

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462875

研究課題名(和文) 唾液腺腫瘍初期組織発生解析モデルマウスの確立とそのメカニズムの包括的解明

研究課題名(英文) Establishment of a Cre-conditional Plag1-driven salivary gland tumor mouse model.

研究代表者

入江 太朗 (Irie, Tarou)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：00317570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はPlag1遺伝子の腫瘍形成能を利用し、基底細胞、筋上皮細胞や管腔側上皮細胞のみにPLAG1を過剰発現させ、唾液腺腫瘍を生じうるモデルマウスの確立を目的として本研究課題を遂行した。2系統のPlag1過剰発現floxマウスが確立され、現在、管腔側上皮細胞のみにPlag1を過剰発現するマウスと筋上皮のみにそれが生じるマウスが完成した状態にある。また、Plag1遺伝子を過剰発現する腺房、導管と筋上皮の形質を有するヒト正常唾液腺由来培養細胞3系統を樹立し、それらを用いた解析からPLAG1が唾液腺組織の各構成細胞特異的な様式で腫瘍形成の促進と抑制の両者の機能的役割を有している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Details of histogenesis of salivary gland tumors are still not entirely clear. We performed challenge for establishment of a Cre-conditional Plag1-driven salivary gland tumor mouse model which causes PLAG1 overexpression only in basal, myoepithelial or luminal cells of salivary gland. Two independent lines of Plag1 overexpressed (CAG-loxp-lacZ-pA-loxp-Plag1-EGFP) flox mouse were established. Two kinds of conditional mouse which overexpressed PLAG1 only in luminal cells (Sox9-CreERT2-loxP mouse) or myoepithelial cells (Myh11-Cre-loxP mouse) of salivary glands are available at the present time. Moreover, we established three stable PLAG1 overexpressed cell lines of acinar-, duct- and myoepithelial phenotype of human normal salivary glands. Our results by use of these stable cell lines indicated that PLAG1 may play a dual role in salivary gland tumorigenesis in cell specific manner.

研究分野：口腔病理学

キーワード：唾液腺腫瘍 モデルマウス 腫瘍組織発生 コンディショナルマウス

1. 研究開始当初の背景

唾液腺腫瘍は頭頸部腫瘍の約 5~6%を占める腫瘍であるがその約 40%は悪性腫瘍である。唾液腺腫瘍においても他の臓器同様に病理診断は治療方針の決定、予後の判定に重要であることに変わりはない。しかしながら唾液腺腫瘍は他の臓器の腫瘍と比較して組織像が極めて多彩な上、30種類を超える多くの腫瘍型や種々の亜型が存在しており、その診断に難渋することが希ではない。さらに異なる組織型においても部分的に共通した組織像を有することから、病理医間での診断の食い違いが往々にしてみられ、これが治療に多大な影響を及ぼすことが少なくないのが現状である。この分類組織型が多い最大の原因は、唾液腺腫瘍の組織発生が仮説としては唱えられているものの、未だその詳細が明らかになっていないことにある。現時点においても介在部導管上皮の基底細胞が腫瘍組織発生の予備細胞であると考えられているが、この予備細胞が介在部と導管部の2ヶ所にあるとする説やいずれの部位にもあるとする説もあり、いずれかとは明らかにはなっていない。近年、いくつかの遺伝子が唾液腺腫瘍の組織発生に関わることが報告されているが、現在においても未だ *in vivo*における過剰発現により腫瘍組織発生に関わることが直接的に示されている遺伝子は Pleomorphic adenoma gene 1 (Plag1)のみである(Cancer Res 65:4554-53, 2005)。本研究では、この Plag1 の確実性のある腫瘍形成能を利用し、現在までに仮説として考えられている唾液腺腫瘍組織発生の概念に従い、基底細胞、筋上皮細胞や管腔側上皮細胞のみに PLAG1 を過剰発現させ、唾液腺腫瘍を生じうるモデルマウスの確立を目的とした。さらに、腫瘍組織発生解析モデルとするためには、実際のヒト唾液腺腫瘍のあり方と同様に「正常な唾液腺組織内に腫瘍が生じる」そのあり方を忠実に再現することが必須であると考えられる。個体発生や組織発生の段階で、正常な唾液腺組織完成以前に PLAG1 の過剰発現により腫瘍が生じてしまう可能性や、正常な唾液腺組織の構築そのものに PLAG1 の過剰発現が悪影響を与える可能性を排除しなくてはならない。そのために、実験開始時点までは PLAG1 の過剰発現を抑えた野生型が維持されるコンディショナルトランスジェニックマウスを設計理念とした。

