

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 21 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592407

研究課題名（和文） クロライドチャネル関連分子 CLCA による細胞増殖・接着の制御

研究課題名（英文） The regulation of cell proliferation and adhesion by chloride channel related factor CLCA.

研究代表者

岡村 和彦 (OKAMURA KAZUHIKO)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00224056

研究成果の概要（和文）：ラットのクロライドチャネル関連分子 fCLCA は、スプライシングアイソフォーム trCLCA を持つが、この分子は他の動物種の CLCA 分子との関連性に乏しく、解明が進んでいない。基盤研究(C) 18592025 において、trCLCA の局在について主として in vivo での解析を行った。本研究では、それを受けて重層扁平上皮再構築モデルや培養細胞といった in vitro 系を併せて用いながら、trCLCA の機能に踏み込んだ解析を試みた。trCLCA 分子のタンパクレベルでの発現を siRNA により抑制することにより、サイトケラチンのプロファイルに変動が起こり、その結果細胞接着、増殖にも負の影響が起こることを示した。

研究成果の概要（英文）：A rat CLCA(originally named chloride channels, calcium-activated) homologue fCLCA has a splicing isoform trCLCA. Owing to the weak association of trCLCA to the other CLCA isoforms of other species, the morphological and functional significance of trCLCA has not been established. We have carried out the tissue localization of trCLCA in rat, with support of grants-in-aid for Scientific Research (C) 18592025. Subsequently, functional analyses of trCLCA was undertaken in this project, using in vitro system of reconstruction model of stratified squamous epithelium and several kinds of cultured cells. One of important result is: inhibition of trCLCA expression by siRNA bring out the change of cytokeratin profile, followed by negative regulation of cellular adhesion and proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：イオンチャネル、CLCA、細胞増殖、分化、癌の浸潤

1. 研究開始当初の背景

ラットにおいて Ca²⁺活性化 Cl⁻チャネル関連分子(CLCA 分子)について異なるサブライシング・パターンによる2つの isoforms、すなわち full length CLCA(fCLCA)および truncated CLCA(trCLCA)が存在する。CLCA はマウスやヒトを含む他の脊椎動物にも対応する分子が存在しているが、isoform の数や機能については、動物種ごとに異なる。

マウス CLCA1 や CLCA2 と相同性の高い fCLCA は予期されたように、Cl⁻イオン輸送への関与がみられることを、HEK293 細胞における強制発現および唾液腺において報告してきた。

ところが、trCLCA については、他種の動物の CLCA isoforms との相同性や近縁性の低い分子であるために、解明が進んでいない状況であった。

2. 研究の目的

種を超えた CLCA 分子ファミリーの中にあつて、alternative splicing によると強く推定される CLCA isoforms の存在は、現状ではラット CLCA 分子にユニークなものである。この特性に着目し、両 CLCA isoforms が正常(成体の諸上皮組織)状態、発生段階(正常状態へ至る過程)、発癌状態(正常状態からの乖離)において、いかなる動態を示すのかを解明することを目的とする。

また CLCA が局在する細胞・組織に存在する他のチャネル分子についても解析し、CLCA との直接・間接の相互関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) in vivo 系の解析

ラットの諸臓器における fCLCA および trCLCA の局在、p63 タンパク分子発現との相互関係、in vivo 解析

正常のラット(胎生16日から生後8週齢のSDラット)および病態モデルとしてI型および2型糖尿病モデルラットについて

- ① 唾液腺(顎下腺)、脾臓、肺、腎臓、回腸、胃、皮膚、口腔粘膜(舌)を深麻酔下で摘出後、すみやかに10%中性ホルマリンで固定した臓器を適法に従いパラフィン包埋した試料について、fCLCA および trCLCA に対するポリクロナール抗体を用い、Dextran Polymer 法にて免疫組織学的染色を行った。
- ② 上記諸組織について p63、p53、Ki-67、PCNA に対するモノクロナール抗体を用いて免疫組織学的染色、TUNEL 染色を行い、p63/p53 分子、細胞増殖、細胞周期調節因子、アポトーシスの動態をサーベイし、併せて fCLCA、trCLCA の動態と比較した。

