

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11856

研究課題名(和文) シスタチンDの口腔癌に対する抑制効果と作用点の解析

研究課題名(英文) Inhibitory effect and action site of cystatin D on oral cancer

研究代表者

吉垣 純子 (YOSHIGAKI, Junko)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：40256904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：システインプロテアーゼ阻害剤であるシスタチンDの輸送経路と作用について解析を行った。口腔扁平上皮癌由来HSC-3細胞は、ビタミンD3添加によって遊走能が抑制されると同時にシスタチンDのmRNA発現が増加した。シスタチンDはゴルジ装置に観察されたことから、分泌されており、細胞外で作用すると考えられた。そこで、精製した組換えシスタチンDを培地に添加したところ、有意に細胞増殖が促進された。このことからシスタチンDの効果は発癌抑制作用よりは口腔扁平上皮の増殖や修復に関わっている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カテプシンLなどのシステインプロテアーゼは癌の進行や増殖に関わっていると考えられている。シスタチンDはカテプシンL活性を阻害するが、一部の癌細胞ではビタミンD3によって発現誘導されたシスタチンDが核へ移行し癌抑制的に働いていることが報告されている。本研究では、口腔癌細胞においてはビタミンD3依存的にシスタチンDが発現誘導されるが、細胞外へ分泌され細胞増殖を促進することが示された。唾液タンパク質であるシスタチンDが口腔粘膜細胞の増殖に関わることは、口腔機能の維持において重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied the effect of cystatin D, a cysteine protease inhibitor, in oncogenesis and malignancy of oral squamous epithelium. The addition of 1,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)2D3], which is known as an anti-tumor factors, suppressed the migration of the oral squamous cell carcinoma-derived cell line HSC-3, and induced the expression of cystatin D mRNA. Since cystatin D was localized in the Golgi apparatus, it is expected to be secreted and act on the cells extracellularly. In the presence of the purified recombinant cystatin D, the cell growth of HSC-3 was significantly facilitated. These results suggest that cystatin D is involved in the restoration of oral squamous epithelium although 1,25(OH)2D3 have effects of the inhibition of the cell migration and expression of cystatin D.

研究分野：口腔生理学

キーワード：シスタチンD 口腔癌 システインプロテアーゼ 細胞増殖 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シスタチンはカテプシン, カスパーゼ, カルパインなどの様々な生理機能に関わるシステインプロテアーゼを阻害する内在性インヒビターである。シスタチンには多くの種類が存在するが, シスタチン D は主に耳下腺に発現するシスタチンであり, 唾液中に分泌されている。我々は, 唾液腺腺房細胞において, シスタチン D のアミノ酸配列中に, 分泌顆粒への輸送や β アドレナリン受容体刺激による調節性分泌を受けるために必要なシグナルを含んでいるという結果を得ている。一方, シスタチン D が血液にも分泌されているという報告がある。さらに, シスタチン D は細胞外へ分泌されずに核へ輸送され, 遺伝子発現調節を行っているという報告もあり, その輸送経路の調節機構は複雑で多彩であることが予想される。

カテプシンなどのプロテアーゼは転移性癌細胞で高発現しており, 癌の浸潤および転移に関わっていると考えられている。口腔扁平上皮癌においても, 転移能および予後の悪さがカテプシン L の発現と相関すること, また, カテプシン L が高発現する口腔前癌病変では癌化する率が高いことが報告されている。一方, カテプシン L に対する阻害活性を持つシスタチン D が, 癌抑制因子として働く可能性が示されている。ビタミン D₃ は, 多様な癌において, 細胞増殖を抑制し分化を促進することによって抗癌作用があると言われているが, ビタミン D₃ 添加によってシスタチン D の発現が誘導される癌由来細胞が報告されている。口腔癌においてもビタミン D には癌抑制効果があると提唱されており, シスタチン D が癌抑制因子として働いている可能性がある。

しかし一方, プロテアーゼと阻害剤は発癌やその進展にネガティブにもポジティブにも働く可能性がある。たとえば, カテプシン E は腫瘍増殖や転移を抑制すると報告されている。シスタチンファミリーの1つであるシスタチン C は, 大腸癌やなどの悪性腫瘍で血清濃度が増加しており, 発癌に関与している可能性が示されている。以前, 申請者らは癌原遺伝子産物である Ha-Ras にはシスタチンと高次構造上の類似点があり, カテプシンに対する阻害効果があることを報告している。このようなアイソフォームと局在の多様性から, シスタチンファミリーは単なるプロテアーゼ阻害剤としての働きに留まらないことが予想された。

