

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792115

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌の浸潤における HPIP タンパク質の役割の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of HPIP in invasion of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

山本 剛（YAMAMOTO GOU）

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：80384189

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平上皮癌には明確な浸潤を示すものや初期浸潤の段階のもの、癌化はしているが浸潤しないもの等さまざまな形態が存在する。病理組織診断において切片上から癌の浸潤を判断するのに困難なケースは少なくない。我々は近年開発された質量解析による微量検体からの網羅的タンパク質解析法により HPIP タンパク質を同定し、HPIP が癌の浸潤を評価する有効なマーカーである可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Oral squamous cell carcinoma indicates various phenotypes; obvious invasion, early invasion and no invasive carcinoma. In pathological diagnosis, we often face a case with difficult judgment of invasion of cancer. We identified HPIP as a marker of cancer invasion by new LC/MS/MS method. Our study suggest that HPIP was a useful marker for evaluate of cancer invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、形態系基礎歯科学

キーワード：口腔扁平上皮癌、浸潤、LC/MS/MS、HPIP（PBXIP1）

## 1. 研究開始当初の背景

（1）口腔扁平上皮癌における浸潤マーカーについて

口腔扁平上皮癌の浸潤については現在まで多くの研究がなされてきており、近年の文献でも WNT- $\beta$  Catenin シグナル伝達や Programmed Cell Death 4 などとの関連が報告されている（*Int J Oncol.* 2010 Nov;37(5):1095-103、*Mol Cancer.* 2010 Sep 10;9:238.）。しかし、病理診断では、未だに浸潤癌かどうか判断が困難なケースが少なくない。古くからケラチン13が口腔扁平上皮癌で発現が減少する事、逆にケラチン17が増加する事が知られているが（*Oral Dis.* 2009 Jan;15(1):111-7、*Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1991;418(3):249-54.）、浸潤メカニズムとの

関連は不明な点が多い。癌細胞の「浸潤」という現象をよりクリアーに解明する事は口腔扁平上皮癌の診断・治療において重要な課題となっている。

（2）質量解析を用いたマーカータンパク質の同定手法について

近年、LC（液体クロマトグラフィー）による分離精度、質量解析の感度が飛躍的に上昇した。現在では、組織切片からレーザーマイクロダイセクション法を用いて回収された微量な組織を解析することにより、標的組織中に含まれているタンパク質を網羅的に解析することが可能となり、新しい癌関連タンパク質が報告されている（*Mol Cell Proteomics.* 2005 Nov;4(11):1741-53、*Biotechniques.* 2005 Jun;Suppl:32-5）。現段階では、大腸癌、肺癌などが主であるが、近

年になって口腔扁平上皮癌でも報告され (*Cancer Sci.* 2009 Sep;100(9):1605-11.) 新しい手法として注目されている。我々もこの手法に注目し、第101回アメリカ癌学会での発表や第42回臨床分子形態学会でのワークショップを行い、糖尿病性網膜症の解析 (*Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Aug 20;399(2):221-6.) にも効果的に使用している。

(3) 申請者らは初期浸潤癌において高い発現量を示しているタンパク質 HPIP を見出した。

我々は、典型的な扁平上皮癌、疣贅性癌、初期浸潤癌の組織切片

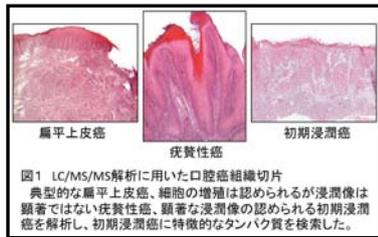


図1 LC/MS/MS解析に用いた口腔癌組織切片  
典型的な扁平上皮癌、細胞の増殖は認められるが浸潤像は顕著ではない疣贅性癌、顕著な浸潤像の認められる初期浸潤癌を解析し、初期浸潤癌に特徴的なタンパク質を検索した。

