

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20534

研究課題名(和文) 足場依存性喪失に関わる因子の機能解析による口腔癌悪性化の新規予測因子の開発

研究課題名(英文) Development of new predictive factors for malignant alteration of oral cancer by the functional analysis of the factors in regard to loss of anchorage dependence.

研究代表者

竹縄 隆徳 (TAKENAWA, Takanori)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：30711270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性マウス線維肉腫腫瘍モデルの単一腫瘍細胞由来の性質の異なる2種類のクローン細胞QR-32とQRsP-11に関するプロテオミクスにより発現に差を認めたカルシウム結合タンパク質calreticulin (CALR)は、大きなサイズの癌や転移がある癌など進行癌や、短い生存期間の癌患者で高発現し、有用な予後因子となる可能性が示唆された。また、口腔扁平上皮癌細胞においてCALRの発現を、siRNAを導入して減弱させると、口腔扁平上皮癌細胞の増殖能や細胞移動能が有意に減弱し、悪性度を低下させることにつながった。以上から、CALRは重要な口腔癌の癌化を予測するマーカーと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We used QR-32 cells in this study which is a regressive murine fibrosarcoma cell clone; and QRsP-11, a progressive malignant tumor cell clone originated from QR-32. CALR is a Ca<sup>2+</sup>-binding protein. This study was aimed to determine the usefulness of CALR as a prognostic factor in patients with oral cancers. Our findings suggest that elevated expression of CALR might play an important role in tumor progression in oral cancer, and could be considered as a useful prognostic factor in oral cancer patients. Next, we tried to investigate the functions of CALR in oral squamous cell carcinoma cell lines by using CALR-siRNA. We transfected CALR-siRNA into HSC2 and HSC3 cells. Down-regulation of CALR resulted in growth inhibition and lower cell migration on HSC2 and HSC3. These results suggest that down-regulation of CALR expressions might conductive to the reduction of OSCC malignancy. Our data suggested that CALR may be a new predictive factor for malignant alteration of oral cancer.

研究分野：口腔癌

キーワード：Calreticulin 口腔癌 足場依存性喪失 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌はその発生部位の特性より早期発見が可能であるため、口腔癌検診が盛んに行われるようになり、前癌病変や早期癌の発見が増えつつある。しかしながら、WHOの診断基準に基づいて行われる生検材料の組織異型性診断は病理医によって診断にばらつきがあり、口腔扁平上皮癌の発生を予知する上では信頼性に乏しいのが現状である。そこで診断の精度を上げるために、簡便な一定の基準で客観的に判断できる、腫瘍の進展に関与するバイオマーカーの同定が必要とされる。正常な上皮細胞に複数の遺伝子変異が起こることで前癌細胞となり、さらに前癌細胞が過剰に増殖して良性腫瘍が形成される。良性腫瘍は、浸潤能・転移能を持たない細胞集団で、異常な増殖を起こすが、発生した場所から移動することはない。この良性腫瘍にさらに遺伝子変異が加わることで、浸潤能・転移能を有する癌(幹)細胞が生じると考えられている。腫瘍が浸潤能・転移能を持つようになることを、腫瘍の悪性化と呼ぶ。また悪性腫瘍細胞の特性として、細胞の足場非依存性増殖が指摘されている。これまで、このような腫瘍の悪性化を促す様々な遺伝子変異について多くの研究が行われてきた。遺伝子のプロモーター領域における CpG island のメチレーションやヒストン修飾といった、エピジェネティックな遺伝子変異は、DNA の塩基配列を伴わず遺伝子発現が変化する現象であり、腫瘍の悪性化や組織発生など、様々な疾患への関与が示唆されている。しかし近年、細胞が分泌するタンパク質に悪性化を促進する機能があることが知られるようになり、前癌細胞や正常細胞が互いに影響を及ぼし合うことによっても、癌化が促進されると考えられるようになった。そこで我々は、癌の悪性化の進展メカニズムの解明を目指して、単一腫瘍細胞由来の性質の異なる 2 種類のクローン細胞、即ち炎症性マウス線維肉腫腫瘍モデル(細胞株)で造腫瘍性が弱く転移能のないクローン細胞である退縮性クローン QR-32 と、造腫瘍性と転移能が高い進行性クローン QRsP-11 に関して 2 次元電気泳動(2-DE)を用いたプロテオーム研究による差次的発現解析を行った。その結果、退縮性クローンと比較して進行性クローンにおいて発現に差を認めたタンパク質、即ち足場依存性の喪失に寄与すると思われるタンパク質を検出した。さらにそのタンパク質について、ヒト舌において mRNA の発現レベルを UCSC Genome Bio Informatics で確認した(図 1)。そこで、これらの発現に有意差を認めたタンパク質に関して、口腔扁平上皮癌細胞株(HSC2, HSC3, HSC4, SAS, Ca9-22)と正常上皮由来細胞株(HaCaT)・上皮異形成症由来細胞株(DOK)間で特異的な変動を示す因子を検索することにより、アクチンフィラメントと結合し、フィラメントの安定化や他の結合タンパク質との結合を調節する Tropomyosin 1 alpha chain (TPM1)、近年、DNA 損傷修復や