(2) in vitro 系の解析

ラット皮膚・口腔粘膜組織からの重層扁平上皮再構築モデル、HSC3、HSC4 のヒト扁平上皮癌細胞株を用いて、両 CLCA、それ以外の陽イオンおよび陰イオンチャネルについて、(1)と同様の形態学的解析を行った。

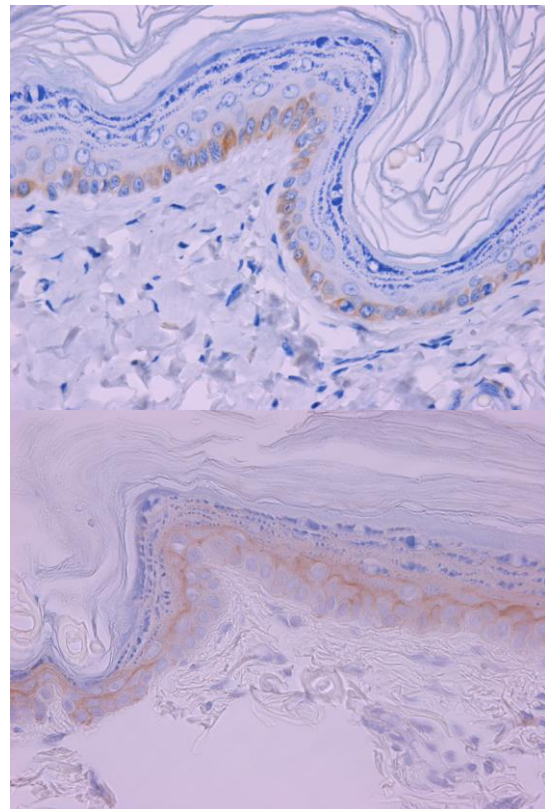
(3) 分子生物学的、電気生理学的検討

(1)(2)のサーベイにより意味のある挙動を示した因子について、チャネル分子については、電気生理学的、分子生物学的手法で、それ以外の因子については分子生物学的手法による解析を加えた。

具体的には、RT-PCR、ウェスタンブロッティング、ザイモグラフィ、細胞の浸潤試験、migration 試験を行った。

4. 研究成果

(1) ラットの正常粘膜および皮膚の重層扁平上皮層において、2つの CLCA subtypes の局在の検討を行ったところ、trCLCA は基底細胞層、fullCLCA はそれより上層の主として有棘細胞層にタンパク質レベルでの局在がみられた。



p63 の局在は、trCLCA とほぼ同様であったが、傍基底細胞層の細胞の陽性像を始め、trCLCA 陽性細胞より広い population の細胞に分布していた。

trCLCA(上) fCLCA (下) の局在(ラット皮膚)

Ki-67 および PCNA の局在は、p63 陽性細胞の分布とほぼ同様であった。

アポトーシス制御タンパク質である Bax、Bcl-2 について、Bax は有棘細胞層の下部から基底細胞層までの範囲に局在がみられた。これに対し、Bcl-2 は上皮内局在が見られなかった。

再生重層扁平上皮について同様の検討を行うと、trCLCA の局在が上皮の上層に拡がり、有棘細胞層の上層に達する phase もみられた。これに対し、正常上皮においてみられた fullCLCA の局在はほぼ完全に消失した。

再生上皮における Ki-67 および PCNA 陽性細胞は、正常組織より増加したが、陽性細胞の分布は上皮下層に局限していた。p63 陽性細胞の局在には、大きな変動はみられなかった。上皮層における Bax、Bcl-2 の局在は正常組織と同様であったが、再生過程にみられる炎症細胞（とくにリンパ球系）には Bcl-2 の局在がみられた。

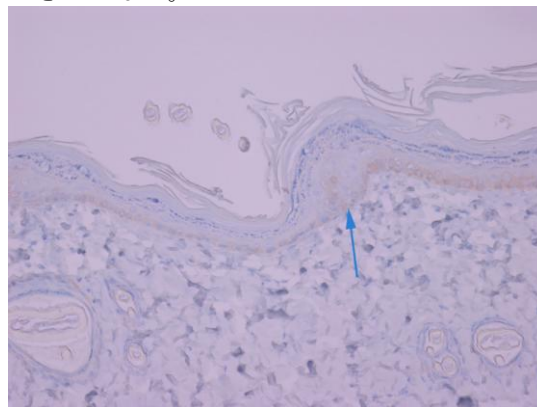
最長で air lift 後、7 日間維持できる *in vitro* での再構築モデルを完成させることができた。このモデルは、keratinocyte の平面的なシート状増殖→重層化→角化という重層扁平上皮の分化をほぼ忠実に再現でき、皮膚および口腔粘膜という異なる 2 組織において実現することができた。しかし、依然として、長期間維持することは、まだ実現できていない。

(2) trCLCA、fullCLCA、p63 の局在も *in vivo* の両組織とほぼ同等で、サイトケラチンのサブタイプ CK10、CK14 などを使ったケラチン・プロファイルも非常に *in vivo* の組織と近似した局在を示した。分化完了後の重層扁平上皮には、*in vivo*、*in vitro* の再構築モデルともに Ki-67 陽性像はほぼ皆無であったが、分化途上の再構築モデルでは、Ki-67 や mitosis により評価される細胞増殖能が比較的旺盛であった。

この再構築モデルやもっと単純な HEK293 細胞による trCLCA 強制発現系において siRNA による抑制実験を行った結果、trCLCA の発現抑制効果が得られた。さらに *in vivo* (ラット背部皮膚) において、siRNA による trCLCA の発現抑制を試みた。

(3) 数種類の軟膏製剤、electrophoresis、iontophoresis、上皮への直接注入など考えられる手段をすべて試した。いずれの方法も抑制効果は見られるものの、抑制効果の調節（抑制の程度、範囲、抑制効果の持続時間など）を術者の思いのままにコントロールできるほど満足な効果を得ることがこれまで

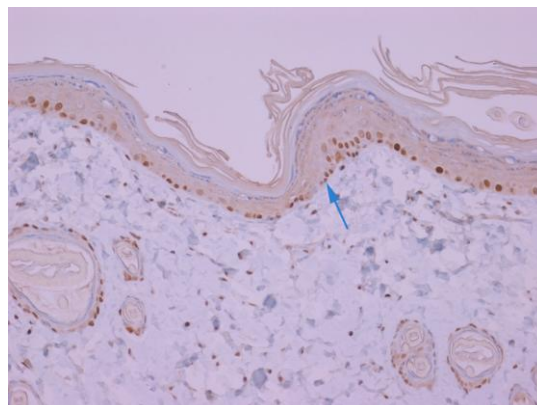
できていない。



trCLCA に対する siRNA による *in vivo* 抑制実験

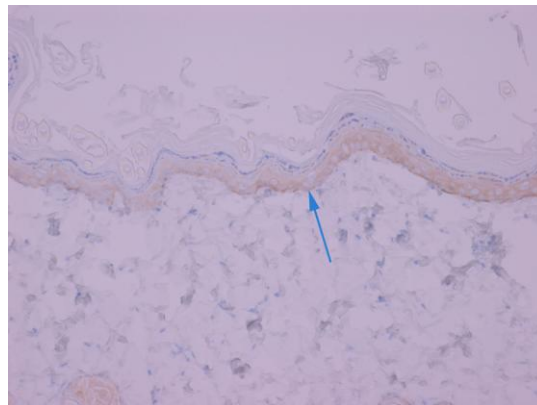
全般的に trCLCA 発現抑制がみられるが、とくに矢印より左の領域で発現が強く抑制されている。

PCNA 染色像。

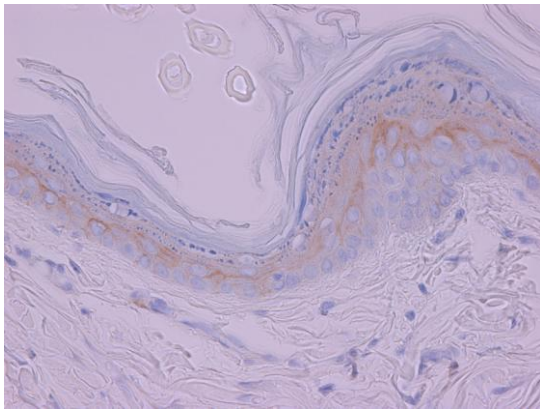


trCLCA シグナルの減弱ほどではないが、trCLCA が強く抑制されている領域では、PCNA 陽性率の低下がみられる。

CK14 染色像。



trCLCA 発現が強く抑制されている領域で、CK14 発現の低下がみられる。



fCLCA 染色像。
染色性に変化はみられない。

抑制効果の得られた重層扁平上皮組織においては、隣接する抑制効果のみられない組織あるいは陰性コントロール組織と比較して、CK10, CK14 を始めとするケラチンタンパクのプロファイル、PCNA で評価した細胞活性（増殖能と正の相関がある）、接着因子の発現に変動がみられた。Δp63, p63, EGFR など他に検討を行った重層扁平上皮の幹細胞を絞り込むために利用されているマーカーや成長因子については、顕著な差異はみられていない。

(4) CLCA 局在組織におけるイオンチャネルの解析

①糖尿病モデル動物における maxi-K チャネルの 2 つのスプライシングバリエーション parSlo と mSlo の発現量や発現比が、糖尿病動物では、正常コントロール動物と比較して変動し、それが唾液のイオン組成に影響を与え、カリウムイオン濃度が有意に高値になることを報告した。

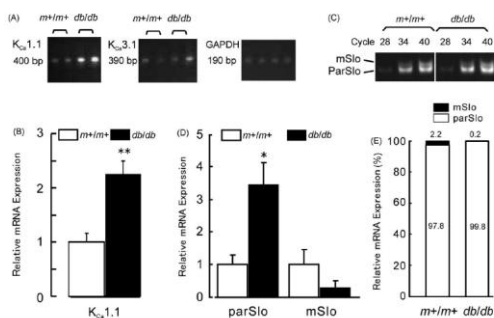


Fig. 4 - mRNA expressions of $K_{c1.1}$ and its isoforms (ParSlo and mSlo) in db/db and m+/m+ mice. (A) typical RT-PCR results obtained using mouse SMG cDNA with specific primer pairs for $K_{c1.1}$, $K_{c1.1}$ isoforms, and GAPDH. Enhanced expression of $K_{c1.1}$ cDNA was obtained consistently in db/db mice. (B) cycle number-dependent PCR amplification of cDNA for ParSlo and mSlo. A primer pair was designed to amplify both ParSlo (78 bp) and mSlo (107 bp). Polycrylamide (5%) gel was used. (C and D) quantitative real-time PCR measurements of $K_{c1.1}$, ParSlo, and mSlo mRNA in SMG (N = 4 animals per group). The expression values were calculated by the $\Delta\Delta C_T$ method (B) and relative standard curve method (D), and normalized to the corresponding value obtained for m+/m+ mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. m+/m+ (Student's t -test). (E) expression ratio of parSlo mRNA relative to both of the isoforms in db/db and m+/m+ mice. Note that parSlo was the predominant isoform in either strain.

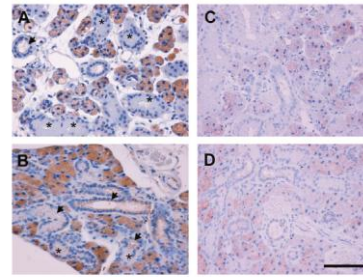


Fig. 5 - Immunostaining (A-D) of SMG from m+/m+ (A, C) and db/db (B and D) mice. Primary antibody in A and B, PA1-923; primary antibody in C and D, APC-021 [see Fig. 1]. All maxi-K channels are recognized in A and B, while mSlo is the main isoform recognized in C and D. Note that luminal lining of ductal cells is immunostained by the maxi-K antibody (arrows) and that the immunopositive signal is not evident in GCT cells (?). Acinar cells also shows immunopositive signals with the maxi-K antibody. Bar, 50 μ m.

Arch. Oral Biol. 55(11): 848-854, 2010.
より引用

② ヒト扁平上皮癌株 HSC3, HSC4 における TRP チャネルの解析

両細胞株とも M8, V1, V3, V6, A1 の TRP チャネルを持ち、その中でメンソールや 26°C 以下の低温刺激で活性化される TRPM8 チャネルの活性化は、gelatin zymography で確認した MMP9 の産生量を挙げ、in vitro における癌細胞浸潤試験でも有意に浸潤性を高めることを報告した。

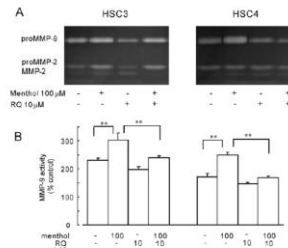


Figure 9 Gelatin zymography. Conditioned medium was collected from HSC3 and HSC4 cells treated at 37°C for 24 h with menthol, RO, a combination of the two, or vehicle. Panels show representative images (A) and summarized data (B). For the densitometric analysis of MMP-9 activity, each value is expressed as a percentage of the control value obtained in the absence of EGF. * $P < 0.01$.

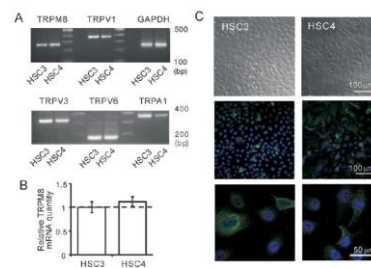


Figure 1 RT-PCR and immunofluorescence results. (A) mRNA expressions for TRP channels as detected by RT-PCR. (B) Quantity of TRPM8 mRNA, as measured using real-time PCR procedure. Mean \pm SD values with their ranges (n=3) are shown. (C) Subcellular localizations of TRPM8, as detected by a selective antibody. Top, differential interference contrast (DIC) images; middle and bottom, fluorescence images (TRPM8, green; nucleus, blue).

Int J Oncol 40(5): 1431-1440, 2012 より引用。

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 2 件)

① Okamoto Y, Ohkubo T, Ikebe T, Yamazaki J, Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines, Int J Oncol.、査読有、Vol.40、No.5、2012、pp.1431-1440

② Okamura K, Kato K, Uchida R, Ohkubo T, Taniguchi K, Yamazaki J, Specific expression of salivary maxi-K channel variant is augmented in diabetic mice, Arch. Oral Biol.、査読有、Vol.55、No.11、2010、pp.848-854

[学会発表] (計 5 件)

① Yamazaki J, Okamura K, Murakami H, Hata S et al.、CLCA isoforms and structural proteins differentially expressed in a re-constitution model derived from rat skin、The Japanese Pharmacological Society、March 14, 2012、Kyoto, Japan

② Hata S, Okamura K, Ishikawa H, Yamazaki J、Transformation from fibroblast to myofibroblast is regulated by TGF β and mechanical tension in a rat skin reconstruction model、The Japanese Pharmacological Society、March 14, 2012、Kyoto, Japan

③ Okamoto Y, Ohkubo T, Okamura K, Ikebe T, Yamazaki J、Activation of TRPM8 channels augments invasive potential of oral carcinoma cell lines、The Japanese Pharmacological Society、March 15, 2012、Kyoto, Japan

④ Murakami H, Okamura K, Sakagami R, Yamazaki J、Expression of caspase-14 in stratified and cornified epithelium in a rat oral mucosal reconstruction model、The Japanese Pharmacological Society、March 16, 2012、Kyoto, Japan

⑤ Yamazaki J, Okamura K, Murakami H, Hata S, Ohkubo T, Aoki S、Expression of different CLCA isoforms by regenerated stratified keratinocytes in a rat skin reconstruction model、The Japanese Pharmacological Society、March 22-24, 2011、Yokohama, Japan

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 和彦 (OKAMURA KAZUHIKO)
福岡歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：00224056

(2) 研究分担者

山崎 純 (YAMAZAKI JUN)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50230397

(3) 連携研究者 無し ()

研究者番号：