

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07226

研究課題名(和文) タンパク質分解酵素阻害因子(SLPI)によるがん病態の悪性化誘導機構の検討

研究課題名(英文) Study of the mechanism underlying secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)-induced malignancy of cancer

研究代表者

三上 剛和 (Mikami, Yoshikazu)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80434075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) は、白血球が生産する酵素から、正常な皮膚や粘膜を保護するタンパク質である。その一方で、SLPIを発現するがん細胞は、「悪性がん細胞」であることが示唆されている。そこで、がん細胞の悪性化に対するSLPIの役割と作用機序を解明するために、SLPIを発現するがん細胞に対してSLPI遺伝子を欠損させて、その影響を解析した。その結果、SLPIはゲノムDNAを修飾することによって、細胞接着因子の発現を抑制し、がん細胞の移動能と浸潤能を亢進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの転移は、生命予後やクオリティオブライフの著しい低下を引き起こす。したがって、その予防・治療法の開発は急務である。そのためには、関与する因子の同定と作用機序の解明が必要不可欠である。本研究では、SLPIを発現するがん細胞によって構成されるがんが、高頻度に転移するという報告に着目し、SLPIのがん細胞悪性化機構を検討した。その結果、SLPIがいくつかの細胞接着因子の発現を抑制することによって、がん細胞の移動能と浸潤能を亢進することを明らかにした。これらの結果は、がん転移の予防・治療法の開発における新規標的因子の同定に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the underlying mechanism of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)-induced cell migration, we compared SLPI-deleted human gingival carcinoma Ca9-22 (SLPI) cells and original (wild-type: wt) Ca9-22 cells using several microscopic imaging methods and gene expression analysis. Our results indicated reduced migration of SLPI cells compared to wtCa9-22 cells. The lamellipodia/dorsal ruffles were smaller and moved slower in SLPI cells compared to wtCa9-22 cells. Furthermore, well-developed intermediate filament bundles were observed at the desmosome junction of SLPI cells. In addition, Galectin4 was strongly expressed in SLPI cells, and its forced expression suppressed migration of wtCa9-22 cells. Taken together, SLPI facilitates cell migration by regulating lamellipodia/ruffles and desmosomes, in which Galectin4 plays an important role.

研究分野：細胞生物学

キーワード：SLPI 細胞移動能 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) は、上皮系の細胞によって粘液や上皮組織中に分泌されるタンパク質である。その役割としては、炎症反応において白血球が生産するタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)から、正常な皮膚や粘膜を保護することが知られている。その一方で、SLPI は様々ながん細胞にも発現し、SLPI を発現するがん細胞は、高い細胞移動能と周辺組織への浸潤能を有する「悪性がん細胞」であることが示唆されている。しかし、その作用機序については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞において SLPI 制御下にある細胞シグナル経路を同定するとともに、SLPI 発現がん細胞の機能と形態を特徴付けることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト口腔上皮がん由来の Ca9-22 細胞と SLPI 遺伝子を欠損させた Ca9-22 細胞(ΔSLPI)細胞についてマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現パターンを比較する。発現量変化の著しい因子を SLPI 関連因子の候補とする。同定された候補因子について強制発現や発現抑制細胞を樹立し、遺伝子発現パターンの変化、細胞移動能・浸潤能などの機能、および細胞形態に対する影響を解析する。

4. 研究成果

(1)実験結果

細胞移動能

Ca9-22 細胞と ΔSLPI 細胞について、スクラッチアッセイを用いて細胞移動能を比較した。ΔSLPI 細胞では、Ca9-22 細胞と比較して、顕著に細胞移動能が低下していた(Fig. 1 A, B)。次に、スクラッチゾーンに面した細胞の微細構造について、蛍光顕微鏡による観察を行った。Ca9-22 細胞では、細胞基底部に発達した葉状仮足が認められたが、ΔSLPI 細胞ではそれらは退縮していた(Fig. 1 C)。さらに、Ca-22 細胞の葉状仮足内にはファロイジンに染色性をもつアクチンフィラメントが密に存在していた(Fig. 1 C)。

