

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 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592103

研究課題名（和文） MALT1 による NFκB 転写抑制機構と口腔癌細胞表現型への作用の解析

研究課題名（英文） Inhibition of NFκB activity by MALT1 and its involvement in phenotypic alterations of oral carcinoma cells

研究代表者

今井 一志（IMAI KAZUSHI）

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：10328859

研究成果の概要（和文）：本研究では、予後不良な口腔癌で発現を停止する mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) の機能と癌細胞の表現型に与える影響について主にマイクロアレイ法とプロテオーム解析法で検討した。その結果、MALT1 は TGF-β/EGF シグナルに働く遺伝子と高度悪性型の癌細胞に特徴的なケラチンの発現抑制とともに、癌細胞の増殖能と遊走能を低下させることが明らかになった。また、MALT1 により抑制される E-カドヘリン依存性癌細胞間結合も口腔癌の進展とともに著しく障害されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The present study examined a role of mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1), whose expression is inactivated in oral carcinomas with worse prognosis, in oral carcinoma cells and its involvement in phenotypic alteration of the cells by the microarray and proteomic analyses. MALT1 down-regulated expression of genes in the TGF-β and EGF pathways, alternated keratin species involved in aggressive feature of carcinoma cells, and suppressed proliferation and migration of the cells. Furthermore, E-cadherin-mediated carcinoma cell-cell adhesion machinery, which was also strongly down-regulated by MALT1, was rapidly obstructed with progression of oral carcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔癌、MALT1

1. 研究開始当初の背景

(1) MALT1 はリンパ球系細胞において抗原受容体の下流で NFκB に働くシグナル伝達分子として知られている。NFκB は口腔癌の進展を著しく促進させることから、MALT1 発現の有無とその働きを解析するこ

とが、口腔癌進展の分子機構を明らかにする上で重要な課題であると予想できる。

(2) MALT1 特異抗体を作製し、免疫組織染色を行ったところ、正常な口腔上皮細胞の核に局在し、予後不良な高度悪性型口腔癌で

はその発現を停止した。また、発現停止の原因は MALT1 遺伝子プロモーターのメチル化によることが明となった。

2. 研究の目的

(1) 癌細胞における発現の停止にはエピジェネティックな原因とジェネティックな原因が考えられる。プロモーターのメチル化によるエピジェネティックな変化が発現停止の一因であることは既に明らかにしているが、ジェネティックな原因が認められた場合には、発癌過程ではなく、癌の進展過程に生じる遺伝子変異の存在を意味する。

(2) 核内に局在する MALT1 の機能と細胞表現型に対する作用は全く不明である。そのため、MALT1 の有無によって発現を変化させる遺伝子を網羅的に同定し、癌細胞の形質に与える影響を予測・証明することが必要となる。

(3) 遺伝子レベルでの変化とともに、細胞表現型に対する作用を明らかにするためには、発現を変動する分子をタンパク質レベルで証明することが大きな意味をもつ。

(4) 予後不良な口腔癌では E-カドヘリンを介した細胞間接着の破綻が大きく関係する。MALT1 によって発現を変動させる E-カドヘリンやその関連分子の発現、および N-カドヘリンへのカドヘリンスイッチと口腔癌進展との関わりについては不明な点が多く残っている。

3. 研究の方法

(1) 様々なレベルで MALT1 を発現する日本人由来の口腔癌細胞株と初代培養した正常歯肉線維芽細胞の MALT1 遺伝子コード領域の変異の有無について PCR-SSCP 法でスクリーニングし、増幅断片塩基配列の解読により変異の有無を解析した。

(2) 内在性 MALT1 をほとんど発現しない HSC2 細胞と MALT1 を恒常的に発現させた HSC2 細胞に発現する mRNA をマイクロアレイ法で比較した。発現量に有意差を認めた遺伝子の機能を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) で検索した。また、細胞運動能の変化を xCELLigence と time lapse 顕微鏡を用いてリアルタイム解析した。

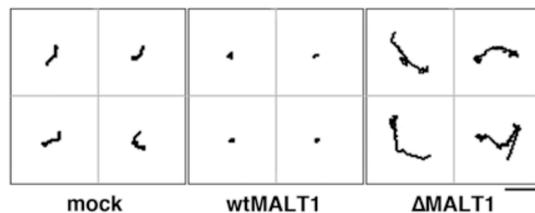
(3) 上記の細胞に発現するタンパク質を SDS-PAGE で分離し、発現量に差を認めたバンドについて質量分析 (MALDI-TOF MS) を行った。また、細胞の増殖能の変化を xCELLigence でリアルタイム解析した。

(4) 口腔癌組織における E-カドヘリン、N-カドヘリン、p120 カテニンおよび β カテニンの発現を免疫組織染色で調べ、口腔癌進展との関連を統計学的に解析した。