複製ストレスに関わるタンパク質の制御を介し細胞の抗がん剤感受性や突然変異の発生に重要な役割を果たすと考えられている heat shock protein 90kDa beta (HSP90B1)、細胞内カルシウムホメオスタシス制御に関与するカルシウム結合タンパクである calreticulin (CALR)の 3 種類を同定した。

2 次元電気泳動で発現に有意差を認めた蛋白質の舌における mRNA の発現レベル(図 1)

Gene	Sample抽出部位	QRsP-11(進行性腫瘍クローン)におけるタンパク質の発現レベル	mRNA level in Microarray of Tongue
<i>calreticulin (CALR)</i>	細胞質	促進	正常
<i>tropomyosin 1 (TPM1)</i>	細胞質	促進	高発現
<i>annexin A5 (ANXA5)</i>	細胞質	促進	正常
HSP90AB1	細胞質	促進	低下
HSP90AA1	細胞質	促進	低下
<b>HSP90B1</b>	細胞質	促進	低下
PEBP1	細胞質	促進	低下
PRX	細胞質	促進	正常
Anp32e	細胞質	抑制	低下
HDGF	細胞質	抑制	正常
ZDC	核	抑制	正常
Lamin A/C (LMNA)	核	抑制	高発現
far upstream element-binding protein 1 (FUBP1)	核	抑制	低下
hnRNP A1 (HNRNPA1)	核	抑制	低下
hnRNP K (HNRNPK)	核	抑制	低下
hnRNP AB (HNRPAB)	核	抑制	正常
guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G(t) subunit beta-1 (GNB1)	核	抑制	低下

2. 研究の目的

舌癌を含む口腔扁平上皮癌の生検・手術材料における CALR の発現を検索し、口腔扁平上皮癌の発生や悪性度を予知できるバイオマーカーとなり得るか否かを検討することを第一の目的とした。次に、siRNA を用いた遺伝子発現改変技術を応用して、足場依存性の喪失に寄与すると考えられる CALR の口腔扁平上皮癌における機能を検討することを第二の目的とした。最終的にデータを統合することにより、口腔扁平上皮癌の新規分子標的となり得るバイオマーカーを同定することを第三の目的とした。