2. 研究の目的

タンパク質合成後の細胞内輸送経路の違いがその機能発現に重要な役割を果たしていることが予想された。カテプシンはリソソームのプロテアーゼであるが, いくつかの癌細胞において細胞外に分泌されると報告されている。また, シスタチン D 同様, 核内に輸送されることがあり, その場合にはリソソーム内よりも分解する標的タンパク質の特異性が高くなる。シスタチン C は細胞外からエンドサイトーシスされ, 細胞内でプロテアーゼ活性をコントロールする。したがって, シスタチン D の機能も輸送される場所によって生理機能が異なってくる可能性がある。そこで本研究では, シスタチン D の輸送経路の調節機構を調べ, 口腔癌に対する癌抑制因子として働きうるかの検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌細胞におけるシスタチン D の発現・輸送経路と転移能への影響の解析

ヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるビタミン D₃ 添加による内在性シスタチン D の発現および癌抑制作用を解析した。

転移能を持つと報告されている口腔扁平上皮癌由来 HSC-3 および悪性度が低いと言われている SAT 細胞に対して, 活性型ビタミン D₃ (カルシトリオール) 無添加時および添加時のシスタチン D の発現変化をリアルタイム RT-PCR により定量した

活性型ビタミン D₃ 存在下で培養した HSC-3 細胞を抗シスタチン D 抗体による蛍光染色を行い, シスタチン D の細胞内局在を観察した。

ビタミン D₃ 添加によってシスタチン D の発現が誘導された HSC-3 細胞について, 増殖能の変化を, Cell Counting kit-8 によって測定した。

HSC-3 細胞をコンフルエントまで培養したディッシュをスクラッチし, Wound Healing 法による遊走能を測定した。

(2) 口腔癌細胞に対する細胞外シスタチン D の効果の解析

プレパチラス分泌発現系を利用して大量発現した組換えシスタチン D タンパク質の精製を行った。HSC-3 細胞の培地に組換えシスタチン D を添加し, Cell Counting Kit-8 を用いて, 細胞増殖能を測定した。さらに, スクラッチ法を用いて, 細胞遊走能に対するシスタチン D の作用を解析した。

(3) 唾液腺細胞におけるシスタチン D の細胞内輸送の調節機構の解析

シスタチン D の全長配列を付加した HaloTag (fCst5-Halo) 遺伝子と, そのシグナルペプチド配列のみを融合した ssCst5-Halo を作成し, 唾液腺から単離した腺房細胞に発現させた。細胞外に分泌されるタンパク質量の時間変化を測定し, シスタチン D 配列を持たない ssCst5-Halo と全長配列を持つ fCst5-Halo の分泌量の違いを調べた。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞におけるシスタチン D の発現と細胞内局在

異なる転移能を持つと報告されている口腔癌由来細胞におけるシスタチン D の発現および作用を解析した。HSC-3 細胞はフォルボールエステルの添加により遊走が促進されるが, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で遊走が抑制された (図 1)。

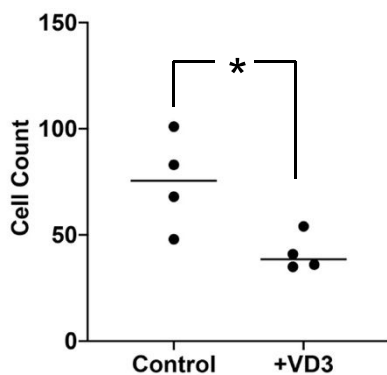


図 1 HSC-3 細胞の遊走能に対するビタミン D_3 (VD₃) の効果
 ビタミン D_3 (VD₃) 存在下および非存在下でスクラッチ後, 6 時間でギャップ無いに移動した細胞数をカウントした。
 (* $P < 0.05$, unpaired t-test)

次に, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加によるシスタチン C (CST3) およびシスタチン D (CST5) の発現量の変化を調べた。通常培地ではどちらも発現はほとんどみられなかったが, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加により, CST3 発現がほとんど変化しないのに対して CST5 は有意に発現量が増加した (図 2)。
 シスタチン D の蛍光染色によって HSC-3 細胞における局在を調べたところ, 核とは重ならず, 核の周囲のゴルジ装置と局在が一致した。したがって, シスタチン D は発現増加するが核へは移行せず分泌されていると考えられ, シスタチン D の作用は細胞外からと予想された。

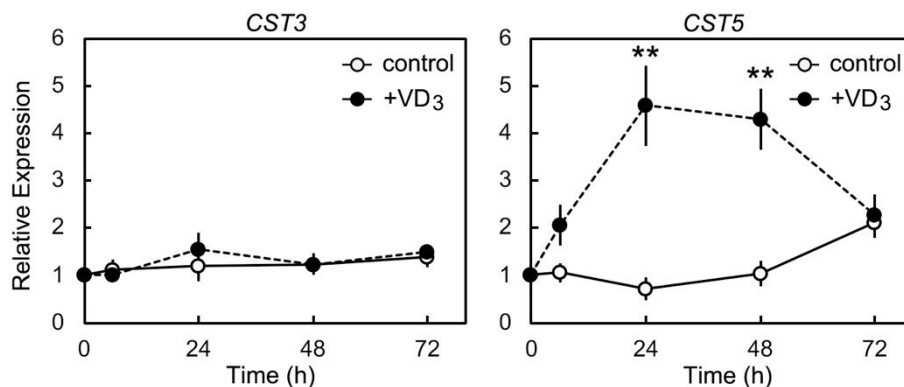


図 2 HSC-3 細胞におけるシスタチン C (Cst3) およびシスタチン D (Cst5) の発現変化
 (** $P < 0.01$, one-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test)