4. 研究成果

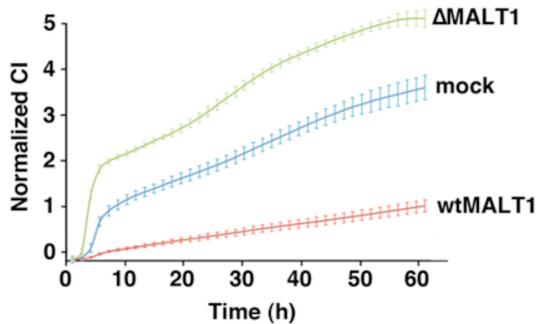
(1) MALT1 コード領域にあるエクソンの塩基配列をデータベースと比較したところ、すべての癌細胞で 2 カ所に変異がみられ、そのうちの 1 つはミスセンス変異であった。しかし、これらは正常線維芽細胞にもみられたことから、日本人に共通する一塩基多型である可能性が高い。他にもイントロンの 6 カ所に同様の変化がみられた。従って、口腔癌における MALT1 発現停止にはジェネティックな原因が関与する可能性は低いと考えられる。

(2) MALT1 により発現が上昇した 1,433 遺伝子種と低下した 1,500 遺伝子種を同定した。これらを IPA 解析したところ、TGF- β シグナルと EGF シグナルに関わる遺伝子群の多くが発現低下していた。NF κ B シグナル系の遺伝子群の発現には明らかな違いを認めなかった。細胞形質については細胞遊走を低下させると予想された。そこで、両細胞の遊走能を創傷治癒アッセイと time lapse 顕微鏡でリアルタイム解析した。野生型 MALT1 発現細胞は創傷治癒と遊走能 ($0.21 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{h}$) を著しく低下させ、ドミナントネガティブ型 MALT1 を発現させた場合には有意に上昇した ($3.06 \pm 0.60 \mu\text{m}/\text{h}$; 図 1)。MALT1 は口腔癌の進展に働く TGF- β /EGF シグナル系と癌細胞の増殖能を抑えることで、癌の進展を抑制すると考えられる。

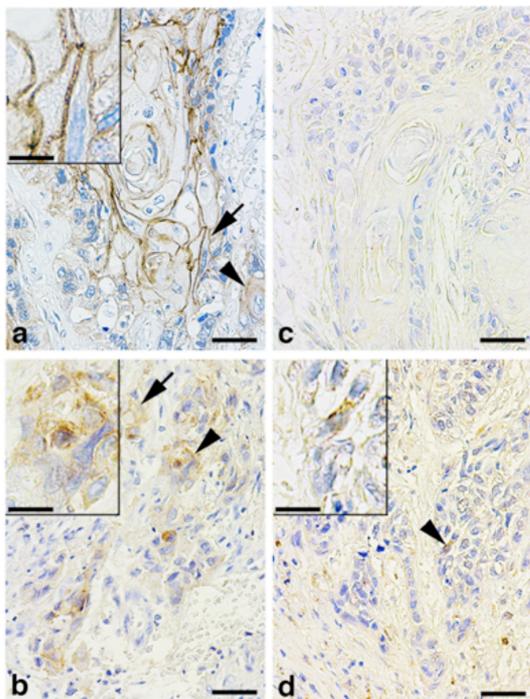


(3) 両細胞に発現する総タンパク質を一次元電気泳動法で分離・比較し、発現の異なるバンドを質量分析した。その結果、10 種類のタンパク質が同定された。その内の 4 種がケラチンであった。MALT1 により K8 と K18 の発現量が上昇し、K5 と K14 が低下した。これらの増減は MALT1 依存性であることが確認された。K5 と K14 は上皮系癌の進展と癌細胞の増殖に深く関連することから、MALT1 の癌細胞増殖能に対する影響をリアルタイム解析した。野生型 MALT1 の発現により癌細胞は増殖を 0.52 倍に低下させたのに対して、ドミナントネガティブ型 MALT1 は 1.33 倍上昇した。この増殖促進には MALT1 依存性のサイクリン

D1 の発現誘導を伴うことが明らかとなった (図 2)。MALT1 の発現動態は癌細胞の細胞骨格の構成に強い影響を与え、MALT1 の発現停止は口腔癌細胞の増殖能を亢進させて、癌の進展に寄与すると予想される。



(4) 先のマイクロアレイの結果から、MALT1 は E-カドヘリンを中心とする上皮系細胞間接着分子の遺伝子群を発現低下させ、間葉系細胞型の N-カドヘリン遺伝子の発現を上昇させると予想された。E-カドヘリンから N-カドヘリンへの発現転換はカドヘリンスイッチと呼ばれ、上皮系癌の進展を強く促進すると考えられている。しかし、口腔癌におけるカドヘリンスイッチの有無およびカドヘリン関連分子の発現動態には不明な点が多く残っている。そこで、口腔癌組織におけるこれらの発現を免疫染色で調べた。E-カドヘリン (図 3 a, b) と関連分子 (p120 カテニン、 β カテニン) の発現は癌の脱分化と浸潤性亢進とともに低下した。しかし、N-カドヘリンの発現はみられなかったことから (図 3 c, d)、