3. 研究の方法

(1)免疫組織染色法を用いた口腔扁平上皮癌における CALR の発現の検索

対象と免疫組織染色法

山口大学医学部附属病院歯科口腔外科において 2000 年 4 月から 2010 年 3 月までに生検により口腔扁平上皮癌と診断され、根治的な腫瘍切除術が施行された 111 例を対象とした(表 1)。カルテ記載内容を基に、上記 111 症例の臨床病理学的諸因子を検索した。さらに上記 111 例の生検・手術材料を対象として、CALR の発現をダコ ENVISION キット/HRP(DAB)(DAKO, Glostrup, Denmark)を用いた酵素抗体間接法にて染色した。すなわち、パラフィン包埋ブロックより作製した 4 μm の組織切片を通常に従い脱パラフィン後、マイクローウェーブ[0.1M クエン酸水溶液(pH 6.0)中にて 500W, 5 分間処理]を用いて抗原賦活化を行い、3%過酸化水素水により内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を 30 分間行

い、ブロッキング試薬にて5分間非特異的反応を阻止した後、一次抗体として、抗Calreticulin ラビットポリクロナル抗体 (StressMarq Bioscience Inc., Victoria, BC, Canada) をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, : PBS) (-) により100倍希釈し、4、一晚反応させた。その後ポリマー試薬を室温にて30分間反応させ、DAB発色液にて発色させ水洗した後、ヘマトキシリンにて対比核染色、脱水、透徹、封入を行った。なお、各ステップの洗浄には、PBS(-) を用いた。

#### 免疫組織染色の評価方法

免疫染色の評価は、細胞質もしくは、細胞膜に免疫反応を認める腫瘍細胞の、全腫瘍細胞に占める割合(%)をCALR発現率とし、0%は0、50% > を1、50% ≤ を2とした。さらに染色強度を0 (無)、1 (軽度)、2 (中等度)、3 (強度) の4段階に分類し、発現率のレベルと染色強度の和を算出し、CALR labeling index (LI) とし、スコアが0~2をlow expression、3~5をhigh expressionとした。すなわち、40倍の弱視野にて標本の全範囲を観察し、focalに染色されている部位を同定し、その中から任意の3カ所を選択し、それぞれ400倍の強視野にて最低200個以上の腫瘍細胞をCountし、そのfocalに選択された部位の全腫瘍細胞中に占めるCALR陽性細胞の割合(レベル 0~2)と最も強い染色強度との和を算出することでCALR LIを算出し、スコア化を行った。なおすべてのCountと染色強度の評価は、観察者がその標本患者の予後や、その他の分析結果が分からない条件下で行われた。

#### 統計処理

各々の実験データの解析および統計処理については、Stat View (Abacus Concept Inc., Grand Rapids, MI, USA) を用いた。腫瘍細胞におけるCALRの発現と臨床病理学的特徴の関係については<sup>2</sup>検定によって統計処理を行った。また術後からの生存期間をKaplan-Meier法を用いて、予後因子としての評価をCoxの比例ハザードモデルを用いて解析した。それぞれ5%以下を有意と評価した。

## (2) Si RNA を用いた CALR 蛋白発現の抑制による CALR の機能解析

### 細胞および培養法

実験にはヒト口腔扁平上皮癌細胞株である HSC2 細胞、HSC3 細胞を用いた。それぞれの細胞は 100mm プラスティックペトリ皿 (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA) で、10% 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum; 以下 FBS と略記; Thermo Fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA)、100 μg/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher scientific)、100 U/ml ペニシリン (Thermo Fisher scientific)、0.25 μg/ml アンホテリシン B (Thermo Fisher scientific) を含むダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (以下 DMEM と略記; Sigma Aldrich., St. Louis, MO,

USA) を増殖培養液として用い、空気中に 5% の割合で炭酸ガスを含む培養器内で、37 にて培養した。

### Si RNA によるノックダウン法

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC2 および HSC3) における CALR の蛋白発現を抑制するために、siRNA (silencer®; Thermo Fisher Scientific) を用いた。細胞への導入には lipofectamine (Thermo Fisher Scientific) を用いて 6 穴プレートで行った。100 pmol の siRNA と 4 μl の lipofectamine を、それぞれ Opti-MEM で溶解し混合して total 200 μl とした後、800 μl の Opti-MEM で満たされた各 well に添加し 4 時間培養した後、FBS を 300 μl 加えた。蛋白発現抑制の確認は、Western blotting を用いた。

### Western blot 法

培養細胞の蛋白標品は蛋白抽出用 lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl-sulfate; 以下 SDS と略記; 和光純薬)、1% Triton X 100、1% sodium deoxycholate] で処理して、調製した。蛋白濃度は、Bradford の方法に準じたマイクロアッセイ法 (Bio-Rad) により測定した。その後、5% β-メルカプトエタノール (Sigma Aldrich) を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) に、2% SDS、0.1% プロモフェノールブルー (片山化学、大阪)、10% グリセロール (和光純薬) を加えた loading buffer に混和して、10% アクリルアミドの分離ゲルを用いて、Laemmli の方法に準じてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; 以下 SDS-PAGE と略記) を行った。泳動標品は Towbin らの方法に準じて polyvinylidene difluorid 膜 (以下 PVDF 膜と略記; Bio-Rad) に 100V、3 時間、氷冷下にて電氣的に転写し、この PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline; 以下 TBS と略記) を用いて非特異的反応をブロッキングした。一次抗体として、TBS で 500 倍に希釈した抗 Calreticulin ラビットポリクロナル抗体 (StressMarq Bioscience) と 4 にて一晚反応させた。続いて WesternBreeze Chromogenic Immunodetection System (Thermo Fisher scientific) を用いて、二次抗体、Chromogen と反応させることにより発色させたバンドを検出した。

### 細胞増殖能の検索

細胞の増殖能は、3-(3,4-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (以下 MTT と略記; Sigma Aldrich) 法を用いて測定した。すなわち、96 穴マイクロプレート (Becton Dickinson) に  $3 \times 10^3$  個の細胞を植え込んだ後、24~96 時間培養し、測定時間培養後、最

終濃度が 1 mg/ml となるように MTT 溶液を加え 37、4 時間反応させ形成された MTT formazan を 100  $\mu$ l のジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide; 以下 DMSO と略記; Sigma Aldrich) を用いて溶解し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) にて、OD 490 nm で吸光度を測定することにより生細胞数を評価した。

#### 細胞遊走能の検索法

細胞移動能は、Wound healing assay を用いて評価した。すなわち、各細胞を 12 穴プレートに 50000 個/穴で播種し、24 時間後にイエローチップを用いてスクラッチを加え 24 時間処理し、スクラッチによる幅を観察することで細胞移動能を評価した。

#### 細胞移動能の検索法

ボイデンチャンバーを用いた Migration assay を行った。すなわち、10% FBS を含む D-MEM 培養液を下部チャンバーに入れ、その上に気泡が入らないように 8  $\mu$ m のポアサイズのポリカーボネート膜を載せ、上部チャンバーをセットして、各上部チャンバー内に  $3 \times 10^3$  個の各細胞 (500  $\mu$ l) を入れた。37、24 時間静置培養し、上部チャンバー側に残存している細胞を綿棒で拭き除去した後、下部チャンバー側へ移動した細胞を残し、ポリカーボネート膜をメタノールで 3 分間固定し、1% トリジンブルーにて 3 分間染色し、風乾後、スライドガラスに封入し、無作為に 5 視野を選び、移動した細胞をカウントした。

## 4. 研究成果

### (1) 腫瘍細胞における CALR の発現

口腔扁平上皮癌 111 例の臨床病理学的特徴を (表 1) に示す。

(表 1)

Characteristic	Total (n = 111) No. of patients	%
Age (years)		
Median	70.0	
Min-max	18-96	
< 65	41	36.9
$\geq$ 65	70	63.1
Gender		
Male	60	54.1
Female	51	45.9
T classification		
1	26	23.4
2	55	49.5
3	8	7.2
4	22	19.8
N classification		
0	82	73.9
1	12	10.8
2	14	12.6
3	3	2.7
Stage		
I	26	23.4
II	41	36.9
III	12	10.8
IV	32	28.8
Outcome		
Alive	84	75.7
Death	27	24.3
CALR expression in tumor cells		
Low	67	60.4
High	44	39.6

腫瘍細胞における CALR 低発現が 67 例 (60.4%)、腫瘍細胞における CALR 高発現が 44 例 (39.6%) であった。

また、(表 2) に示すように腫瘍細胞における CALR の発現と臨床病理学的特徴との関連性では、CALR 発現は、T 分類、N 分類、stage、転帰において有意差を認め、T3・T4、N+、stage、死亡例において統計学的有意に CALR は高発現であった。

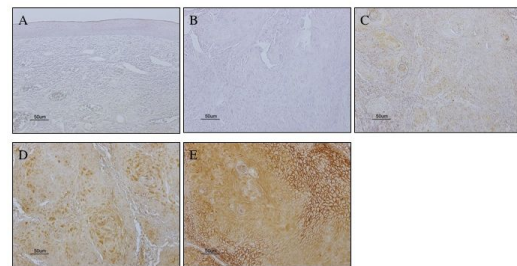
(表 2)

Characteristic	CALR expression in tumor cell		Total (n = 111)	P-value *
	Low expression (n = 67, 60.4%) n	High expression (n = 44, 39.6%) n		
Age				
< 65	25	16	41	0.7247
$\geq$ 65	42	28	70	
Gender				0.2817
Male	39	21	60	
Female	28	23	51	
T classification				0.0027
1 + 2	56	25	81	
3 + 4	11	19	30	
N classification				0.0219
0	54	28	82	
1 + 2 + 3	13	16	29	
Stage				0.0013
I + II	48	19	67	
III + IV	19	25	44	

\*  $P < 0.05$  was defined as significant.

検体の多くで、腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に CALR の発現を認め、発現は focal パターンをとっていたが、症例によって CALR の発現には差が認められた (図 2)。

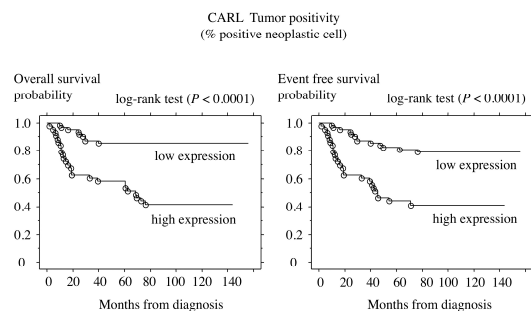
(図 2)



A は正常口腔粘膜上皮で CALR 陰性、B は口腔扁平上皮癌で CALR 陰性、C は口腔扁平上皮癌で CALR 軽度発現、D は口腔扁平上皮癌で CALR 中程度発現、E は口腔扁平上皮癌で CALR 高度発現。

腫瘍細胞における CALR 発現と生存期間との関係を検索した。Overall survival (OS) ならびに Event free survival (EFS) は、腫瘍細胞における CALR 発現が低い患者群に比べて、CALR 発現が高い患者群において有意に低値であった (図 3)。

(図 3)



Cox の比例ハザードモデルを用いて解析を行ったところ、OS に影響を与えるリスク因子として、T 分類、N 分類、stage と共に CALR

発現に有意差を認め、CALRの高発現は、有用な予後不良因子であった(表3)。

(表3)

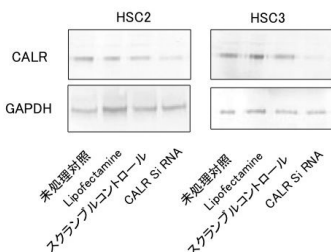
Variable	Hazard ratio	95%CI	P-value*
Age years <65 vs ≥65	1.652	0.771—3.542	0.1966
Gender Male vs Female	1.351	0.689—2.650	0.3814
T classification T1+T2 vs T3+T4	2.216	1.118—4.391	0.0226
N classification N0 vs N1+N2+N3	3.041	1.543—5.995	0.0013
Stage Stage I+II vs Stage III+IV	2.673	1.349—5.296	0.0048
CALR expression High vs Low	5.641	2.624—12.130	<0.0001

CI: Confidence Interval \*P < 0.05 was defined as significant.

