

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19791375

研究課題名(和文) ケモカインCXCL14/BRAKによる口腔癌細胞の遊走抑制機構の解明

研究課題名(英文) An arrest chemokine CXCL14/BRAK for cell migration in an oral epithelial carcinoma

研究代表者

氏名(アルファベット) 楠畑かおり(佐藤かおり)(Kusubata, Kaori, (Sato, Kaori))

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号 80321884

研究成果の概要：

ケモカイン CXCL14/BRAK は、生理機能は不明であるが、口腔上皮癌においては顕著な発現低下が認められ、また、舌癌由来細胞の BRAK 高発現株はその造腫瘍性が抑制されたことから、癌治療(バイオセラピー)に用いる有用な分子と考えられた。本研究によって BRAK により制御される分子に、MMP-9、接着斑キナーゼ、Rap1 が同定され、これらの分子は BRAK に加えて、口腔癌治療への標的分子として有望な候補を示唆するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	210,000	2,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学、細胞・組織、歯学、癌、酵素、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ケモカイン CXCL14/BRAK は、生理機能は不明であるが、口腔上皮癌においては顕著な発現低下が認められ、また、舌癌由来細胞の BRAK 高発現株はその造腫瘍性が抑制された(Ozawa et al., Biochem Biophys Res Commun. 2006 348(2):406-412)。このことから、BRAK は癌治療(バイオセラピー)に用いる有用な分子と考えられた。

舌癌由来 HSC-3 細胞は、上皮細胞由来の転

移性の癌細胞であり、他の舌癌由来細胞系と同様に、BRAK 発現が低い。そこで HSC-3 に BRAK を高発現させると、培養においては、増殖には変化はなかったが、細胞形態がより扁平であった。また、マトリゲル上での細胞形態は、Mock コントロール細胞では鎖状に繋がる細胞遊走が観察されたが、BRAK 高発現細胞ではそれがほぼ完全に阻害されていた。このことから、細胞遊走または細胞接着に何らかの変化があることが明らかであっ

た。
しかし、ケモカインである BRAK は免疫系細胞に作用すると考えられる。上皮系癌細胞への作用については、細胞の性質変化についても分子メカニズムについても殆ど不明であった。

2. 研究の目的

マウス皮下移植における口腔上皮癌細胞 (HSC-3) のケモカイン BRAK による造腫瘍性の抑制機構を明らかにするため、浸潤および細胞遊走といった細胞の性質と、その分子メカニズムを明らかにする。特に、BRAK の遺伝子導入、細胞培養において BRAK の長期的な刺激によって変化する分子、すなわち HSC-3 の浸潤活性を抑制する分子について同定を試みる。さらに、BRAK のシグナル伝達系の解明を試みる。

3. 研究の方法

細胞培養と BRAK 高発現株の作成

ヒト舌癌由来上皮細胞 HSC-3 は、DMEM 培地 (Sigma, D6046) に 10%ウシ胎児血清を加えた培地で維持した。HSC-3 細胞に、ヒト BRAK (NM_004887) の配列を含むベクターおよびコントロールベクターを遺伝子導入し、ネオマイシン耐性株である Mock コントロール細胞、BRAK 高発現株を選択した (Ozawa et al., Biochem Biophys Res Commun. 2006 348(2):406-412)。

細胞遊走の測定

ヒト舌癌由来上皮細胞 HSC-3 細胞を用いて、細胞外マトリックスのマトリゲル上での培養を行い、位相差顕微鏡によって形態を観察した。

細胞接着測定

ヒト線維芽細胞由来 I 型コラーゲン、ラミニン 1、フィブロネクチン、また HSC-3 細胞がプラスチック培養皿に沈着する細胞外マトリックス (主成分はラミニン 5) をコートした 96-well プレートに細胞外マトリックスとして用いた。トリプシン処理によって浮遊させた HSC-3 Mock, BRAK 高発現株を 5×10^3 細胞を 3 ウェルずつ播種し、15 分から 60 分培養した。非接着細胞は、培地で 3 回洗って取り除き、接着した細胞のみを、cell counting kit-8 (同仁和光純薬) を用いて細胞数を測定した。