口腔癌においてカドヘリンスイッチは病態の進展に関与していないと予想された。

(5) 上記の研究結果から MALT1 の発現停止にともなって、口腔癌細胞は TGF- β /EGF シグナル系に働く遺伝子群の発現を上昇させ、遊走能と増殖能を著しく亢進することが明らかとなった。MALT1 は腫瘍抑制因子として働き、その発現停止が口腔癌の進展に大きな役割を果たしていると考えられる。

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 6 件)

- ① Sasaya K, Sudo H, Maeda G, Kawashiri S, Imai K. Concomitant loss of p120-catenin and β -catenin membrane expression and oral carcinoma progression with E-cadherin reduction. PLoS One, in press. 査読あり
URL:
<http://www.plosone.org/home.action>
- ② Kawamoto Y, Ohyama Y, Chiaba T, Yagishita H, Sakashita H, Imai K. Proteomic identification of keratin alterations with enhanced proliferation of oral carcinoma cells by loss of mucosa-associated lymphoid tissue 1 expression. Int J Oncol, in press. 査読あり
URL:
<http://www.spandidos-publications.com/ijo/>
- ③ Ohyama Y, Kawamoto Y, Chiba T, Maeda G, Sakashita H, Imai K. Inhibition of TGF- β and EGF pathway gene expression and migration of oral carcinoma cells by mucosa-associated lymphoid tissue 1. Br J Cancer, in press. 査読あり
DOI: 10.1038/bjc2013.307
- ④ Oyama G, Midorikawa T, Matsumoto Y, Takeyama M, Yamada K, Nozawa T, Morikawa M, Imai K. Single nucleotide polymorphisms of *mucosa-associated lymphoid tissue 1* in oral carcinoma cells and fibroblasts. Odontology, in press. 査読あり
DOI: 10.1007/s10266-12-0079-9
- ⑤ 今井一志、須藤遥、前田元太、千葉忠成 口腔癌進展のメカニズムと分子標的薬 歯学 100: 177-181, 2013 査読なし
- ⑥ Hashimoto T, Soeno Y, Maeda G, Taya Y, Aoba T, Nasu M, Kawashiri S, Imai K. Progression of oral squamous cell carcinoma accompanied with reduced

E-cadherin expression but not cadherin switch. PLoS One 7: e47899, 2012 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0047899

[学会発表] (計6件)

- ① Kawamoto H, Ohyama Y, Chiba T, Yagishita H, Sakashita H, Imai K. MALT1-responsive keratin rearrangement and proliferation of oral carcinoma cells. IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition, March 20-23, 2013, Seattle, WA, USA
- ② Ohyama Y, Kawamoto H, Chiba T, Maeda G, Sakashita H, Imai K. Profiling and network analysis of MALT1-responsive gene datasets in SCC. IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition, March 20-23, 2013, Seattle, WA, USA
- ③ 橋本孝志、添野雄一、田谷雄二、青葉孝昭、那須優則、前田元太、須藤遥、千葉忠成、今井一志 口腔癌の進展にはカドヘリンスイッチではなく、E-カドヘリンの発現低下が関連する 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会 平成24年9月15日 郡山市
- ④ 笹谷和伸、前田元太、須藤遥、千葉忠成、今井一志 口腔癌における p120 カテニンと β カテニン発現の免疫組織学的解析 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会 平成24年9月15日 郡山市
- ⑤ 川本幸寛、大山嘉人、千葉忠成、坂下英明、今井一志 口腔扁平上皮癌細胞における MALT1 誘導タンパク質のプロテオーム解析 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会 平成23年10月1-2日 岐阜市
- ⑥ Soeno Y, Shirako Y, Fujita K, Taya Y, Shimazu Y, Nakau K, Sato K, Chiba T, Imai K, Aoba T. Progression/metastasis of xenografted oral cancer cell-lines in mouse tongue. 41st Annual Meeting & Exhibition of the AADR, March 21-24, 2012, Tampa, FL, USA

[図書] (計1件)

- ① Imai K, Maeda G, Chiba T. Chapter 7: Cadherin expression and progression of squamous cell carcinomas of the oral cavity. *In Squamous Cell Carcinoma*, Li X, ed. pp121-136, Intech, Rijeka, Croatia, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 一志 (IMAI KAZUSHI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号: 10328859

(2) 研究分担者

千葉 忠成 (CHIBA TADASHIGE)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号: 60350138

森川 倡子 (MORIKAWA MASAKO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号: 80095265

(H22→H23)