## (2) CALR発現抑制による機能解析

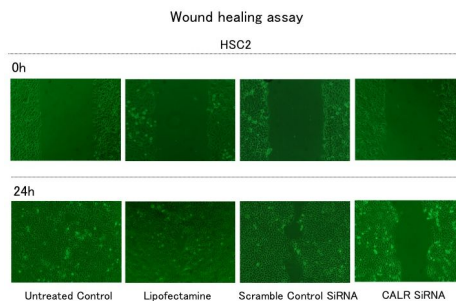
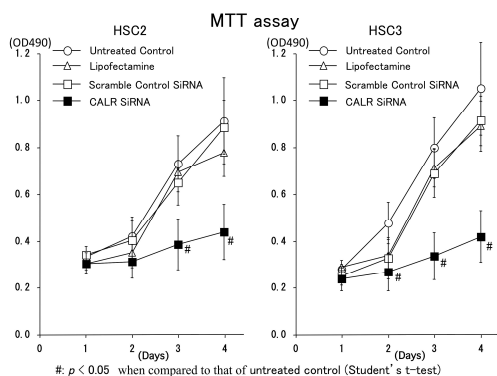
CALRを標的とするsiRNA (Silencer® Select Validated siRNAs)とスクランブルコントロールをHSC2細胞、HSC3細胞に導入したところ、それぞれCALRの蛋白レベルは明らかな減弱を示した(図4)。

(図4)

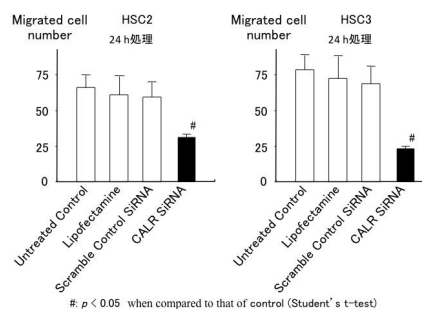


HSC2細胞ならびにHSC3細胞ともにCALR発現を抑制することで、スクランブルコントロールを導入した場合と比較して、細胞増殖能(MTT assay)、細胞移動能(wound healing assay)、マイグレーション能(migration assay)が顕著に減弱した(図5)。

(図5)



Migration assay



すなわちCALRの発現減弱は、口腔扁平上皮癌の悪性度を低下させることにつながった。

## 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 3 件)

真野隆充, 梅田浩嗣, 竹縄隆徳, 今釜崇, 森亜希, 上山吉哉. テリパラチド投与と外科的治療により治癒したビスフォスフォネート関連顎骨壊死の1例. 日本歯科先端技術研究所学会誌, 2017, 23(1):11-13. 査読あり

Harada K, Takenawa T, Ferdous T, Kuramitsu Y, Ueyama Y. Calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 2017, 13.6: 4857-4862. 査読あり  
Doi:10.3892/ol.2017.6062

Harada K, Harada T, Ferdous T, Takenawa T, Ueyama Y. Osteogenic cell fractions isolated from mouse tongue muscle. *Molecular medicine reports*, 2015, 12.1: 31-36. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

Takenawa T, Harada K, Ferdous T, Ueyama Y. Expression of calreticulin is a

novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. ESMO(EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY) Congress 2016, 2016年10月7日~10月11日 Copenhagen, Denmark

〔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

竹縄 隆徳 (TAKENAWA, Takanori)  
山口大学・医学部・特別医学研究員  
研究者番号：30711270

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

原田 耕志 (HARADA, Koji)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60253217

フェルドゥス タランヌム( FERDOUS, Tarannum)  
山口大学・大学院医学系研究科・学術研究員  
研究者番号：70647932

藏満 保宏 (KURAMITSU, Yasuhiro)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：50281811