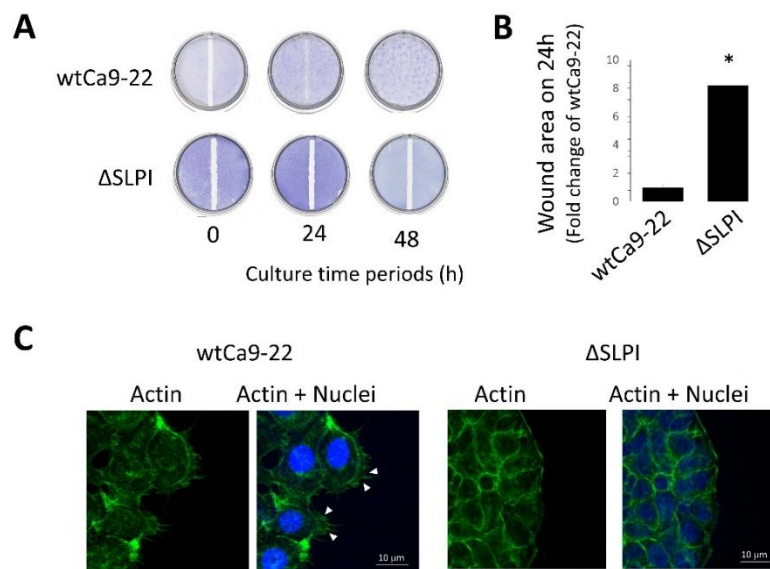


Fig. 1. (A) A scratch "wound" was made using a silicone tip at the centre of a confluent monolayer culture and the cells were cultured further for the indicated time. The cell layers were fixed and stained with toluidine blue. (B) Cell migration was quantified by measuring wound areas 24 h after injury. Experiments were independently performed in triplicate, and quantitative data were presented as the mean \pm standard deviation ($n=3$, $*P<0.05$ vs. wtCa9-22). (C) Histochemical staining was performed using Alexa Fluor™ 488 phalloidin (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Arrow heads indicate the lamellipodia.

糸状仮足と葉状仮足の形状と動態

増殖期にある Ca9-22 細胞と SLPI 細胞について、蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡 (SEM), および走査型イオン伝送顕微鏡 (SICM) による観察と解析を行った。Ca9-22 細胞は、スクラッチアッセイのスクラッチゾーンに面した細胞と同様に基底部にアクチンフィラメントの骨格をもった葉状仮足が発達していた。SLPI 細胞ではそれらは退縮していた (Fig. 2A)。一方で、両細胞では、細胞表面から上方向に伸びる糸状仮足が認められ、これらの仮足もアクチンフィラメントを骨格としてもっていた (Fig. 2A-C)。しかし、その形状は SLPI 細胞で小さくなり、数は増加していた (Fig. 2A-C)。次に SICM を用いて糸状仮足の動態を解析した。Ca9-22 細胞の大きく発達した糸状仮足では活発な伸縮と波状の動態が観察されたが、SLPI の糸状仮足では、動態は顕著に鈍化していた (Fig. 2D)。