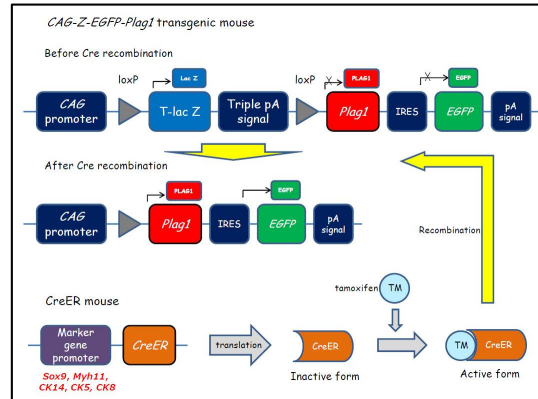
2. 研究の目的

本研究では、唾液腺導管基底細胞に時期特異的に PLAG1 の過剰発現を引き起こすコンディショナルトランスジェニックマウスの確立と、同様に筋上皮細胞にそれを引き起こすもの、管腔側上皮細胞にそれを引き起こすもの、さらに唾液腺組織幹細胞にそれを引き起こすトランスジェニックマウスを作成すること、さらにこのトランスジェニックマウスを用いることにより、これまで誰も

観察することができなかった完成された正常な唾液腺組織内からの唾液腺腫瘍初期組織発生の一連の流れを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) Plag1 flox マウス (CAG-Z-EGFP-Plag1 transgenic mouse)の作成
CreER-loxP システムを用いたトランスジェニックマウスの設計概念図を下に示す。



Plag1 flox マウスは CAG プロモーターの下流に loxP 配列で挟んだ lacZ とストップカセットを配置しその下流に Plag1 遺伝子と EGFP を IRES 配列を介して配置したコンストラクトを作成した。このコンストラクトの作成は、ミシガン大学の三品裕司先生、東北大学の福田智一先生より御供与頂いた targeting vector (CAG-loxP-lacZ-pA-loxP-MCS-EGFP[CAG-Z-EGFP]プラスミド)がベースとなっている。完成したコンストラクトを直鎖化しマウス受精卵に顕微注入を行った。完成した Plag1 flox マウスは、基底細胞のマーカー遺伝子である Keratin 14、導管腺房上皮細胞に発現する Sox9 や筋上皮細胞のマーカー遺伝子である Myh11 のプロモーターにより CreER を発現する CreER マウスと交配させ CreER-loxP マウスの作成を目指している。生まれてきたマウスは p5 で genotyping を行い CreER-loxP の遺伝子型であることを確認後、tamoxifen を体重 1g 当たり 0.1 mg の腹腔内注射を 3 日ごとに計 6 回行った後、経過観察を行った。

2) ヒト正常唾液腺培養細胞株における Plag1 遺伝子の機能解析

a. Plag1 遺伝子安定過剰発現ヒト正常唾液腺由来培養細胞 (NS-SV-AC-PL, NS-SV-DC-PL, NS-SV-MC-PL)3 系統の樹立
p3XFLAG-myc-CMV-26 Expression vector (SIGMA)に DNAFORM 社より購入した PLAG1 の全長配列の cDNA を挿入し PLAG1 過剰発現ベクターを作成した。
ヒト正常唾液腺培養細胞株は、徳島大学口腔内科学分野 東雅之教授より御供与頂いた 3 株、腺房細胞の形質を有する培養細胞株 NS-SV-AC、導管上皮細胞の形質を有する培養細胞株 NS-SV-DC と筋上皮細胞の形質を有す

る培養細胞株 NS-SV-MC を用いた。Plag1 過剰発現ベクターを 3 種類の細胞株に導入し、Geneticin 添加培地で選択を行った。Geneticin 耐性コロニーを単離しクローニングを行った。3 種類の細胞とも 10~20 クローン程株化し Western blot にて PLAG1 の発現を確認した。得られた PLAG1 遺伝子安定過剰発現ヒト正常唾液腺由来培養細胞 (NS-SV-AC-PL, NS-SV-DC-PL, NS-SV-MC-PL) 3 系統の増殖能、浸潤能とコロニー形成能を、正常唾液腺由来培養細胞と比較検討した。

