

機関番号：34519

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890287

研究課題名（和文）舌正常ケラチノサイト不死化細胞を用いた口腔発癌モデルの作製

研究課題名（英文）Carcinogenesis caused by tobacco and alcohol for human tongue keratinocytes (HTK) cell line

研究代表者 瀬川 英美 (SEGAWA EMI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00553778

研究成果の概要（和文）：われわれはヒト正常舌角化細胞に HPV 16 型の E6 および E7 遺伝子を導入することにより「不死化」に成功した。さらに、この不死化細胞（HTK1-16E6E7）にタバコ特異的ニトロサミンである NNK とエタノールを作用させ、高カルシウム培地に適した細胞（HTK1-16E6E7-NNK+EtOH）を樹立した。そこで、NNK およびエタノールにより不死化細胞が獲得した細胞生物学的変化を解析し、従来の頭頸部扁平上皮癌の責任遺伝子として報告された結果と照らし合わせ、口腔発癌における責任遺伝子の同定を行った。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the carcinogenesis process, we newly established human tongue keratinocytes (HTK) cell lines derived from tongue mucosa immortalized by infection with retroviral vectors expression HPV16 E6/E7. Furthermore, treatment of HPV16 E6/E7 with NNK and EtOH in vitro, and HTK1-16E6E7-NNK + EtOH was established. Then we examined a change of the cell biology in both cells and identified the responsibility gene in the carcinogenesis in oral squamous cell carcinoma.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 980,000 | 294,000 | 1,274,000 |
| 2010 年度 | 890,000 | 267,000 | 1,157,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,870,000 | 561,000 | 2,431,000 |

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：口腔癌、HPV、発癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 生活習慣、特に喫煙と飲酒の両方の習慣

が消化器上部の癌を相乗的に引き起こすことが知られており、疫学的にも口腔がんの発生リスクを有意に上昇させている。

(2)近年、口腔癌では子宮頸癌と同様にハイリスク型のヒトパピローマウイルス (HPV) の関与が示唆されている。

2. 研究の目的

(1)ヒト正常舌角化細胞に HPV16 型の E6 および E7 遺伝子を導入することにより「不死化」に成功した。さらに、この不死化細胞 (HTK1-16E6E7) にタバコ特異的ニトロサミンである NNK とエタノールを *in vitro* で作用させ、高 Ca 培地と FBS に適した細胞 (HTK1-16E6E7-NNK+EtOH) を樹立した。そこで、NNK およびエタノールにより不死化細胞が獲得した細胞生物学的変化を解析し、口腔発癌における責任遺伝子の同定を行う。

(2) (1)において同定された責任遺伝子の口腔癌における機能について検討を行う。

3. 研究の方法

(1)HTK1-16E6E7-NNK+EtOH およびコントロールである HTK1-16E6E7 における細胞の生物学的変化を cDNA マイクロアレイによって解析し、得られた結果を従来の頭頸部扁平上皮癌の責任遺伝子として報告されている結果と照らし合わせ、口腔発癌における責任遺伝子の同定を行う。

(2) (1)の結果をもとに、計 8 種類の口腔扁平上皮癌由来細胞株を使用し、各細胞における責任遺伝子の発現を western blot 法にて検討する。

4. 研究成果

(1) HTK1-16E6E7-NNK+EtOH はコントロールである HTK1-16E6E7 と比較すると、細胞の形

態が多角形から紡錘形へと変化することが確認された。

(2)cDNA マイクロアレイによる解析で、HTK1-16E6E7-NNK+EtOH はコントロールである HTK1-16E6E7 と比較するとアクチン調節関連タンパク質である Zyxin の発現上昇が確認された。

(3)Zyxin は細胞の形態変化との関与が示唆されており、最近では、Zyxin と上皮間葉転換 (EMT) との関与についての報告も認められる。そこで、上記 2 種類の細胞を使用して EMT marker の発現を検討したところ、HTK1-16E6E7 では上皮系マーカーである E-cadherin の発現上昇が認められ、間葉系マーカーである N-cadherin, Vimentin の発現が認められなかったのに対して、HTK1-16E6E7-NNK+EtOH では E-cadherin の発現消失とともに、N-cadherin, Vimentin の発現上昇が認められた (図 1)。

(4)口腔発癌過程における Zyxin の発現上昇および EMT の関与が示唆された。

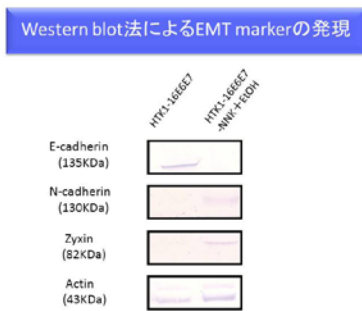
(5)浸潤様式の異なる口腔扁平上皮癌由来細胞株を Y-K 分類に従って以下の様に分類し、8 種類の口腔扁平上皮癌細胞株の Zyxin の発現を western blot 法にて検討したところ Y-K 分類の浸潤様式において 3 型, 4C 型, 4D 型の順に発現の上昇が認められ、4D 型が最も高発現であった。また E-cadherin の発現は 3 型, 4C 型では認められたが 4D 型では認められなかった。さらに N-cadherin の発現は 4D 型に移行するにつれて上昇が認められた (図 2)。

口腔扁平上皮癌細胞株; SCCKN, HSC-2,

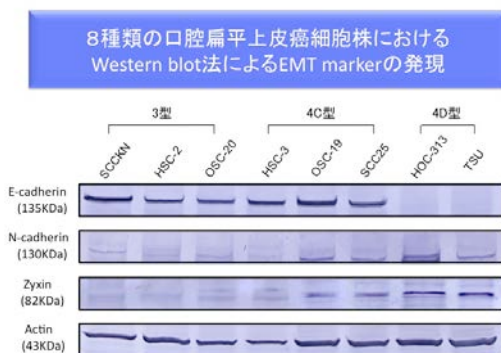
OSC-20 (3 型), HSC-3, SCC25, OSC-19 (4C 型), HOC-313, TSU (4D 型)

(6) Zyxin 高発現である HOC313 に siZyxin を導入したところ紡錘形から多角形へと細胞の形態変化が確認された (図 3)。さらに, HOC313 に siZyxin を導入することにより細胞の増殖能 (図 4)、運動能 (図 5) および浸潤能 (図 6) の抑制が認められた。

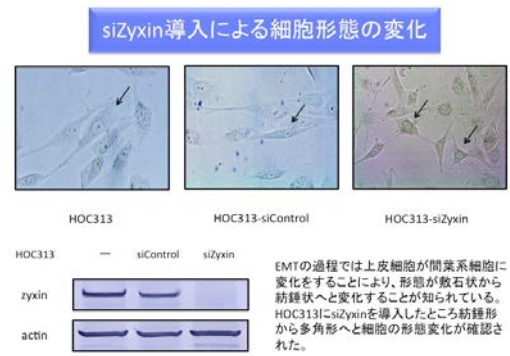
(図 1)



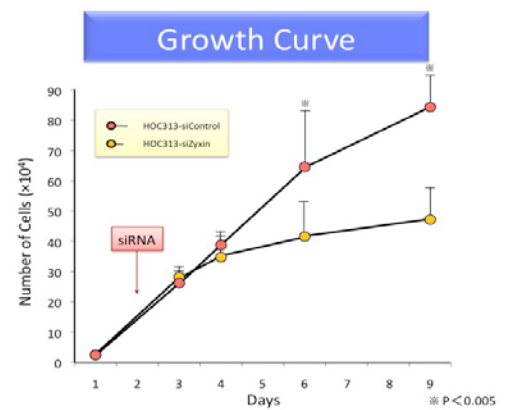
(図 2)



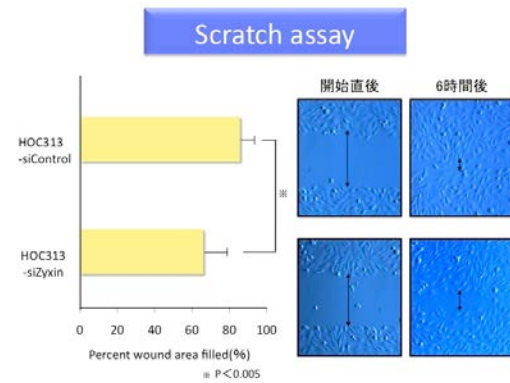
(図 3)



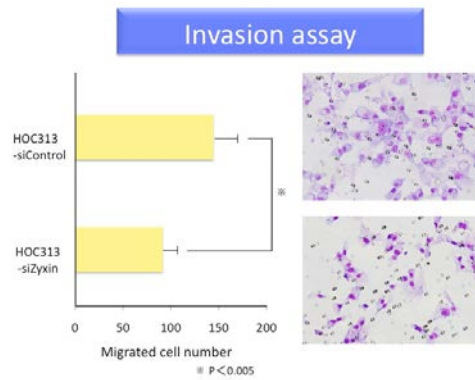
(図 4)



(図 5)



(図6)



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)

[学会発表] (計1件)

- ① 瀬川英美 口腔癌細胞における EMT marker としての Zyxin の発現 (第 55 日本口腔外科学会総会・学術大会; 2010 年 10 月 18 日: 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川 英美 (SEGAWA EMI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00553778