(2) 口腔扁平上皮癌細胞における細胞外シスタチン D の作用

プレバチラス分泌発現系で作成した組換えシスタチン D を培地に添加して HSC-3 細胞の培養を行った。意外なことに、シスタチン D の添加により、有意に細胞増殖が促進された（図 3）。遊走能については有意差はみられなかったが、促進される傾向にあった。このことから、シスタチン D の効果は発癌抑制作用よりは口腔扁平上皮の増殖や修復に関わっている可能性がある。

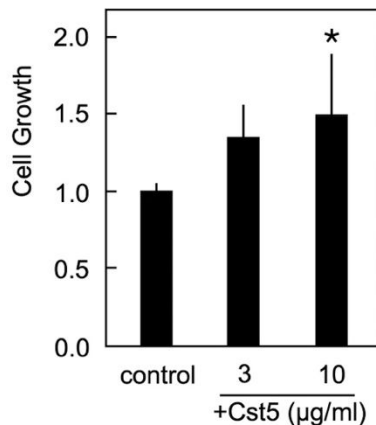


図 3 HSC-3 細胞の細胞増殖能に対するシスタチン D の効果

培地に組換えシスタチン D (3, 10µg/ml) を添加し、48 時間後の細胞数を Cell Counting kit で測定した (* $P < 0.05$, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

(3) 唾液腺細胞におけるシスタチン D の細胞内輸送

シスタチン D の全長配列を持つ fCst5-Halo とシグナルペプチド配列のみを持つ ssCst5-Halo の細胞外への分泌量を測定したところ、ssCst5-Halo は fCst5-Halo よりも非刺激時における分泌速度が速いことが明らかになった（図 4）。つまり、ssCst5-Halo は分泌顆粒に貯留せず、構成性に分泌されている可能性がある。細胞内に貯蔵される量を比較すると、fCst5-Halo の方が多く、分泌顆粒に貯留しているためであると考えられた。シグナルペプチド配列は小胞体内に輸送される際に切断されるため、ゴルジ装置で輸送経路が振り分けられる際には、ssCst5-Halo は単なる HaloTag になっている。そのため、分泌効率の違いはシスタチン D のアミノ酸配列に依存すると考えられる。したがって、シスタチン D のアミノ酸配列中には、タンパク質を分泌顆粒へ効率よく輸送するための何らかのシグナルが含まれていると考えられる。すなわち、シスタチン D は唾液タンパク質として口腔内に分泌される仕組みになっており、他の経路への輸送転換は何らかの異常が関わっている可能性がある。

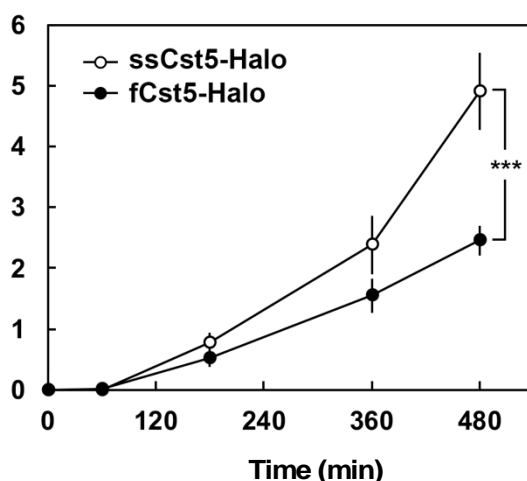


図 4 シスタチン D 配列を持つ HaloTag (fCst5-Halo) とシグナルペプチド配列のみを持つ HaloTag (ssCst5-Halo) の非刺激時分泌量 (***) $P < 0.001$, paired t-test)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakurai H, Yokoyama M, Katsumata-Kato O, Fujita-Yoshigaki J	4. 巻 61
2. 論文標題 Suppression of parotid acinar cell dysfunction by the free radical scavenger 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 475-480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.2334/josnusd.18-0405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Junko Fujita-Yoshigaki, Megumi Yokoyama, Osamu Katsumata-Kato
2. 発表標題 Role of cysteine protease inhibitors in malignancy of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 9th FAOPS Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junko Yoshigaki, Megumi Yokoyama, Osamu Kato
2. 発表標題 Regulation of transport pathway of cystatin D in salivary acinar cells
3. 学会等名 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junko Fujita-Yoshigaki, Megumi Yokoyama, Osamu Katsumata-Kato
2. 発表標題 Simulation analysis of selective transport of cystatin D-fused HaloTag proteins to regulated and constitutive secretory pathways
3. 学会等名 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学松戸歯学部生理学講座-physiology
<https://www.physiol-matsudo.net/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----