からレーザーマイクロダイセクションを用いて標的細胞を回収し、LC/MS/MSによる網羅的タンパク質発現解析を行った。酵母由来のエノラーゼを内部標準として fmol 単位で相対定量を行った結果、3種類の全ての癌でケラチン13の発現減少、ケラチン17の発現増加が認められた。さらに初期浸潤癌において HPIP タンパク質の発現が著明に増加している事が明らかとなった (表1)。

HPIP は Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 と呼ばれ、ホメオドメイン

	ケラチン13	ケラチン17	HPIP
正常粘膜上皮	596.45	5.86	ND
正常粘膜上皮	597.23	3.01	ND
扁平上皮癌	ND	121.7	ND
疣贅性癌	13.45	62.22	ND
初期浸潤癌	21.48	315.46	35.22

ND: not detectable (検出感度以下) 表示単位: fmol

表1 質量解析を用いた扁平上皮癌のタンパク質解析  
文献的に明らかになっている通り、ケラチン13は扁平上皮癌で減少しケラチン17は増加していた。HPIPは初期浸潤癌のみで検出された。

タンパク質である PBX ファミリーが PBX-HOX 複合体を形成して DNA に結合するのを阻害する事が分かっている (*J Biol Chem.* 2004 Apr 16;279(16):16263-71.)。PBX-HOX 複合体は骨髄系細胞の分化に関連し、白血病の発生にも関わっている事が知られており、転写因子という性質からも inhibitor としての HPIP は興味深い因子と考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) HPIP の口腔扁平上皮癌診断マーカーとしての有効性と局在の解明

蛍光抗体法を用いて、HPIP の異型上皮、口腔扁平上皮癌における局在、HPIP が bind しその機能を阻害すると考えられている PBX ファミリーとの co-localization をさらに詳細

に明らかにする。また、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、各病変の細胞、特に扁平上皮癌では病変中心部と浸潤先端部に分けて回収を行い、リアルタイム PCR 法によって遺伝子レベルでの HPIP 発現を解析する。

(2) 正常粘膜上皮、口腔扁平上皮癌培養細胞を用いた HPIP の機能の解明

口腔扁平上皮癌培養細胞株に HPIP を高発現させ、ヌードマウスへの移植実験等を用いて増殖能・浸潤能を解析する。さらに正常粘膜上皮培養細胞株でも HPIP を高発現させて仮説を検証する。それぞれの細胞はマイクロアレイを用いて HPIP によって制御されている可能性のある遺伝子を網羅的に解析する。

(3) HPIP と bind する新たなタンパク質の解明

HPIP は estrogen receptor  $\alpha$  と bind しそのシグナル伝達を制御する事が報告されている (*Biochim Biophys Acta.* 2008 Jun;1783(6):1220-8.)。しかし HPIP の機能や bind するタンパク質についてはほとんど明らかになっていない。そこで HPIP 抗体を用いて免疫沈降を行い、それを LC/MS/MS 解析することによって HPIP と bind する新たなタンパク質を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) レザーマイクロダイセクション

口腔扁平上皮癌の凍結組織切片からレーザーマイクロダイセクション法を用いて標的細胞の回収を行った。回収した細胞から RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出、SSVILO RT MasterMix (INVITROGEN) を用いて cDNA の合成を行った。

(2) リアルタイム PCR

合成した cDNA と Taqman HPIP プライマーを用いて ABI7500 でリアルタイム PCR を行った。内源性コントロールには GAPDH を用い、 $\Delta\Delta CT$  法により発現量を解析した。

(3) 免疫染色

抗 HPIP 抗体 (BETHYL) を用いて LSAB 法 (DAKO) により免疫染色を行った。

(4) siRNA の導入

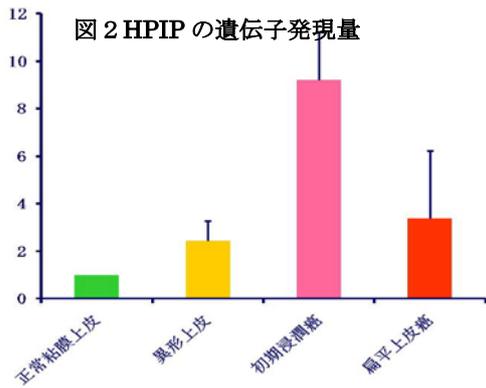
HPIP の siRNA (DAHMACON) を Dahmaflect (DAHMACON) を用いて導入した。

(5) 浸潤能の測定

8.0um サイズのインサート上に 50 倍希釈したマトリゲルを添加し浸潤能を測定した。

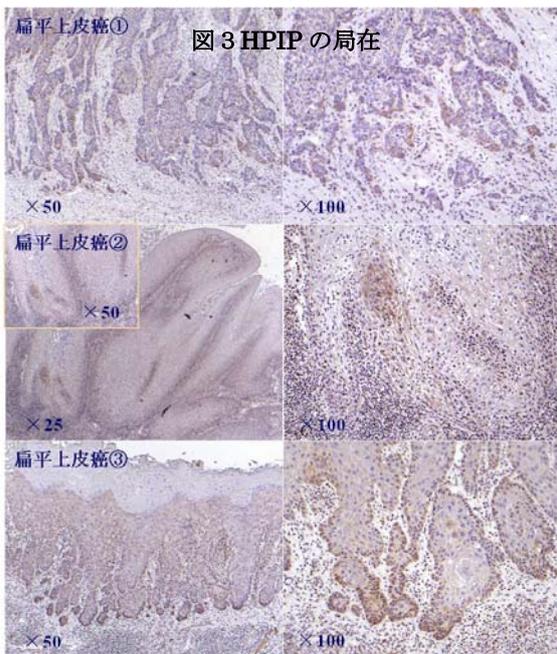
## 4. 研究成果

(1) HPIP の遺伝子発現量は、口腔扁平上皮癌の浸潤先端部で高い。



レーザーマイクロダイセクション法を用いて、口腔扁平上皮癌凍結組織切片より、正常粘膜上皮、異形上皮、扁平上皮癌、扁平上皮癌浸潤先端部（切片上における最深部）の上皮細胞のみを回収し、HPIPの遺伝子発現量を解析した結果、同一組織切片上においても癌中心部より最深部においてその発現量が高い傾向にあった（図2）。

（2）HPIPは口腔扁平上皮癌の浸潤を評価するマーカーとなりうる可能性がある。



これらの結果を得て、口腔扁平上皮癌凍結組織切片に対して抗HPIP抗体を用いた免疫染色を行った。図3に示すのは質量解析に用いた各症例におけるHPIPの局在である。初期浸潤癌ではHPIPの陽性像が強く認められ、また浸潤している部位に一致して強い発現を示した。一般的な扁平上皮癌では全体的に陽性細胞数は少なく、浸潤先端部に一致して少数の陽性細胞が認められた。外向性に増殖している癌では、ほとんど陽性所見は認められず、ごく一部に限局していた。

さらに他の症例を用いて免疫染色を行った（図4）。その結果、正常粘膜上皮には全く陽性像は認められず、初期浸潤癌では癌化し

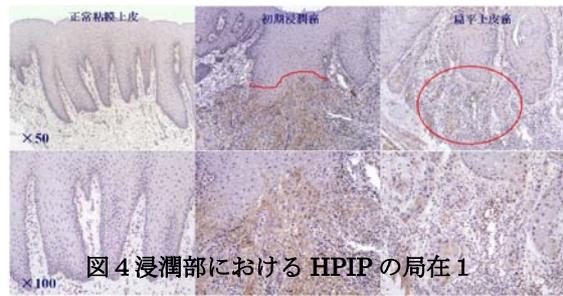


図4 浸潤部におけるHPIPの局在1

浸潤している細胞に一致して非常にクリアーに（赤線）陽性所見が認められた。また、やや分化度の高い扁平上皮癌においても浸潤先端部（赤丸）に一致して陽性所見が散見された。

浸潤とHPIPの陽性像について確認する為に、同一切片内でよりアグレッシブな浸潤形態を取る癌細胞への変化が見られる標本を染色した所、やはり強い浸潤を示す部位に一致して強い陽性像が認められた（図5）。また、この強い陽性像を示す細胞は、神経周囲へと



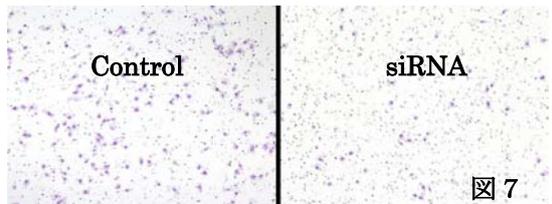
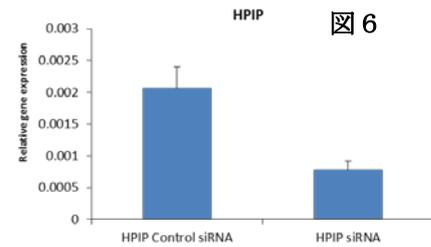
図5 浸潤部におけるHPIPの局在2

浸潤している部位にも見られた。以上よりHPIPは組織学的に強い浸潤像を呈している細胞に強く発現している事がわかり、口腔扁平上皮癌の浸潤を判断する為やメカニズムの解析に有効なマーカーとなる可能性が示唆された。

（3）HPIP遺伝子の発現抑制は口腔扁平上皮癌培養細胞株の浸潤能を低下させる。

口腔扁平上皮癌培養細胞株である SCC4 に

HPIPの siRNA を導入した（図6）。コントロール siRNA を導入した細胞との浸潤能を比較した結果、HPIPの遺伝子発現を抑制することによって癌細胞の浸潤能は有意に低下していた（図7）。



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 Hayashi S, Tanaka J, Okada S, Isobe T, Yamamoto G, Yasuhara R, Irie T, Akiyama C, Kohno Y, Tachikawa T, Mishima K.

Lin28a is a putative factor in regulating cancer stem cell-like properties in side population cells of oral squamous cell carcinoma, 2013, Exp Cell Res. 査読有り  
319 (2013):1220-1228 doi:  
10.1016/j.yexcr.2013.03.004.

② Pal SK, Noguchi S, Yamamoto G, Yamada A, Isobe T, Hayashi S, Tanaka J, Tanaka Y, Kamiyo R, Yamane GY, Tachikawa T.

Expression of myelin and lymphocyte protein (MAL) in oral carcinogenesis, Med Mol Morphol. 査読有り 45 (2012):222-228  
doi: 10.1007/s00795-011-0563-2.

〔学会発表〕(計5件)

① 安原理佳、沢田晃暢、鈴木研也、中村清吾、山本 剛、入江太朗、美島健二:

乳癌骨転移誘導因子の検索とその機能解析  
(第101回日本病理学会, 東京, 2012年4月)

② 林 茂雄、磯辺友秀、立川哲彦、田中準一、岡田誠二、外薮知恵、山本 剛、入江太朗、美島健二:

扁平上皮癌細胞株における癌幹細胞の特性  
(第31回昭和歯学会, 東京, 2011年12月)

③ 田中準一、磯辺友秀、立川哲彦、林 茂雄、岡田誠二、外薮知恵、山本 剛、入江太朗、美島健二:

口腔扁平上皮癌細胞株のスフェロイド培養法における、癌幹細胞様細胞の特性について  
(第31回昭和歯学会, 東京, 2011年12月)

④ 安原理佳、角田ゆう子、鈴木研也、沢田晃暢、中村清吾、佐々木晶子、山本 剛、入江太朗、立川哲彦:

乳癌骨転移因子の探索と機能解析  
(第19回日本乳癌学会, 抄録集p407, 仙台, 2011年9月)

⑤ 安原理佳、佐々木晶子、山本剛、入江太朗、角田ゆう子、鈴木研也、沢田晃暢、中村清吾、立川哲彦:

乳癌骨転移における b-Catenin シグナルの役割  
(第100回日本病理学会, 日本病理学会誌第100巻第1号 p458, 神奈川, 2011年4月)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 剛 (YAMAMOTO GOU)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号: 80384189

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: