

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月12日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390538

研究課題名（和文） 間質細胞が産生するがん浸潤・転移を制御する分子群の探索とその診断・治療への応用

研究課題名（英文） Isolation of molecules synthesized by stromal cells, which regulate tumor invasion and metastasis: application in diagnosis and therapy

研究代表者

林堂 安貴（HAYASHIDO YASUTAKA）

広島大学・病院・講師

研究者番号：70243251

研究成果の概要（和文）：

本研究では、口腔癌の浸潤転移機構を明らかにするため、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤増殖に与える間質の線維芽細胞の影響について解析を行った。線維芽細胞は、トロンボスポンジを産生し、扁平上皮癌細胞の運動能とマトリックスメタロプロテアーゼ9（MMP-9）産生を亢進させていることを明らかにした。また、線維芽細胞が産生するI型コラーゲンは、扁平上皮癌細胞のインテグリン $\alpha V\beta 8$ を介して、増殖と運動能を促進させていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

To assess the participation of stromal components in the progression of oral squamous cell carcinoma (SCC) cells, we investigated the effect of fibroblasts on the proliferation, motility and proteolytic activity of SCC cells. Fibroblasts in the stroma of oral SCC synthesize TSP-1, which induces haptotactic migration and enhances the ability to synthesize matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in oral SCC cells. Further type I collagen produced by fibroblasts facilitates the proliferation and migration of oral SCC cells via integrin $\alpha V\beta 8$.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1) 口腔癌 (2) 浸潤・転移 (3) 間質細胞 (4) 細胞増殖 (5) 細胞遊走 (6) 蛋白分解活性 (7) インテグリン (8) 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の特徴は周囲組織への著しい浸潤性増殖と遠隔部位への転移巣の形成であり、特に転移巣の形成が悪性腫瘍の治療上の最大の障害になっている。浸潤・転移はがん細胞自身の特性によってのみ制御されている

のではなく、周囲の間質成分をはじめとする宿主との相互作用によっても影響を受けていると考えられている。

我々はこれまで、生体での口腔癌の浸潤転移機構を明らかにするため、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤増殖に与える間質の線維芽細胞

の影響について解析を行い、線維芽細胞が扁平上皮癌細胞の細胞遊走能と蛋白分解活性と強く亢進させることを報告してきた。線維芽細胞培養上清より口腔癌細胞の遊走を促進する因子の分離を試み、熱及び還元と比較的安定な既知の細胞遊走促進因子とは異なる約 50kDa の蛋白を分離し、fibroblast derived motility factor (FDMF)として報告してきた。FDMF の細胞遊走促進活性の発現には、チロシンキナーゼが関与していると考えているが、FDMF は百日咳毒素によってもその活性が阻害された。現在までのところ、FDMF は Gi 蛋白共役受容体を介しチロシンキナーゼを活性化し細胞骨格系を制御して細胞の運動能を亢進させていると考えているが、アミノ酸及び塩基配列は決定されるまでには至っていない。

さらに線維芽細胞が扁平上皮癌細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) 活性化能、特に膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP) 発現を亢進させることや活性化された MMP-2 が細胞膜上の α V インテグリンを介して癌細胞に結合し、癌周囲の基底膜成分を分解している所見を見いだしている。

このように生体でのがんの浸潤増殖は、がん細胞自身の特性によってのみではなく、周囲の間質成分によっても制御されると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに細胞の運動能を制御する因子として autocrine motility factor (AMF) や scatter factor (HGF) の成長因子や種々の細胞外基質蛋白が報告されている。我々が現在まで部分精製に成功している間質細胞が産生する細胞遊走促進因子 (FDMF) は、その精製過程や生化学的性質からこれらの既知の細胞遊走促進因子とは異なる新しい蛋白と考えられる。

また生体ではマトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) 等の蛋白分解酵素はがん細胞だけではなく周囲の間質細胞によっても産生され、間質細胞の影響下でがん細胞の細胞膜上で活性化されることが知られているが、その生物学的メカニズムについては未だ明らかにされていない。

本研究では、生体での口腔癌の浸潤・転移機構を明らかにするため、口腔粘膜由来線維芽細胞培養上清から細胞遊走促進因子と蛋白分解活性促進因子を分離し、同定することを目的としている。

同定された細胞遊走促進因子と蛋白分解活性促進因子の口腔癌組織での発現を免疫組織学的に検索し、これら因子の口腔癌の予後予測因子としての可能性について検討する。さらにこれらの因子によってもたら

される細胞増殖や細胞遊走のメカニズムを解析し、これらの因子が伝達するシグナルを制御することで、口腔癌細胞の増殖や運動の抑制を試みた。

3. 研究の方法

1. 細胞

口腔扁平上皮癌由来細胞株として、歯肉由来扁平上皮癌細胞株 Ca9-22, 舌由来扁平上皮癌細胞株 KO, 舌由来扁平上皮癌細胞株 SCCKN 及び口蓋由来扁平上皮癌細胞株 ZA を用いた。線維芽細胞は、正常歯肉より組織片培養法によって得られたものを使用した。

2. 細胞遊走促進因子及び蛋白分解活性促進因子の分離・精製

線維芽細胞を無血清培養し、得られた培養上清を限外濾過・凍結乾燥にて濃縮後、FPLC システムにてゲルクロマトグラフィー、ヘパリン親和クロマトグラフィー、強陰イオン交換クロマトグラフィー等を行い、細胞遊走促進因子及び蛋白分解活性促進因子の分離・精製を行った。

3. 細胞遊走能と蛋白分解促進活性の解析

細胞遊走能及び蛋白分解促進活性は、それぞれ、Boyden chamber 法及びザイモグラフィにて検索した。

4. I 型コラーゲンによる MAP キナーゼカスケード活性化の解析

扁平上皮癌細胞を I 型コラーゲンでコートした 16 mm 径培養皿で各時間培養後、Lammeli sample buffer で可溶化し電気泳動後、PVDF メンブレンに転写した。抗リン酸化 FAK 抗体、抗リン酸化 Raf 抗体、抗リン酸化 MEK 抗体、ウサギ抗リン酸化 Erk1/2 抗体およびウサギ抗リン酸化 p90RSK を用いて MAP キナーゼカスケード分子のリン酸化を検索した。

5. I 型コラーゲンによる Rac1, Cdc42 及び RhoA の活性化の解析

I 型コラーゲン上で培養した口腔扁平上皮癌細胞から、Pull Down assay によって活性化 Rac1, 活性化 Cdc42 及び活性化 RhoA の分離・回収を行い、抗ヒト Rac1 抗体、抗ヒト Cdc42 抗体あるいは抗ヒト RhoA 抗体を用いた immunoblot を行った。

6. アンチセンス遺伝子導入による SCCKN の α V 発現抑制

インテグリン α V サブユニットの open reading frame を、哺乳動物発現ベクター pCI-neo (Promega) にアンチセンス方向に組み込んだ pCI-neo/antisense α を作製し、リポフェクション法にて扁平上皮癌細胞に導入し、インテグリン α V の発現抑制を試みた。

7. アンチセンスオリゴによるインテグリン β 8 発現の抑制

インテグリン β 8 蛋白の発現を抑制するた

めに, FITC 標識インテグリン $\beta 8$ モルフォリノアンチセンスオリゴ (5' -AAG CCA GGG CCG AGC CGC ACA TAAT-3'; Gene Tools, LLC, Philomath, OR, USA) を Special Delivery System (Gene Tools, LLC) を用いて導入した.

4. 研究成果

これまで報告した fibroblast derived motility factor (FDMF) とは異なる高分子量の蛋白が, 線維芽細胞の培養上清に存在することがわかった.

精製をすすめた結果, 細胞細胞遊走と蛋白分解酵素の MMP-9 産生を促進させたのは, トロンボスポンジン-1 (TSP-1) で, 細胞増殖と遊走能を亢進させた画分は, I 型コラーゲンであることがわかった.

まず, 本研究によって得られた, TSP-1 と扁平上皮癌の浸潤増殖に関する知見について記述する

TSP-1 は, 正常口腔粘膜 (図 1A) では TSP は殆ど発現がみられないのに対し, 扁平上皮癌周囲の間質 (図 1B) には, TSP-1 が高発現していた. この所見より癌間質の TSP-1 は上皮細胞ではなく主として間質細胞に由来することが示唆された.

Localization of thrombospondin 1 in normal oral mucosa (A) and oral squamous cell carcinoma (B)

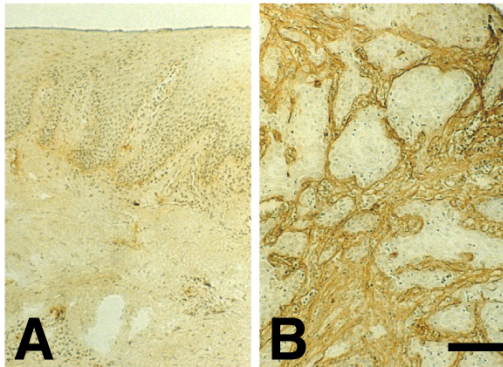


図 1

TSP-1 の細胞遊走活性部位を解析したところ, その N 末端付近に, 細胞接着部位があり細胞遊走能 (ハプトタキシス) を制御していた (図 2).

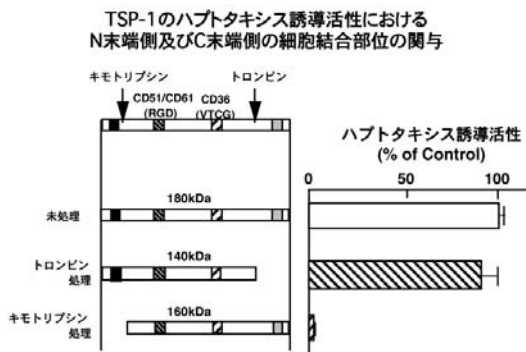


図 2

以上の結果より, 扁平上皮癌細胞自身は TSP 産生能を有しないが, 癌間質の線維芽細胞の TSP 産生を誘導することがわかった. 線維芽細胞によって産生された TSP-1 は癌間質に蓄積し, 扁平上皮癌細胞の細胞遊走を亢進させるとともにその蛋白分解活性を亢進させ口腔扁平上皮癌の浸潤を促進させていると考えられた.

次に, I 型コラーゲンによって誘導される扁平上皮癌細胞の増殖と運動能のシグナル伝達を解析し, 図 3 に示すように I 型コラーゲンによる口腔扁平上皮癌細胞の増殖促進には, MAP キナーゼシグナル伝達系の, 主として JNK1 を介する経路が, 一部には, MEK を介する経路が関与していることが明らかになった. さらに I 型コラーゲンが誘導する細胞運動は, JNK1 と Rho ファミリー G 蛋白の Rac1 とによって調節されていることが示された.

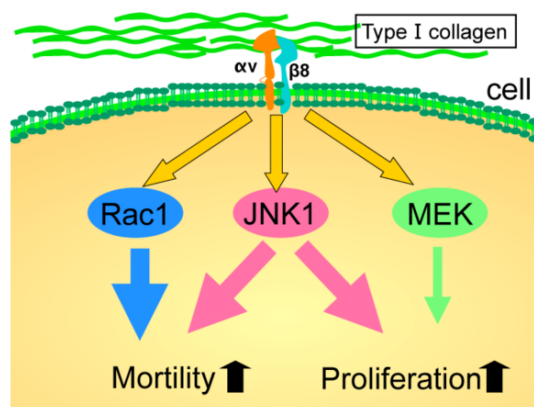


図 3

扁平上皮癌細胞のインテグリン αv 発現を抑制すると, 図 4 に示すようにコラーゲンゲル内でのコロニーは拡張したもの

(SCCKN, mock) から, 密な細胞集団からなる小さなコロニー (KNanti αv) に変化した.

Morphology of Colonies of SCCKN and antisense- αv Transfectants

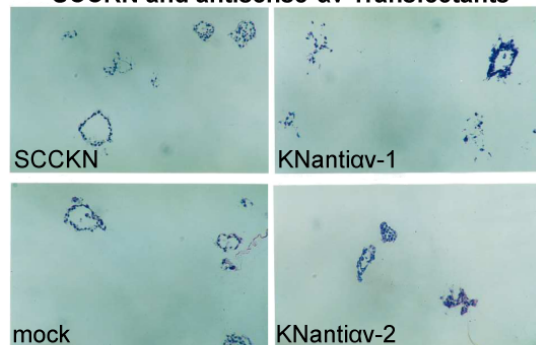


図 4

また, インテグリン αv 発現を抑制した扁平上皮癌細胞 (KNanti αv) は, *in vivo*での腫瘍増殖能も低下した (図 5).

Growth of Integrin antisense- αv Transfectants and SCCKN Cell in nude mice

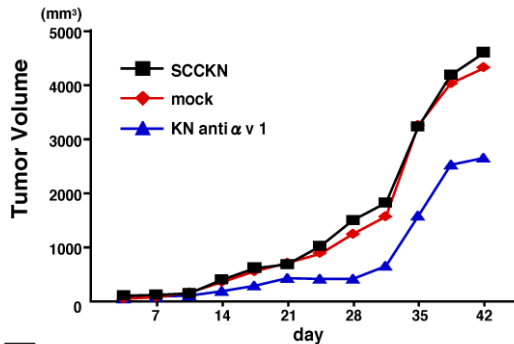


図5

$\beta 8$ 発現抑制によっても、扁平上皮癌細胞はコラーゲングルでのコロニーが、拡張したもの (control oligo) から、密な細胞集団

Effect of $\beta 8$ Antisense Oligo on Morphology of Oral SCC Cells Colonies Overexpressing $\beta 8$ in Type I Collagen Gel

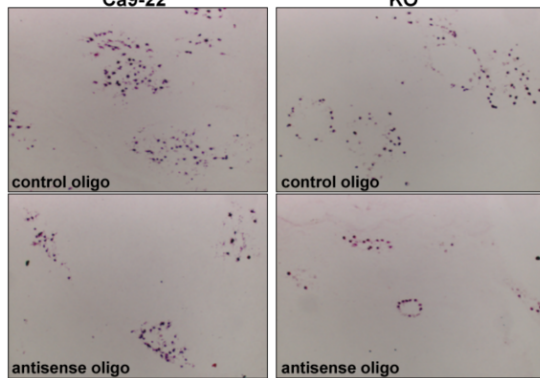


図6

からなる小さなコロニー (antisense oligo) に変化した (図6)

本研究から得られた知見によって、がんの浸潤・転移は、がん細胞自身の特性だけではなく、周囲の間質成分によっても制御されていることが明らかになった。

さらに、インテグリン $\alpha v \beta 8$ 発現を抑制することにより、MAPKシグナル伝達系やRhoファミリーG蛋白Rac1によって制御されている扁平上皮癌細胞の増殖や運動能が低下する可能性が考えられ、インテグリン $\alpha v \beta 8$ を標的とした口腔扁平上皮癌の分子標的治療が、口腔扁平上皮癌の有用な治療法のひとつとなり得る可能性が示唆された。

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)

1. Kusuda Furue M, Tateyama D, Kinehara M, Na J, Okamoto T, Sato JD., Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth

factor-defined serum-free medium, In Vitro Cell Dev Biol Anim., 査読有 46(7): 573-576, 2010

2. Matsumoto S, Fumoto K, Okamoto T, Kaibuchi K, Kikuchi A., Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. EMBO J. 査読有 29(7): 1192-1204. 2010
3. Zhumadilov K, Ivannikov A, Zharlyganova D, Zhumadilov Z, Stepanenko V, Apsaliev K, Ali MR, Zhumadilova A, Toyoda S, Endo S, Tanaka K, Okamoto T, Hoshi M., ESR dosimetry study on population of settlements nearby Ust-Kamenogorsk city, Kazakhstan. Radiat Environ Biophys., 査読有 48(4): 419-425, 2009

[学会発表] (計5件)

1. 浜名智昭, 林堂安貴, 福井康人, 白砂兼光, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌細胞におけるユビキチン・プロテアソーム系によるインテグリン $\beta 8$ の翻訳後修飾, 第48回日本口腔組織培養学会学術大会, 2011年11月19日, 浦安
2. 浜名智昭, 林堂安貴, 有田裕一, 白砂兼光, 岡本哲治, ユビキチンプロテアソーム系による口腔扁平上皮癌細胞のインテグリン $\beta 8$ の翻訳後修飾, 第56回(社)日本口腔外科学会総会, 2011年10月22日, 大阪
3. Tomoaki HAMANA, Yasutaka HAYASHIDO, Yasuto FUKUI, Kanemitsu SHIRASUNA, Tetsuji OKAMOTO, The processing integrin $\beta 8$ in oral squamous cell carcinoma cells by ubiquitin-proteasome system, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年8月9日, 名古屋
4. 浜名智昭, 林堂安貴, 有田裕一, 白砂兼光, 岡本哲治, 口腔扁平上皮癌細胞におけるユビキチン・プロテアソーム系によるインテグリン $\beta 8$ のプロセッシングについての解析, 第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2011年4月22日, 東京
5. 新谷智章, 林堂安貴, 藤井良典, 笛吹恵美子, 虎谷茂昭, 岡本哲治, 唾液中の heparin-binding protein 17 (HBp17) /FGF-binding protein (FGFBP) の同定, 第64回日本口腔科学会学術集会, 2010年6月25日, 札幌

[図書] (計1件)

1. 林堂安貴, 岡本哲治, 口腔外科学 第3版 (白砂兼光, 古郷幹彦編): 良性上皮性腫瘍, 良性非上皮性腫瘍(第7章口腔腫瘍), 医歯薬出版: 227-250, 2010

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林堂 安貴 (HAYASHIDO YASUTAKA)
広島大学・病院・講師
研究者番号：70243251

(2) 研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)
広島大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00169153

新谷 智章
広島大学・病院・助教
研究者番号：90403518

(3) 連携研究者

()

研究者番号：