4. 研究成果

1) Plag1 flox マウス (CAG-Z-EGFP-Plag1 transgenic mouse) の作成

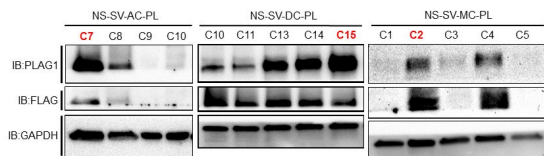
生まれてきた F0 マウスと野生型マウスを交配させ、ジャームライトランスミッションまで確認できた 2 系統 (No.45, 46 系統) を得ることができた。この 2 系統は別個に維持を継続している。No.46 系統は No.45 系統に比べ PLAG1 の遺伝子発現量が 5 倍程度高いことが確認された。



この 2 系統の CAG-Z-EGFP-Plag1 flox マウスと、Sox9-CreERT2 マウスや Myh11-Cre マウスを交配させ、現在までに Plag1-Sox9 CreERT2-loxP マウスは No.45 系統の 3 匹、1 匹、No.46 系統の 3 匹誕生し、生後 8 日目から 3 日おきに 5 回ほど 0.1 mg/gr body weight の tamoxifen を腹腔内投与し経過観察を継続しているところである。Plag1-Myh11-Cre-loxP マウスは、No.45 系統の 4 匹、5 匹、No.46 系統の 2 匹が得られた状態となっている。これらの Cre-loxP のマウスは現在最も長いもので生後 19 週まで経過観察を継続しているがまだ腫瘍の発生にまでは至っていない。CAG-Cre マウスと作成した両系統のマウスを交配させ CAG-Z-EGFP-Plag1 マウスの唾液腺腫瘍組織発生能を確定したいと考えているが、CAG-Cre マウスがなかなか殖えずこれとの交配が困難な状況となっている。現在、CAG-Cre マウスを体外受精により交配させ新生仔が得られ離乳が済んだ状態となっている。これと両系統の CAG-Z-EGFP-Plag1 マウスとの交配を予定している状況である。

2) ヒト正常唾液腺培養細胞株における Plag1 遺伝子の機能解析

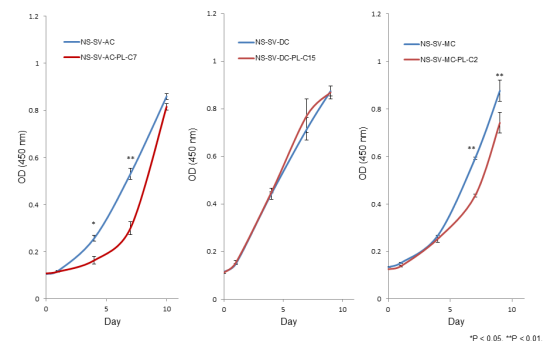
得られた PLAG1 遺伝子安定過剰発現ヒト正常唾液腺由来培養細胞 (NS-SV-AC-PL, NS-SV-DC-PL, NS-SV-MC-PL) 3 系統の Plag1 と Plag1 に組み込んだ FLAG タグに対する抗体を用いた Western blot の結果を以下に示す。



PLAG1 expressions of clones of NS-SV-AC-PL-C7 (AC-PL), NS-SV-DC-PL-C15 (DC-PL) and NS-SV-MC-PL-C2 (MC-PL) were confirmed by Western blot.

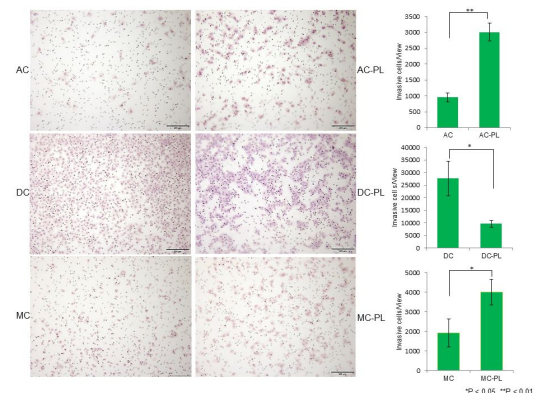
以下の解析には、PLAG1 の発現が最も高くみられたクローンを使用した。

PLAG1 遺伝子安定過剰発現ヒト正常唾液腺由来培養細胞 3 系統の増殖能を解析した結果、腺房細胞の形質を有する PLAG1 遺伝子安定過剰発現細胞株 (NS-SV-AC-PL) と筋上皮細胞の形質を有する PLAG1 遺伝子安定過剰発現細胞株 (NS-SV-MC-PL) でヒト正常唾液腺由来培養細胞と比べて増殖が抑制された。その一方で導管上皮細胞の形質を有する Plag1 遺伝子安定過剰発現細胞株 (NS-SV-DC-PL) においては増殖への影響は認められなかった。



Comparison of cell growth between stable PLAG1 overexpressed cells and normal salivary gland cell.

Plag1 遺伝子安定過剰発現ヒト正常唾液腺由来培養細胞 3 系統の浸潤能 (transwell migration 能) を解析した結果、PLAG1 は NS-SV-AC と NS-SV-MC の transwell migration を促進し、NS-SV-DC のそれを抑制することが



Effect of PLAG1 overexpression on transwell migration of normal salivary gland cells and quantification of the transwell migrated cells.

明らかとなった。さらにコロニー形成能を解析した結果、PLG1はNS-SV-ACとNS-SV-DCのコロニー形成能を促進する一方でNS-SV-MCのそれを抑制した。近年、PLG1は細胞増殖や腫瘍形成に関わる遺伝子を活性化させるだけではなく、それらの細胞内プロセスを抑制することが報告されている。ヒト唾液腺腫瘍の組織発生においては、PLG1は唾液腺組織の各構成細胞特異的な様式で腫瘍形成の促進と抑制の両者の機能的役割を有していることが示唆された。

ヒト正常唾液腺培養細胞株におけるPlag1遺伝子の機能解析からPLG1が唾液腺組織の各構成細胞特異的な様式で腫瘍形成に関与することが示されたことから、Plag1 flox マウスを用いた部位特異的なPLG1過剰発現による造腫瘍性の変化とその仕組みの解明が期待を以て待たれる状態となっているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Yasuhara R, Irié T, Suzuki K, Sawada T, Miwa N, Sasaki A, Tsunoda Y, Nakamura S, Mishima K, The β -catenin signaling pathway induces aggressive potential in breast cancer by up-regulating the chemokine CCL5, *Exp Cell Res*, 査読有、338巻、2015、22 - 31

DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.09.003

Matsunaga A, Takami M, Irie T, Mishima K, Kamijo R, Microscopic study on resorption of β -tricalcium phosphate materials by osteoclasts, *Cytotechnology*, 査読有、67巻、2015、727 - 32

DOI: 10.1007/s10616-015-9854-0

Ichikawa Y, Watahiki J, Nampo T, Nose K, Yamamoto G, Irie T, Mishima K, Maki K, Differences in the developmental origins of the periosteum may influence bone healing, *J Periodont Res*, 査読有、50巻、2015、468 - 78

DOI: 10.1111/jre.12229

Tanaka J, Irié T, Yamamoto G, Yasuhara R, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K, ANGPTL4 regulates the metastatic potential of oral squamous cell carcinoma, *J Oral Pathol Med*, 査読有、44巻、2015、126 - 133

DOI: 10.1111/jop.12212

Okada S, Irié T, Tanaka J, Yasuhara R, Yamamoto G, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K, Potential role of hematopoietic pre-B cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis, *J Oral Pathol Med*, 査

読有、44巻、2015、115 - 125

DOI: 10.1111/jop.12210

Hojyo S, Miyai T, Fujishiro H, Kawamura M, Yasuda T, Hijikata A, Bin BH, Irié T, Tanaka, Atsumi T, Murakami M, Nakayama M, Ohara O, Himeno S, Yoshida H, Koseki H, Ikawa T, Mishima K, Fukada T, Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B cell receptor signal strength, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有、2014、111巻、11786 - 11791

DOI: 10.1073/pnas.1323557111

Miyai T, Hojyo S, Ikawa T, Kawamura M, Irié T, Ogura H, Hijikata A, Bin BH, Yasuda T, Kitamura H, Nakayama M, Ohara O, Yoshida H, Koseki H, Mishima K, Fukada T, The zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates anti-apoptotic signaling during early B cell development, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有、111巻、2014、11780 - 11785

DOI: 10.1073/pnas.1323549111

〔学会発表〕(計14件)

入江太朗, 安原理佳, 田中準一, 福島美和子, 河野葉子, 東雅之, 美島健二, Role of pleomorphic adenoma gene 1 (PLG1) in normal salivary gland cells, 第105回日本病理学会総会、2016年5月12日~14日(仙台国際センター、宮城県)

安原理佳, 田中準一, 福島美和子, 入江太朗, 河野葉子, 美島健二, 唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析, 第105回日本病理学会総会、2016年5月12日~14日(仙台国際センター、宮城県)

田中準一, 馬淵洋, 安原理佳, 入江太朗, 福島美和子, 河野葉子, 美島健二, Sox9を介したマウス唾液腺組織肝細胞の機能解析, 第105回日本病理学会総会、2016年5月12日~14日(仙台国際センター、宮城県)

入江太朗, 安原理佳, 田中準一, 河野葉子, 深田俊幸, 美島健二, Role of hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis, 第104回日本病理学会総会、2015年4月30日~5月2日(名古屋国際会議場、愛知県)

田中準一, 馬淵洋, 安原理佳, 入江太朗, 深田俊幸, 福島美和子, 河野葉子, 美島健二, マウス唾液腺における幹細胞の同定とその機能解析, 第104回日本病理学会総会、2015年4月30日~5月2日(名古屋国際会議場、愛知県)

安原理佳, 入江太朗, 田中準一, 澤田晃暢, 鈴木研也, 中村清吾, 美島健二, β -Catenin シグナルは CCL5 を介して乳癌の増殖・浸潤能を促進する, 第104回日本病理学会総会、2015年4月30日~5

月2日(名古屋国際会議場、愛知県)
田中準一、安原理佳、入江太朗、深田俊幸、福島美和子、河野葉子、美島健二、マウス唾液腺における幹細胞の同定とその characterization、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日~21日(パシフィコ横浜、神奈川県)
入江太朗、安原理佳、田中準一、河野葉子、秋光信佳、大西忠博、美島健二、口腔粘膜における長鎖 non-coding RNA MALAT-1 - 正常と癌におけるその役割 -、第103回日本病理学会総会、2014年4月24日~26日(広島国際会議場、広島県)
田中準一、安原理佳、入江太朗、河野葉子、美島健二、Lin28a は口腔扁平上皮癌における癌幹細胞性の制御に關与している、第103回日本病理学会総会、2014年4月24日~26日(広島国際会議場、広島県)
田中準一、安原理佳、入江太朗、深田俊幸、福島美和子、河野葉子、美島健二、マウス唾液腺細胞における CD133 陽性細胞の機能解析、第59回日本唾液腺学会学術集会、2014年12月6日(文京学院大学本郷キャンパス、東京都)
入江太朗、磯邊友秀、外菌知恵、安原理佳、田中準一、河野葉子、山本剛、美島健二、Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 (HP1P)は口腔扁平上皮癌の浸潤を制御する、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月20日~22日(岡山コンベンションセンター、岡山県)
外菌知恵、入江太朗、秋光信佳、森泰昌、大西忠博、安原理佳、田中準一、美島健二、核内長鎖 non-coding RNA - その唾液腺腫瘍における役割 -、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月20日~22日(岡山コンベンションセンター、岡山県)
入江太朗、核内長鎖 non-coding RNA - その頭頸部腫瘍との関わり -、第24回日本臨床口腔病理学会 総会・学術大会若手シンポジウム(招待講演)、2013年8月28日~30日(日本大学理工学部1号館 CTS ホール、東京都)
外菌知恵、入江太朗、秋光信佳、大西忠博、安原理佳、磯邊友秀、林茂雄、田中準一、山本剛、美島健二、核内長鎖 noncoding RNA (MALAT-1)は唾液腺腫瘍に発現し予後に影響する、第67回日本口腔科学会学術集会、2013年5月22日~24日(栃木県総合文化センター、栃木県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 太朗 (IRIE, Tarou)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号: 00317570

(2) 研究分担者

美島 健二 (MISHIMA, Kenji)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 50275343

森 泰昌 (MORI, Taisuke)
国立研究開発法人国立がん研究センター・分子病理分野・研究員
研究者番号: 00296708

安原 理佳 (YASUHARA, Rika)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号: 20453649

山本 剛 (YAMAMOTO, Go)
昭和大学・歯学部・兼任講師
研究者番号: 80384189

(3) 連携研究者

辻 孝 (TSUJI, Takashi)
国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー
研究者番号: 50339131

豊島 公栄 (TOYOSHIMA, Koh-ei)
北里大学・医学部・特任講師
研究者番号: 00599243