免疫蛍光染色

HSC-3 細胞は、コラーゲン上での接着後 3 時間で細胞を 3.7%パラホルムアルデヒドで固定し、定法に従い、接着斑タンパク質パキシリンの細胞染色を行った。Zeiss 強焦点レーザー顕微鏡 LSM510 を用いて観察した。

MMP の発現測定

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) ファミリーの mRNA 発現を RT-PCR によって測定した。ゼラチンゼイモグラフィで MMP-2/9 の培地への分泌量を比較した。

プルダウンアッセイ

RalGDS の Rap1 結合領域、Pak-CRIB ドメインを GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させ、GST 結合ビーズ (GE, Glutathione sepharose 4) で精製した。BRAK で 0 ~ 10 分刺激した HSC-3 細胞の溶解液とビーズを混合し、結合した Rap1 をウエスタンブロットを行い活性を比較した。

4. 研究成果

4-1. BRAK 高発現株の細胞浸潤、遊走について

BRAK 高発現株ではマトリゲル上における細胞遊走が抑制される

ケモカイン BRAK によるマウス皮下に移植した腫瘍の口腔上皮癌の造腫瘍性の抑制について、培養系での解明を試みた。そこで、マトリゲル上での 3 次元培養は、プラスチック上の遊走よりも生体内に近いと考えられるので、この系を用いて細胞遊走、浸潤を観察した。HSC-3 細胞は、マトリゲル上で培養すると、浸潤を起こさず、マトリゲル上で細胞同士が接着して鎖状の形態になった (図 1 左)。それに対して、BRAK 高発現株は、ほぼ完全にその鎖状の形態形成が阻害されていた (図 1 右)。

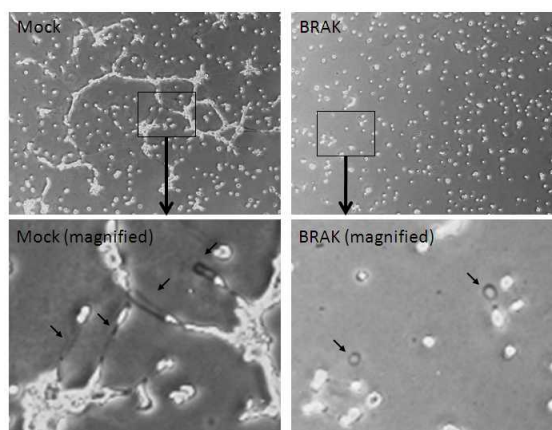


図 1. HSC-3 コントロール Mock 細胞と、BRAK 高発現株のマトリゲル上の遊走

さらに、この鎖状の形態形成には、細胞の遊走と、マトリックスの分解が必要と予想された。生体内や 3 次元環境における細胞遊走

には、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) による細胞外マトリックスの分解が必須である。そこで、MMP 阻害剤によって、鎖状の形態形成が阻害されるかについて検討したところ、20 μ M GM6001 によって完全に阻害された (結果未発表)。このことから、BRAK 高発現株のマトリゲル上の遊走は、MMP 依存的事であることが明らかとなった。そこで、HSC-3 細胞の遊走抑制は、MMP の発現抑制に起因するのではないかと仮説を立て、主要な MMP の発現について、次に検討を行った。

4 - 2 . MMP-9 の発現低下

BRAK 発現によって、発現低下する MMP がマトリゲル上の遊走に關与すると予想される。HSC-3 細胞に発現する MMP の種類を網羅的に知るために、マイクロアレイ解析を行った。その結果から、HSC-3 に発現する MMP を選択し、次に半定量的 RT-PCR を行い、発現の低下する MMP を探索した。HSC-3 細胞に発現し、BRAK 高発現株で低下したのは、MMP-1, MMP-9, MT1-MMP, ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (uPA) であった。次に、ゼラチンゼイモグラフィを行い、MMP-9 について、分泌および活性化について検討した。その結果、前駆体型 MMP-9 の発現低下をタンパクレベルでも確認した。さらに、BRAK 高発現株に発現する BRAK を siRNA によって低下させると MMP-9 の分泌が回復したため、MMP-9 の発現は BRAK によって抑制されていることが明らかとなった (結果未発表)。以上の結果から、マトリゲル上の HSC-3 細胞の遊走は MMP-9 を介していることが示唆された。

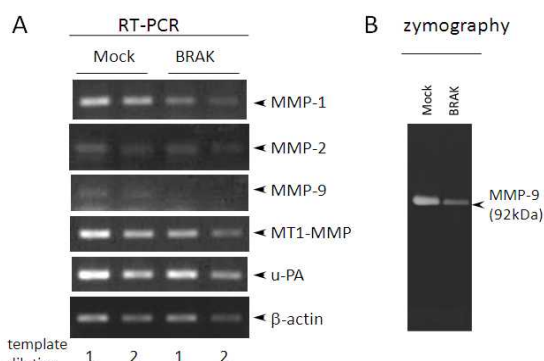


図 2 . HSC-3-Mock と比較して、BRAK 高発現株では mRNA 量 (A, RT-PCR) および、前駆体型 MMP-9 の分泌量 (B, ゼイモグラフィ) が低下した。

4 - 3 . BRAK 高発現株における細胞接着および接着斑の変化

マトリゲル上の遊走における BRAK 高発

現株の遊走抑制のメカニズムについて、BRAK 高発現株では形が偏平であることから、細胞接着の増強によって遊走抑制が付随的に起こる可能性があった。そこで細胞接着に関して解析を行った。接着アッセイおよび、接着斑の観察は 3 次元環境では難しいので、培養用プラスチック上での検討を行った。

HSC-3 細胞の接着アッセイを行った結果、コラーゲン (CnI) と自らが沈着するラミニン 5 によく接着し、fibronectin やマトリゲル成分であるラミニン 1 にはあまり接着しなかった (図 3)。コラーゲンへの接着は、BRAK 高発現株では約 2 倍に有意に上昇していた。

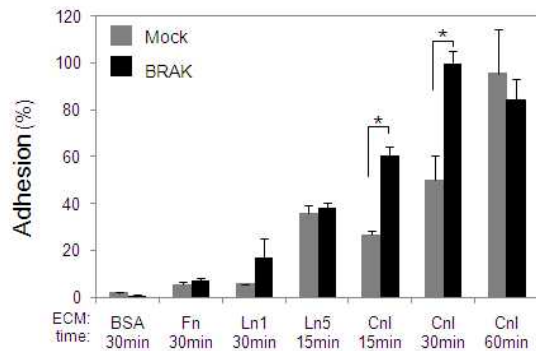


図 3 . BRAK 高発現株の I 型コラーゲンへの接着増強

そこで、コラーゲンへの接着について、接着装置である接着斑の形成について、パキリン染色を行い検討した。接着後 3 時間での細胞接着は BRAK 高発現株ではコントロール細胞が典型的な接着斑を形成しないのに対して (図 4 上部) 細くて長い典型的な接着斑を形成し、アクチンストレスファイバーとの共同在が観察された。(図 4 下部)。このことから、接着の増強は、接着斑形成およびアクチン線維の形成の増強によって、細胞接着が増強されたために細胞遊走が抑制されたことが示唆された。

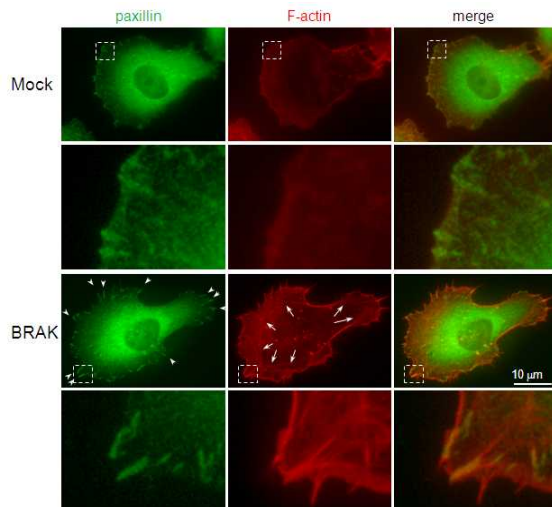


図 4 . HSC-3 Mock 細胞に比べて BRAK 高発現株では接着斑形成が増強している。矢じりは接着斑を、矢印はスト

レスファイバーを示す。

4 - 4 .BRAK の培地への添加による接着斑の増強

これまでの結果は、BRAK の強発現株を用いた解析であった。培地へ BRAK を添加した場合でも、同様の変化があるかどうかは、内在的な BRAK 高発現やネオマイシン耐性株樹立の際の変化である可能性を排除するために必要な実験である。そこで、コラーゲンへの接着斑形成を指標として、BRAK の添加を行い、3 時間後、2 日後の変化を観察した。その結果、3 時間後では変化は見られなかったが（結果未発表）2 日後では、BRAK 高発現株と同様に、長い接着斑形成と、ストレスファイバー形成が観察された（図 5）。

以上のことから、BRAK は、HSC-3 細胞の接着を増強する作用のあることが明らかとなった。接着の増強によって、遊走阻害が引き起こされたことは予想されるが、MMP-9 の発現抑制が接着強化が原因かどうかは今後の課題である。

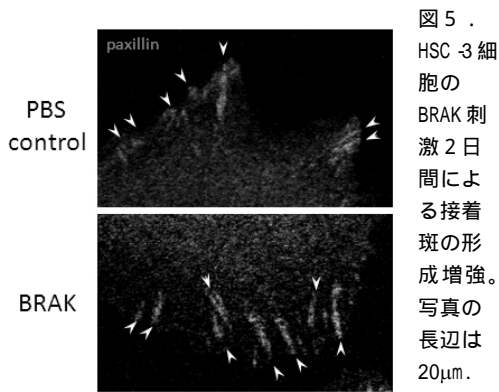


図 5 . HSC-3 細胞の BRAK 刺激 2 日間による接着斑の形成増強。写真の長辺は 20 μ m. 矢じりは接着斑を示す。

は接着斑を示す。

4 - 5 . 分子メカニズムの解明に向けて

1) 接着斑キナーゼの発現増加

BRAK で細胞を刺激して、接着が増強されるまで、2 日間かかるのは、タンパク合成を介している可能性がある。BRAK 高発現株における接着増強のメカニズムについて、原因となる分子をタンパクレベルで同定するために、接着斑形成に関わる分子のウエスタンブロットを行い、発現または活性が増強した分子を探索した。その結果、アクチニン、パキシリン、アクチン、インテグリン 2、1 の発現量に変化は見られなかったが、接着斑キナーゼ（FAK）の発現およびリン酸化 Y861 の増加が見られた（図 6）。

このことから、FAK の発現増強によって、接着斑形成が亢進したと考えられた。さらに、BRAK 高発現株ではストレスファイバーも

観察されたが、FAK の下流分子の RhoA の経路が活性化されたことが示唆される。様々な癌において、FAK の活性化が、癌抑制に働くか、（RhoA 経路の活性化）癌化に働くか（src・p130CAS・Rac 経路の活性化）は議論の分かれるところであるが、HSC-3 細胞の場合は、抑制的に働くと考えられる。今後 siRNA による、FAK の発現量の低下による細胞遊走の抑制が解除されるかについて検証が必要であろう。



図 6 . HSC-3 Mock 細胞に比べて BRAK 高発現株では接着斑キナーゼ（FAK）のタンパク質発現量が 1.7 倍に増強した。Y861 のリン酸化も、それに伴い上昇した。Std は、のリコンビナント BRAK の位置（9kDa）を示す。

2) HSC-3 細胞における、BRAK 刺激による低分子 G-protein Rap1 の活性化

以上の結果から、BRAK 高発現株において

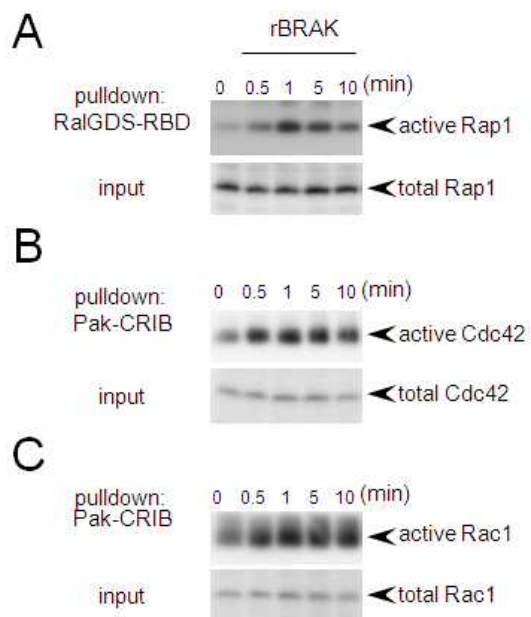


図 7 . BRAK 刺激による Rap1, Cdc42, Rac1 の活性化をプルダウンアッセイによって検出した。Input は用いた細胞溶解液のプルダウン前の存在量を示す。

は、FAK の長期的な培養（2 日間以上）による発現の増加が、接着斑の形成を亢進させることで細胞遊走の抑制されていることが示唆されたが、その最初の BRAK のシグナルで活性化される分子を探索して、その分子を抑制することで、HSC-3 細胞の遊走抑制のメカニズムの解析を試みた。そこで、これまでの知見より、CXCL 型ケモカインで活性化する分子として、7 開幕貫通型受容体、3 量体 G タンパク質 Gia、低分子 G タンパク質 Rap1 が予想された。受容体はまだ同定されておらず、Gia については、既に百日咳毒素を用いて間接的に活性化が証明されている。そこで、Rap1 に焦点を当て、RalGDS の Rap1 結合領域を用いたプルダウンアッセイを試みた。その下流分子であり、Rho family の Cdc42, Rac1 についても、Pak-CRIB ドメインを用いてプルダウンアッセイを行い活性を検出した。その結果、BRAK 刺激後 1 分で Rap1 の一過性の活性化が観察された。同様に、Rap1 の下流分子である Cdc42, Rac1 低分子 G タンパク質の活性化も観察された(図 7)。

そこで、RalGDS の Rap1 結合領域を GFP に融合したベクターを HSC-3 細胞に強制発現させて、BRAK 高発現株における長い接着斑形成が抑制されるかについて検討した。その結果、長い接着斑形成は抑制された(結果未発表)。このことから、HSC-3 細胞においては Rap1 は長い接着斑形成に関与していることが示唆された。

まとめ

以上の結果から、CXCL14/ BRAK は、舌癌由来 HSC-3 細胞において、Rap1 を活性化し、FAK の発現増強させ、その結果、接着斑形成の亢進、コラーゲンへの接着増強、MMP を介した細胞遊走の阻害を引き起こしていることが示唆された。これらが、マウス皮下への造腫瘍活性を抑制している原因と考えられる。

今後の課題

CXCL14/BRAK の発現は、舌癌を含む頭頸部癌のように、発現が顕著に阻害されている癌もあるが、前立腺癌、乳癌細胞 (MCF-7) では増悪因子の可能性もある。BRAK は皮膚において恒常性の維持、樹状細胞の誘引による感染防御機構に重要と考えられている。癌治療においても、口腔癌の腫瘍抑制効果や、樹状細胞の活性化による免疫賦活化で癌を抑制する効果が期待できる反面、他の癌の造腫瘍性や転移を促進する可能性もあり、分子標的治療にどう取り入れるかは今後の課題である。FAK については、癌の分子標的治療の候補であり、総説が複数発表されている。同様に、Rap1 においても、癌によって発

現や活性の上昇が癌抑制 (上皮癌) に働く場合とそうでない場合 (メラノーマ) があり、全ての癌に BRAK 投与は有用ではない。また基礎的な癌に対するこれらの分子の不活性化などでどのような治療効果が見込めるかについて、培養細胞や動物実験レベルの基礎研究が必要と考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

佐藤かおり
ケモカイン BRAK/CXCL14 は Rap1 の活性化により舌癌由来細胞のコラーゲンへの接着を増強する
第 40 回日本結合組織学会学術大会第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会
平成 20 年 5 月 29 -30 日
東京こまばエミナース
優秀演題賞受賞

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

楠畑 かおり (佐藤かおり)

(Kusubata Kaori (Sato Kaori))

東京大学 ・医科学研究所 ・特任研究員

研究者番号 8 0 3 2 1 8 8 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし