

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792185

研究課題名(和文)ケラチン17は口腔扁平上皮癌細胞を活性化させる：14-3-3の挙動との対比解析

研究課題名(英文)Keratin 17 promotes the activity of the oral squamous cell carcinoma cell: Comparison analysis with the behavior of 14-3-3 sigma

研究代表者

三上 俊彦 (Mikami, Toshihiko)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：90595745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜悪性境界病変において14-3-3sigmaとケラチン17(K17)の免疫組織化学を行ったところ、正常上皮と異型上皮では両者の発現を認めなかったが、扁平上皮癌と上皮内癌で同時に発現していた。また、口腔癌細胞株ZK-1を用いてK17をノックダウンさせたところ、細胞質内に存在していた14-3-3sigmaの核移行することが確認でき、その細胞増殖能と細胞遊走能が抑制されることが分かった。以上の結果から、口腔癌においてK17は14-3-3sigmaを介して癌細胞の細胞増殖能と遊走能に重要な役割を担っていることが証明できた。

研究成果の概要(英文)：We determined immunohistochemical profiles of 14-3-3 sigma and Keratin(K) 17 in tissue specimens of oral borderline malignancies and SCC as well as in ZK-1, an oral SCC cell line. In addition, to elucidate function of K17 in carcinoma cells, we examined cell proliferation and migration of ZK-1 cells when their K17 gene expressions were suppressed by knockdown using K17-siRNA (K17-siRNA cells). Both 14-3-3 sigma and K17 were similarly expressed in the cytoplasm of oral SCC and CIS cells but not in normal or dysplastic epithelia at tissue levels. They both were demonstrated in the cytoplasm of control ZK-1 cells, while 14-3-3 sigma was converted from the cytoplasm into the nucleus in K17-siRNA cells. The proliferation of K17-siRNA cells was significantly suppressed on day 4 after seeding. In addition, they migrated slower in scratch wound assays. The results indicate the K17 expression play an important role in promoting carcinoma cell growth in association with 14-3-3 sigma.

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：口腔扁平上皮癌 上皮内癌 keratin 17 14-3-3 sigma siRNA

1. 研究開始当初の背景

14-3-3σ は mTOR シグナル経路を活性化する癌関連タンパクとして注目されており、近年ケラチン 17 (K17) との相互作用が明らかにされた。申請者は K17 が口腔癌で特異的に発現することを報告しているが、その意義については理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では口腔癌において K17 と 14-3-3σ の相互作用を実証するとともに、口腔癌細胞株の K17 を RNA interference (RNAi) によりノックダウンすることで K17 の口腔癌における未知の機能を解明する。本研究の成果は、臨床における short interfering RNA (siRNA) を応用した口腔癌治療への道を開くと考える。

3. 研究の方法

病理組織学的にシークエンス癌の所見が認められた症例を抽出して免疫組織化学をおこない、14-3-3σ と K17 の発現パターンを病変レベルごとに比較検討する。細胞実験にはヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いる。14-3-3σ と K17 について RT-PCR にて遺伝子発現、蛍光抗体法にてタンパク発現について確認する。また、siRNA で K17 ノックダウン細胞株をつくり、14-3-3σ のタンパクおよび遺伝子発現様式を対照と比較検討するとともに、細胞増殖能と浸潤能への影響を比較検討する。

4. 研究成果

当院口腔外科で切除した正常上皮、異型上皮および上皮内癌をとまなう口腔粘膜扁平上皮癌の外科的切除標本を検討材料とし、14-3-3σ、K17、K13、Ki-67 の免疫組織化学をおこない、その発現率を病変レベルごとに集計するとともに相互の発現パターンを比較した。

口腔粘膜扁平上皮癌手術標本 68 症例を収集し、病理組織学的診断のもと病変レベル分類を行ったところ、正常上皮 19 部位、異型上皮 74 部位 (うち、軽度異型上皮 57 部位、中等度異型上皮 17 部位)、上皮内癌 36 部位 (うち、基底細胞型 13 部位、分化型 23 部位)、浸潤癌 26 部位に分類された。その結果、正常上皮では 14-3-3σ、K17 ともに陽性はなく、異型上皮でも同様の傾向であることが分かった (表 1)。

Lesions	Number of areas	14-3-3σ	Keratin 17
Normal	19	0 (0.0)	0 (0.0)
Dysplasia	74	6 (8.1)	1 (1.4)
Mild	57	3 (5.3)	0 (0.0)
Moderate	17	3 (17.6)	1 (5.9)
Carcinoma in-situ	36	36 (100)	36 (100)
Basaloid	13	13 (100)	13 (100)
Differentiated	23	23 (100)	23 (100)
Squamous cell carcinoma	21	21 (100)	21 (100)
Total areas	150		

表 1. 各病変部位における免疫陽性率 (%)

その一方で、上皮内癌と浸潤癌では 14-3-3σ、K17 ともに陽性で (表 1)、特に分化した癌細胞でその傾向が強調された (図 1)。14-3-3σ

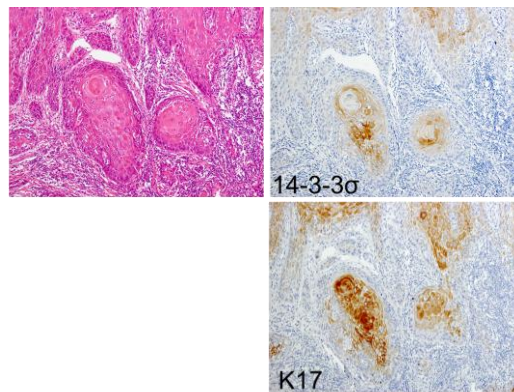


図 1. 浸潤癌における 14-3-3σ と K17 の発現

と K17 の陽性域は全 68 症例中 63 症例 (93%) で一致し、口腔粘膜扁平上皮細胞の悪性化にともない、14-3-3σ と K17 の共発現することが判明した (図 2)。

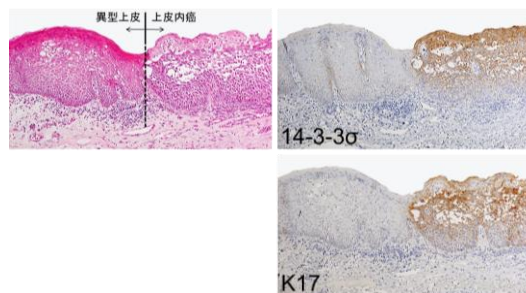


図 2. 14-3-3σ と K17 の発現域が一致

以上から、口腔扁平上皮癌において K17 と 14-3-3σ は何らかの相互作用が存在し、前述したように、K17 は口腔癌においては単なる細胞骨格としてのみならず、14-3-3σ を介して癌細胞の様々な機能維持にも関与している可能性があることが考えられた。

次に、ZK1 (ヒト口腔扁平上皮癌細胞株) において 14-3-3σ と K17 の発現を蛍光抗体法で確認したところ、組織と同様に両タンパクの発現を認めた。そこで K17 に対する siRNA を ZK1 にトランスフェクションさせることで K17 遺伝子 (KRT17) をノックダウンさせた細胞株 (K17-siRNA cells) をつくり、14-3-3σ のタンパクおよび遺伝子発現様式を蛍光抗体法、RT-PCR で対照 (control cells) と比較検討するとともに、細胞増殖性と細胞遊走能への影響を比較検討した。

K17-siRNA cells の K17 ノックダウン効果を RT-PCR で確認を行ったところ、control cells と比

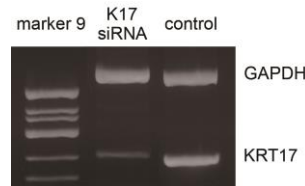


図 3. KRT17 のノックダウン

較して明らかにその mRNA レベルの抑制が確認できた (図 3)。

K17-siRNA cells と control cells で 14-3-3 σ の細胞内配置を蛍光抗体法で確認したところ、control cells では 14-3-3 σ は細胞質内に分布していたのに対し、K17-siRNA cells では核内に限局して分布していた (図 4)。この 14-3-3 σ

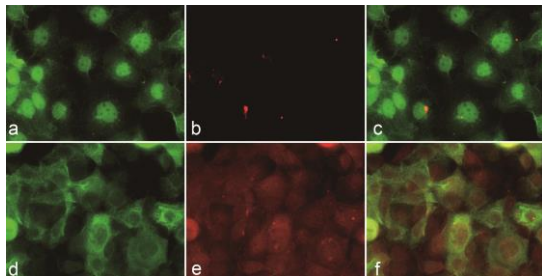


図 4. 二重蛍光抗体法
a, b, c: K17-siRNA d, e, f: control
a, d: 14-3-3 σ b, e: K17 c, f: merge

の細胞内配置の変化が細胞増殖性にどのように影響するかを MTT 法にて検討した。細胞培養プレートに各細胞株を播種後 7 日までを各日計測したところ、両群間に有意差を認めた (図 5)。また、細胞遊走能の検討には scratch assay にて行ったところ K17-siRNA cells は control cells に比較して細胞遊走能の低下を認めた (図 6)。

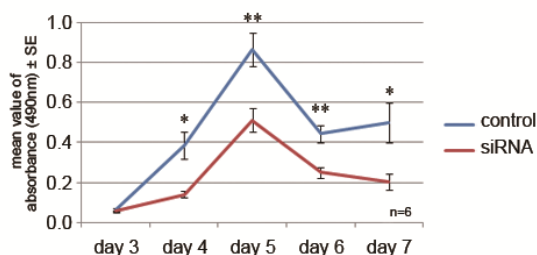


図 5. 細胞増殖曲線

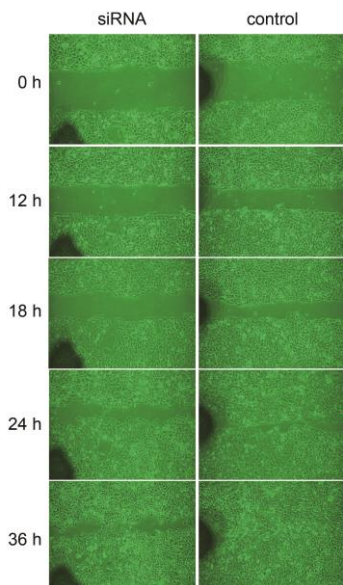


図 6. scratch assay

以上の結果から、口腔癌において K17 は 14-3-3 σ を介して癌細胞の細胞増殖能と遊走能に重要な役割を担っていることが証明できた。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① Mikami T, Maruyama S, Cheng J, Kobayashi T, Funayama A, Yoshizawa M, Kobayashi T, Shingaki S, Saito C, Saku T: Coordinated expression of keratin17 and 14-3-3 sigma regulates in cell proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, 10/21-24, 2013. Barcelona, Spain.

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 俊彦 (MIKAMI, Toshihiko)
新潟大学医歯学総合病院・特任助教
研究者番号：90595745

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：