

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10123

研究課題名（和文）プロテアーゼインヒビターによる口腔がん細胞の浸潤機構の解明

研究課題名（英文）Investigating the role of SLPI on oral squamous cell carcinoma invasion.

研究代表者

小宮山 雄介 (Komiya, Yusuke)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：90586471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞形態の観察からwtSLPI細胞に対して、SLPI細胞は細胞突起の伸長が少なく、円形の形態をしていた。wound healing assayによる比較では、SLPIで遊走能の低下が観察された。また、コラーゲンゲルを用いた三次元培養ではwtSLPI細胞において認められた浸潤能がSLPIでは低下していることが確認された。

一方で、SLPI細胞とその起源となるwtSLPI細胞（Ca9-22）細胞のSTR解析を行なったところ、両者のSTR表現型の一致率は30%程度であった。SLPI細胞は相同組換えにより作製しており、このことが結果に影響したと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLPIは当初の好中球プロテアーゼインヒビターとしての機能のみならず、細胞内のシグナル伝達経路に作用して細胞の運動の制御に関与することが示され、SLPIの機能をコントロールすることでがん浸潤をコントロールできる可能性が示された。本研究でもSLPIの細胞遊走能への関与が確認され、がんの制御のために新たな創薬のターゲットとなると考えられる。超高齢化社会を迎え、今後我が国のがんの発症率は飛躍的に上昇する可能性がある。効率的な治療法の開発のためにも従来の視点とは異なる薬剤の開発が必要になると考えられ、本研究もそのような開発の基盤となると考えている。

研究成果の概要（英文）：Cell morphology showed that SLPI cells had less elongated cell protrusions and a more rounded shape compared to wtSLPI cells, and a decrease in migration ability was observed in SLPI cells by wound healing assay. In three-dimensional culture using collagen gel, the invasive ability of SLPI cells was decreased compared to that of wtSLPI cells.

The STR phenotypes of SLPI cells and wtSLPI cells (Ca9-22), from which SLPI cells originated, showed only 30% concordance in STR phenotype, which may be due to the fact that SLPI cells were generated by homologous recombination.

研究分野：がん

キーワード：扁平上皮上皮 SLPI 三次元培養

1. 研究開始当初の背景

Secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI)は全身の細胞に発現し、好中球の分泌するタンパク質分解酵素に対する阻害因子として組織の融解を防ぐ機能が知られている分子である。近年、この分子は細胞内にも分布していることが示され、研究代表者らはSLPI発現をCa9-22細胞でノックアウトする事で細胞浸潤を示していたCa9-22細胞が浸潤を示さなくなる現象を観察した。そこで本研究ではこの現象についてさらに解析をすすめ、Organotypic gel culture systemを構築し、細胞内でのSLPIの機能について解析する。

2. 研究の目的

本研究ではがんにおけるSLPI発現の生物学的意義について、SLPIを発現しているCa9-22細胞(wtSLPI細胞)とこの細胞を母細胞としてSLPIをノックアウトした Δ SLPI細胞を用いてorganotypic gel culture systemを構築して検討する。wtSLPIと Δ SLPI細胞の浸潤能の違いを発現遺伝子のマイクロアレイ法やプルダウンアッセイにより検討し、SLPIのシグナル伝達への影響について解明する。SLPIを中心としてがんの浸潤機構を理解することで、新たながん治療薬あるいは既存の治療薬の効果を増強する補助的な治療を開発するための基礎的な知見を得ることが目的である。また、本研究で使用されるOrganotypic gel culture systemはがん治療薬研究や化学療法に対する効果判定に利用できる可能性があり、再現性の高い培養系を作製することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 平面培養による細胞形態の観察、遊走能の観察

コラーゲンコーティングを行っていない、細胞培養用ディッシュにて培養を行う。10%FBS 1%ペニシリン/ストレプトマイシン添加DMEM (low glucose)を用いて培養した。Wound healing assayにはスクレーパーを用いる代わりに細胞培養ディッシュにあらかじめ一定幅になるようにシリコンシートを貼り付けて行なった。シリコンシートは細胞がコンフルエントになった時点で取り除き、試験開始とした。

(2) コラーゲンをういた三次元培養による wtSLPI 細胞および SLPI 細胞の浸潤能の比較

あらかじめ細胞を封入しない状態で6ウェルプレート用のポアサイズ1 μ mのセルカルチャーインサートにコラーゲンを一層成形した。wtSLPI細胞またはSLPI細胞をコラーゲン上に播種し、サブコンフルエントとなるようにメディウムに浸漬させた状態で培養した。コンフルエントになった状態で培地をAir lift用のメディウムに培地交換し、上皮の重層化を行なった。培地交換はおよそ3日毎に行なった。一定期間培養ののち、ゲルを切り出して固定し、組織学的解析を行なった。

(3) マイクロアレイ法による wtSLPI 細胞と SLPI 細胞の三次元培養系での遺伝子発現解析

浸潤したがん細胞のゲルのみを回収し、NucleoSpin RNA plusを用いてRNA抽出を行なった。RNAの質的検討をNanodrop Oneで行なった。

(4) プルダウンアッセイによる SLPI 相互作用分子の探索

FLAG タグを導入したクローニング用プライマーを設計し, wtSLPI 細胞より抽出した RNA より作成した cDNA ライブラリを用いて PCR 増幅を行い, ベクターへの遺伝子組み換えを試みた.

- (5) STR 解析による wtSLPI 細胞と SLPI 細胞のマーカ-遺伝子比較
wtSLPI 細胞と SLPI 細胞からそれぞれ DNA を抽出し, Nanodrop One で量的・質的に十分であることを確認した. STR 解析はタカラバイオ株式会社に受託した. 角アレル増幅数の一致率をもとに STR 型の判定を試みた.

4. 研究成果

- (1) 平面培養による細胞形態の観察, 遊走能の観察
平面培養による細胞形態の観察の結果, wtSLPI 細胞に対して SLPI 細胞は細胞突起の伸長が少なく, 円形の形態をしていた. 細胞形態の変化は遊走能に反映されると考えられ, wound healing assay による比較では, 24 時間後での細胞の遊走距離が wtSLPI 細胞と比較して SLPI 細胞では短い傾向を認め, 遊走能の低下が観察された.
- (2) コラーゲンをういた三次元培養による wtSLPI 細胞および SLPI 細胞の浸潤能の比較
コラーゲンをういた三次元培養では wtSLPI 細胞において上皮脚様の構造から伸長して浸潤する様子が観察された. がん組織の浸潤時の Budding に近い形態ではあるが, 少し異なる印象であった. この点については繰り返し実験数を増やして確認する必要がある. 一方, SLPI 細胞では, wtSLPI で認められた浸潤様の組織形態が認められなかった. このことから SLPI ではコラーゲンへの浸潤能が低下していることが示唆された.
- (3) マイクロアレイ法による wtSLPI 細胞と SLPI 細胞の三次元培養系での遺伝子発現解析
上記の三次元培養系において浸潤する wtSLPI 細胞と SLPI 細胞の遺伝子発現解析を試みた. はじめに浸潤の先端部分から細胞回収し, Total RNA の回収を試みたが, サンプル自体の大きさが小さく, 質的に十分な RNA を回収することができなかった. このため, 現在ほかの解析手法を導入することを検討している.
- (4) プルダウンアッセイによる SLPI 相互作用分子の探索
SLPI 相互作用分子を同定し, 細胞内における SLPI の作用点を明らかにすることを目指した. FLAG タグを導入した SLPI 分子をもつ発現ベクターを構築中であり, この研究パートでの大きな成果は得られていない. 現在もベクター構築中であり, 研究期間終了後も継続して構築を進める予定である.
- (5) STR 解析による wtSLPI 細胞と SLPI 細胞のマーカ-遺伝子比較
SLPI 細胞は wtSLPI 細胞すなわち Ca9-22 を母細胞として相同組換えにより SLPI をノックアウトした細胞であるが, STR の表現型が一致するのかどうかについては検証されてこなかった. 相同組換え法を行なっていたとしても, 母細胞と娘細胞では STR の表現型は一致するものと予想されるが, これに反して一致率は 30% 程度であり, STR の表現型に違いが見られた. この分析結果が直ちに細胞の起源の違いを表すとは限らず, 遺伝子組換えを経ているために起きた変動である可能性も十分に考えられる. このことはターゲットとした SLPI 遺伝子意外の領域にも変化をもたらした可能性を示しており, その他のゲノム情報の確認が必要となる可能性を示していると考えられた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------