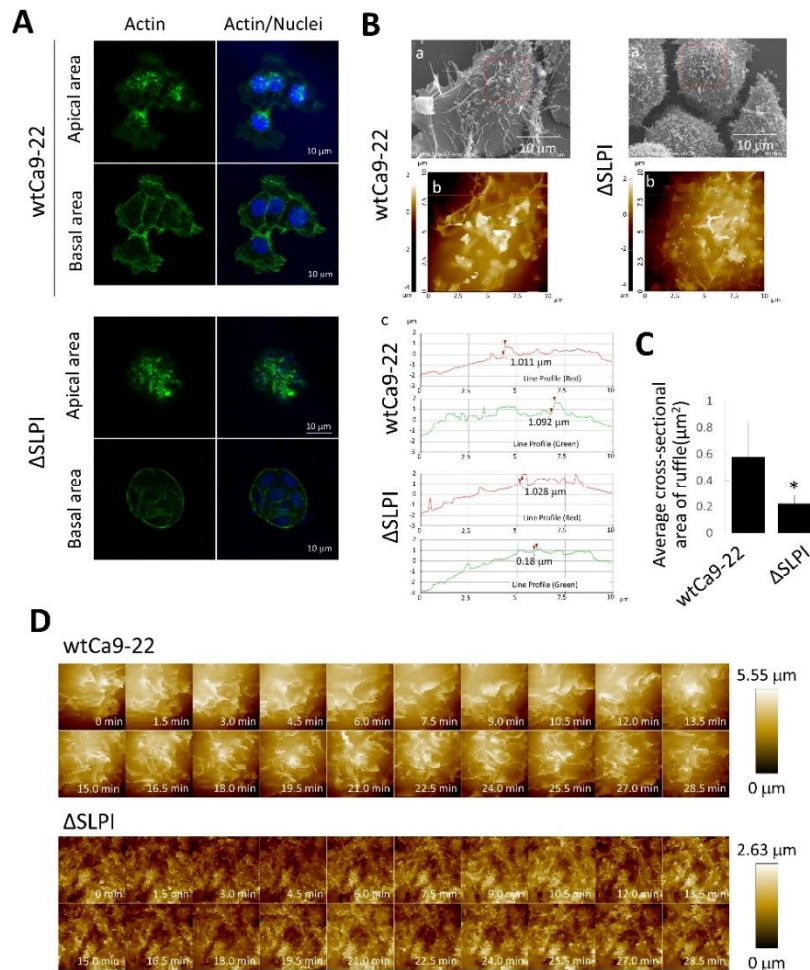


Fig. 2. (A) Cells in the growth phase were stained with Alexa FluorTM 488 phalloidin (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). (B) Scanning electron microscopy (SEM) images of wtCa9-22 cells (a). The red square indicates the image area shown in (b). (b) Scanning ion conductance microscopy (SICM) topography image. Images were taken at 10 × 10 μm with 128 × 128 pixels. (c) Cross-sectional graphs of these cells are indicated with a red line on the maximum diameter in each cell image in (b). Numerical in the graph shows size of height of the dorsal ruffle indicated by arrowheads. (C) Quantification of the dorsal ruffle area was performed. Randomly, five cells were selected from each cell type, and the average cross-sectional ruffle area was calculated. (D) Time-lapse imaging of wtCa9-22 (upper) and SLPI cell (lower) surface. To investigate movement of the ruffles, time-lapse morphological images of the ruffles on the surface of the living cell were obtained by SICM. All images were taken at 10 × 10 μm with 64 × 64 pixels.

細胞接着

透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて, Ca9-22 細胞と SLPI 細胞の細胞間接着領域の微細構造を観察した。Ca9-22 細胞どうし, SLPI 細胞どうしの接着面では, いずれも電子密度の濃いデスモゾーム様の構造が認められた。しかし, SLPI 細胞のデスモゾーム様構造には, 太く発達した中間径フィラメントと思われる裏打ち構造が顕著に認められたが, Ca9-22 細胞には認められなかった (Fig. 3)。

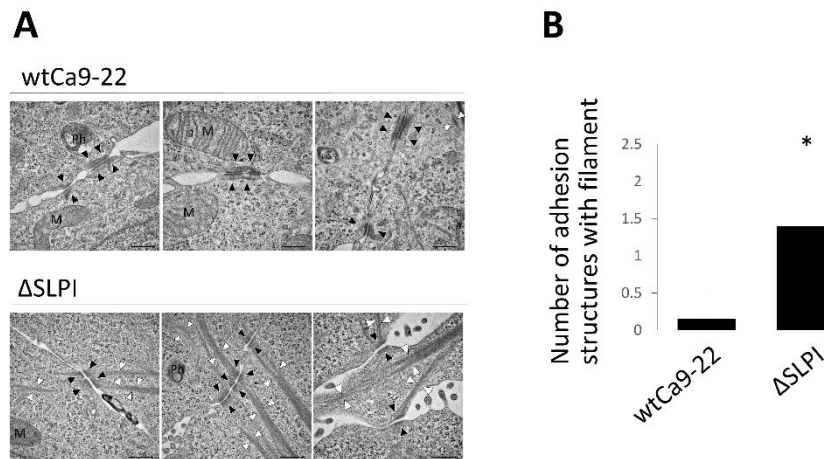


Fig. 3. (A) Typical transmission electron microscopy (TEM) images of wtCa9-22 and SLPI cells in a cluster. Well-developed filaments elongating from the desmosome junction are observed in the cytoplasm of SLPI cells in cluster. N: nucleus; M: mitochondria; Ph: phagosome; arrowhead (white): cytoplasmic filament bundle; arrowhead (black): desmosome junction. Scale bar: 0.5 μ m. (B) Quantification of the number of desmosome junctions with filament bundles. The number of desmosome junctions with filament bundles was counted in 20 sets of cell-cell adhesion structures in wtCa9-22 and SLPI cell clusters, respectively, and the average mean \pm standard deviation was calculated ($n=3$, $*P<0.05$ vs. wtCa9-22).

細胞内シグナル

マイクロアレイによる Ca9-22 細胞と SLPI 細胞の網羅的な遺伝子発現解析とデータベース上の機能情報から細胞接着に関与する *Galectin4* 遺伝子に着目して解析を行った。リアルタイム PCR 法による mRNA の発現量解析から, *Galectin4* 遺伝子は, Ca9-22 細胞ではほとんど発現しておらず, SLPI で強く発現していることが確認された (Fig. 4 A)。さらに, *Galectin4* 遺伝子上流のプロモーター領域のメチル化解析を行った結果, Ca9-22 細胞では, この領域が高度にメチル化されていることが明らかになった (Fig. 4 B)。また, *Galectin4* 遺伝子を強制発現させた Ca9-22 細胞では, 細胞移動能が抑制された (Fig. 4 C-E)。

(2) 結論

本研究の結果から, SLPI は *Galectin4* を含むいくつかの細胞接着因子の発現を抑制することによってがん細胞の細胞 - 細胞間あるいは細胞 - 細胞外基質間の接着を弛緩させ, その移動能を亢進させることを明らかにした。さらに, その発現抑制機序として, ゲノム DNA のメチル化が重要な役割を果たすことを明らかにした。また, 正常間葉系幹細胞が各細胞系譜へ分化する際に見られる細胞接着関連遺伝子群の発現パターンの変動が, Ca9-22 細胞と SLPI 細胞間の遺伝子発現パターンの変化に類似していること (データ未記載, 特許出願準備中) などを見出している。

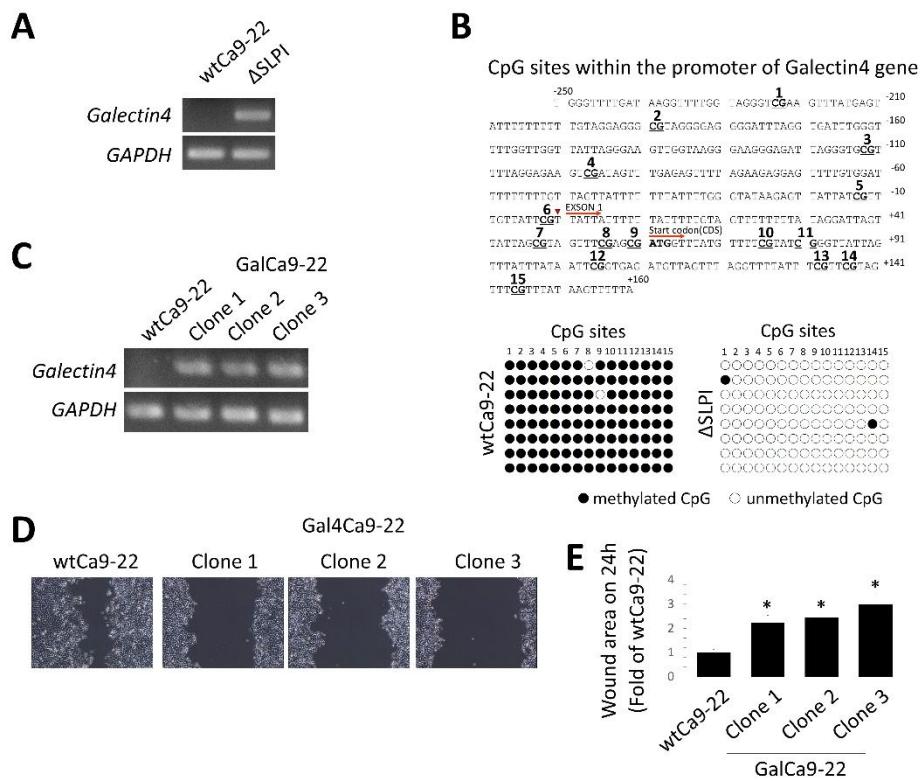


Fig. 4. (A) mRNA expression of *Galectin4* was analysed using RT-PCR. *GAPDH* was used as an internal control. Experiments were independently repeated three times, showing similar results. Typical data sets are shown in the left panel. (B) Bisulfite sequencing analyses of the *Galectin4* gene in wtCa9-22 and ΔSLP1 cells. Genomic DNA was extracted from each cell type and examined at positions -250 to +160 of the 5' promoter region of the *Galectin4* gene (relative to the transcription initiation site), which contained 15 CpG sites. Methylated and unmethylated CpG sites are shown as filled and open circles, respectively. The sequences of eight bacterial clones per genomic region examined are shown. (C) mRNA expression levels of *Galectin4* in the three clones stably transfected with *Galectin4* expression vectors (GalCa9-22) were analysed using RT-PCR. *GAPDH* was used as an internal control. Experiments were independently repeated three times, showing similar results. Typical data sets are shown in the upper panel. (D) Wound healing assays were performed. Cells were observed using a phase-contrast microscope 24 h after the scratch "wound" was made. (E) Cell migration was quantified by measuring wound areas 24 h after injury. Experiments were independently performed in triplicate, and quantitative data were presented as the mean \pm standard deviation (n=3, * P <0.05 vs. wtCa9-22).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizutani Y, Omagari D, Hayatsu M, Nameta M, Komiyama K, Mikami Y, Ushiki T.	4. 巻 14
2. 論文標題 SLPI facilitates cell migration by regulating lamellipodia/ruffles and desmosomes, in which Galectin4 plays an important role	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Adhesion and Migration	6. 最初と最後の頁 195-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336918.2020.1829264	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 -

1. 著者名 Omagari D, Hayatsu M, Yamamoto K, Kobayashi M, Tsukano N, Nameta M, Mikami Y.	4. 巻 In press
2. 論文標題 Gap junction with MLO-A5 osteoblast-like cell line induces ALP and BSP transcription of 3T3-L1 pre-adipocyte like cell line via Hspb1 while retaining adipogenic differentiation ability.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115596	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 -

1. 著者名 Mikami Y, Omagari D, Mizutani Y, Hayatsu M, Ushiki T, Tsuda H	4. 巻 138
2. 論文標題 Dual effect of polyphosphate on mineralization of rat osteoblast ROS17/2.8 cells in a dose-dependent manner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 209-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2018.10.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mizutani Y, Hayatsu M, Mikami Y, Ushiki T.
2. 発表標題 Scanning ion conductance microscopy for visualizing the surface topography of rat tissue sections.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikami Y, Tsukano N, Hayatsu M.
2. 発表標題 GAP JUNCTION WITH MLO-A5 OSTEOBLAST-LIKE CELLS INDUCE ALP AND BSP TRANSCRIPTION OF 3T3-L1 PRE-ADIPOCYTE-LIKE CELLS VIA HSPB1 WHILE RETAINING ADIPOGENIC DIFFERENTIATION ABILITY
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research(ISSCR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上剛和
2. 発表標題 口腔上皮がん細胞Ca9-22細胞の悪性化機構の検討
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会アップデートシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上剛和, 福島敦史, 水谷祐輔, 早津学, 小宮山一雄, 牛木辰男
2. 発表標題 Secretory leukocyte protease inhibitor による細胞移動能の制御機構に関する研究
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷 祐輔、早津 学、三上 剛和、牛木 辰男
2. 発表標題 イオン伝導顕微鏡による細胞・組織イメージング
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	上原 範久 (Uehara Norihisa) (30368211)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	早津 学 (Hayatsu Manabu) (40468898)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	水谷 祐輔 (Mizutani Yusuke) (40646238)	北海道大学・総合IR室・特任准教授 (10101)	
研究分担者	津田 啓方 (Tsuda Hiromasa) (60325470)	日本大学・歯学部・准教授 (32665)	
研究分担者	福島 敦史 (Fukushima Atsushi) (80415281)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------