同様に腫瘍組織内に発現がみとめられた。HIF-1 α 陽性細胞周囲には、perlecan および fibronectin の細胞外基質沈着がみられた。

(3) 実験結果の評価と研究の総括：これまでの実験結果より以下のように結論した。

- (a) 多形性腺腫由来細胞では、低酸素下での HIF-1 α 蛋白質の高発現および VHL 遺伝子・蛋白質の低発現により HIF-1 α の分解抑制機構がはたらいている。
- (b) 低酸素状態で核移行した HIF-1 α により VEGF の高発現レベルを維持される。
- (c) 試験管内でえられた結果は、ヌードマウス移植腫瘍組織・ヒト多形性腺腫組織手術材料の生体組織でも追認された。
- (d) 以上の機序によって低酸素環境で増殖さらには転移形質が誘導されている可能性が示唆された。

今後は、癌の微小環境としての低酸素状態の実験モデルを確立したので、今後はこの実験系を利用して低酸素応答性の制御転写因子 HIF-1 α の標的分子の増殖・浸潤・転移形質の獲得の分子機構について詳細な検討をすすめたい。そのなかでも、とくに lysyl oxidase(LOX)を中心とした細胞外基質の形成・改変による低酸素環境における細胞活性化機序を重点的に明らかにし、抗腫瘍対策を念頭においたトランスレーショナルな基礎研究としたい。

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 9 件)

- ①. Ida-Yonemochi H, Maruyama S, Kobayashi T, Yamazaki M, Cheng J, Saku T. Loss of keratin 13 in oral carcinoma in situ: a comparative study of protein and gene expression levels using

paraffin sections. *Mod Pathol* (査読有), in press, (2012).

- ②. Aida J, Kobayashi T, Saku T, Yamaguchi M, Shimomura N, Nakamura KI, Ishikawa N, Maruyama S, Cheng J, Poon SS, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Short telomeres in an oral precancerous lesion: Q-FISH analysis of leukoplakia. *J Oral Pathol Med* (査読有), 41 (5): 372-378, (2012).
- ③. Funayama A, Cheng J, Maruyama S, Yamazaki M, Kobayashi T, Syafridi M, Kundu S, Shingaki S, Saito C, Saku T. Enhanced expression of Podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. *Pathobiology* (査読有), 78 (3): 171-180, (2011).
- ④. Mikami T, Cheng J, Maruyama S, Kobayashi T, Funayama A, Yamazaki M, Adeola HA, Wu L, Shingaki S, Saito C, Saku T. Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: Their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. *Oral Oncol* (査読有), 47 (6): 497-503, (2011).
- ⑤. Alvarado CG, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Kobayashi T, Yamazaki M, Takagi R, Saku T. Nuclear translocation of b-catenin synchronized with loss of E-cadherin in oral epithelial dysplasia with a characteristic two-phase appearance. *Histopathology* (査読有), 59 (2): 283-291, (2011).
- ⑥. Katsura K, Maruyama S, Suzuki M, Saku T, Takagi R, Hayashi T. A case of desmoplastic ameloblastoma arising in the maxillary alveolus: the origin and time-course changes in the early stage of tumor development observed on dental radiographs. *Dentomaxillofac Radiol* (査読有), 40 (2): 126-129, (2010).
- ⑦. Tsuneki M, Yamazaki M, Cheng J, Al-Eryani K, Maruyama S, Kobayashi T, Saku T. Combined immunohistochemistry for the differential diagnosis of cystic jaw lesions; its practical use in surgical pathology. *Histopathology* (査読有), 57 (6): 806-813, (2010).
- ⑧. Oo HN, Myint YY, Maung CN, Oo PS, Cheng J, Maruyama S, Yamazaki M, Yagi M, Sawair FA, Saku T. Oral cancer in Myanmar: a preliminary survey based on hospital-based cancer registries. *J Oral Pathol Med* (査読有), 40 (1): 20-6, (2011).
- ⑨. Ahsan MS, Maruyama S, Cheng J,

Al-Eryani K, Yamazaki M, Hasegawa M, Tsuneki M, Saku T. Acetic acid treatment for wrinkle-free oral mucosal epithelia in paraffin section preparation. *Microsc Res Tech* (査読有), Jul 9, (2010).

〔学会発表〕(計 5 件)

- ①. 丸山 智: ワークショップ 1 外科病理シリーズ「口腔癌取り扱い規約の課題」; WS1-2: 口腔癌早期病変(表在癌)の病理診断基準の確立へ向けて. 第 30 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, さいたま市, 2012 年 1 月 26-27 日, 日本口腔腫瘍学会プログラム抄録集, 81, 2012.
- ②. 丸山 智, 山崎 学, 程 瑠, 朔敬: 唾液腺多形性腺腫における低酸素応答性増殖機構. 第 70 回日本癌学会総会, 名古屋市, 2011 年 10 月 3-5 日, 第 70 回日本癌学会プログラム抄録集: 333, 2011.
- ③. 丸山 智, 島津徳人, 工藤朝雄, 青葉孝昭, 朔 敬: 口腔扁平上皮癌の浸潤性評価: パールカン免疫陽性間質の立体構築. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜市, 2011 年 4 月 28-30 日, 日本病理学会会誌, 100 (1): 330, 2011.
- ④. 丸山 智, 山崎 学, 程 瑠, 朔敬: 口腔扁平苔癬のリンパ球浸潤域とパールカン沈着: 異型上皮との鑑別の試み. 第 21 回日本臨床口腔病理学会総会, 大阪市, 2010 年 7 月 31 日-8 月 1 日, 第 21 回日本口腔病理学会プログラム抄録集: 62, 2010.
- ⑤. 丸山 智, 程 瑠, 山崎 学, 朔敬: 唾液腺多形性腺腫の低酸素環境における増殖機構: SM-AP 細胞による検討. 第 99 回日本病理学会総会, 東京都, 2010 年 4 月 27-29 日, 日本病理学会会誌, 99 (1): 308, 2010.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 智 (MARUYAMA SATOSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 30397161

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし