

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893154

研究課題名(和文) 口腔癌における足場依存性喪失に関わる新規分子の同定および機能解析

研究課題名(英文) The role of Calreticulin; how to regulate tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

竹縄 隆徳 (TAKENAWA, Takanori)

山口大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：30711270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性マウス線維肉腫腫瘍モデル(細胞株)の単一腫瘍細胞由来の性質の異なる2種類のクローン細胞に関する、プロテオミクスによる差次的発現解析の結果得られた発現に有意差を認めたタンパク質の中で、網羅的にm-RNAの発現レベルを検討した。この中で、最も発現レベルが高かった遺伝子はCalreticulin (CALR)であった。

。CALRの口腔扁平上皮癌の発生や癌化を予測できるバイオマーカーとしての有用性を検討した。CALR-knockdownした口腔扁平上皮癌細胞株を用いて悪性形質転換に関する検討を行ったところ、CALRの悪性形質転換への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We have performed proteomic differential display analysis for the expression of intracellular proteins in the regressive murine fibrosarcoma cell clone QR-32 and the progressive malignant tumor cell clone QRsP-11, derived from QR-32, by means of the combination of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). We found several protein spots whose expression was different between QRsPs and identified those proteins, and calreticulin precursor (CALR), one of them, was over-expressed in the progressive tumor cell. Our RT-PCR results indicated that m-RNA level of CALR was up-regulated in oral squamous cell carcinomas (OSCCs). To study the function of CALR in OSCC, we established a stable CALR-knockdown cell line. We tested colony forming ability of the knockdown cell line and there was a marked decrease in colony formation when CRT expression was depleted. These results indicated CALR might play an oncogenic role in OSCCs.

研究分野：外科系歯学

キーワード：悪性腫瘍 口腔癌 プロテオーム タンパク質 生化学

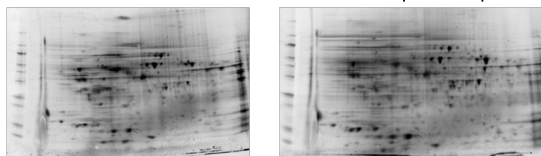
1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌はその発生部位の特性より、患者に機能的・審美的障害を生じる可能性が高い。そのため早期発見と最適な治療法の確立が望まれる。現在臨床で主に行われている、前癌病変に対する組織異型性診断は、WHOの診断基準に基づいて行われるが、組織診断医の診断ではばらつきがあり、口腔扁平上皮癌の発生を予知する上では信頼性に乏しいのが現状である。そこで診断の精度を上げるために、簡便な一定の基準で客観的に判断できる、腫瘍の進展に関与するバイオマーカーの同定が必要とされる。

正常な上皮細胞に複数の遺伝子変異が起ることで前癌細胞となり、さらに前癌細胞が過剰に増殖して良性腫瘍が形成される。良性腫瘍は、組織浸潤能・転移能を持たない細胞集団で、異常な増殖を起こすが、発生した場所から移動することはない。この良性腫瘍にさらに遺伝子変異が加わることで、組織浸潤能・転移能を持つ癌が生じると考えられている。腫瘍が組織浸潤能・転移能を持つようになることを、腫瘍の悪性化(癌化)と呼ぶ。また悪性腫瘍細胞の特性として、細胞の足場非依存性増殖が指摘されている。これまで、このような腫瘍の悪性化を促すさまざまな遺伝子変異について多くの研究が行われてきた。しかし近年、細胞が分泌するタンパク質に悪性化を促進する機能があることが知られるようになり、前癌細胞や正常細胞が互いに影響を及ぼし合うことによっても、癌化が促進されると考えられるようになった。

われわれは、癌の悪性化の進展メカニズムの解明を研究テーマの一つとして行っており、その結果を報告してきた。単一腫瘍細胞由来の性質の異なる2種類のクローン細胞、即ち炎症性マウス線維肉腫腫瘍モデル(細胞株)で造腫瘍性が弱く転移能のないクローン細胞である退縮性クローン QR-32 と、造腫瘍性と転移能が高い進行性クローン QRsP-11(Okada F, et al. Br J Cancer 66: 635-639, 1992.)に関して2次元電気泳動(2-DE)を用いたプロテオーム研究による差次的発現解析を行った。その結果、退縮性クローンと比較して進行性クローンにおいて発現に差を認めたタンパク質、即ち足場依存性の喪失に寄与すると思われるタンパク質を検出した(図1)。さらにそのタンパク質に

図1 QR-32(退縮性腫瘍細胞)とQRsP-11(進行性腫瘍細胞)における2次元電気泳動の結果得られたprotein spot



退縮性腫瘍細胞 v.s. 進行性腫瘍細胞

ついて、ヒト舌において mRNA の発現レベルを UCSC Genome Bio Informatics で確認した。これら発現に有意差を認めたタンパク質に関して、口腔扁平上皮癌を用いて検討を

行った報告は、渉猟し得た限りでは認められていない。

足場依存性は、口腔扁平上皮癌を含む悪性腫瘍の特性であり、腫瘍の発生と進展における重要な因子である。口腔癌の悪性進展メカニズムを考える上で、炎症性反応や免疫反応が活発に引き起こされる口腔内の微小環境と、細胞の足場依存性の喪失の関連性に着目する必要がある。

2. 研究の目的

腫瘍の浸潤や転移といった悪性化のメカニズムは未だ解明されていない。本研究では、炎症性マウス線維肉腫腫瘍モデル(細胞株)の単一腫瘍細胞由来の性質の異なる2種類のクローン細胞に関する、プロテオミクスによる差次的発現解析の結果得られた発現に有意差を認めたタンパク質の中で、特に足場依存性の喪失に寄与すると考えられるタンパク質の、口腔扁平上皮癌における機能を検討する。最終的にデータを統合することにより、口腔扁平上皮癌の新規分子標的となり得る、バイオマーカーを同定することを目的としている。

口腔扁平上皮癌における細胞の足場依存性喪失に関係する役割を持つ因子が明らかになれば、この因子の発現増加または低下を認める症例に対して、的確な診断と治療が実現できる可能性がある。

3. 研究の方法

炎症性マウス線維肉腫腫瘍モデル(細胞株)の単一腫瘍細胞由来の性質の異なる2種類のクローン細胞に関する、プロテオミクスによる差次的発現解析の結果得られた発現に有意差を認めたタンパク質の中で、口腔扁平上皮癌の発生や癌化を予知できるバイオマーカーとしての有用性を検討した。

(1) 試薬

本研究で使用した試薬の中で、特に記載のないものは、Sigma 社および Invitrogen 社、和光純薬、ナカライテスクの試薬を使用した。

(2) 細胞培養

口腔扁平上皮癌由来細胞株 5 種(HSC2, HSC3, HSC4, SAS, Ca9-22)と、正常上皮由来細胞株 1 種(非発癌性のヒト正常ケラチノサイト由来細胞株である HaCaT)、口腔上皮異形成症由来細胞株 1 種(DOK)を使用した。これらの細胞の培養には、DOK には 100× Hydrocortisone および 10%FBS を添加した DMEM を、他の細胞には 10%FBS 添加 DMEM または MEM を使用した。

(3) Real-time PCR

炎症性マウス線維肉腫腫瘍モデル(細胞株)の単一腫瘍細胞由来の性質の異なる2種類のクローン細胞に関する、プロテオミクスによる差次的発現解析の結果得られた発現に有意差を認めたタンパク質の中で、Tropomyosin 1 alpha chain (TPM1)、Heat

Shock Protein 90B1 (HSP90B1)、Nucleophosmin (NPM1)、Vinculin (VCL)、Lamin-A/C (LMNA)、Zing Finger Protein (ZFDL)、Calreticulon (CALR)、Stathmin (STMN)の8遺伝子を検討の対象とした。また内部標準としてGUSBを用いた。先述の遺伝子に対するPCRプライマーセットをIntegrated Genome Technology社より購入して使用した。Stratagene qPCR Standard RNAをRandom Primerを用いて逆転写して得られたcDNAを用いて、PCRプライマーの定量性を検討した。先述のcDNAを用いて連続希釈系を作成し、SYBR Green法を用いてqPCRを行った。検量線を作成し、定量性を検証した。また同時に解離曲線を作成し、シングルピーク(PCR産物が単一である)であることを確認した。

ヒト正常ケラチノサイト由来細胞株HaCaT、口腔上皮異形成症由来細胞株DOK、口腔扁平上皮癌由来細胞株(Ca9-22, SAS, HSC2, HSC3, HSC4)を培養し、増殖期にTrizolを用いて細胞を採取しDirect-zol RNA MiniPrep kitを用いてRNAを抽出した。逆転写を行いcDNAを作成後、定量性が確認できたプライマーを用いてqPCRを行い、網羅的に8遺伝子のm-RNAの発現レベルを検討した。

(4)Western Blotting

細胞をPBSで洗浄後、RIPA Bufferを使用して回収した。ソニケーション後、遠心分離を行い、上清を細胞溶解液とした。タンパク質定量後、15-20 μ g/laneをWestern blotに使用した。4-12%のタンパク質泳動用既製Bis Tris Gelで電気泳動を行い、iBlot® Dry Blotting Systemを用いてPVDF膜に転写した。1次抗体を4で一晚反応させた後、2次抗体としてHRP結合IgG抗体を室温で1時間反応させた。タンパク質の検出は、LumiGLO® (Cell Signaling Technology社)およびImmunostar® (和光純薬)を使用して、化学発光法で行った。その後、LAS-1000(富士フィルム)を用いて検出した。

(5)Transfection and generation of CALR-knockdown stable cell line

HSC2細胞を 1×10^6 個の濃度で10cmシャーレに播種した後、4 μ gのCALR-shRNA vectorおよびコントロールvectorとしてFuGene6 transfection reagent (Roche Applied Science社)を加えた。2か月後、2 μ g/mlのpuromycinを添加したmediumで培養されるpuromycin抵抗性細胞株を作製した。

(6)MTT Assay

細胞を96wellプレートに 5×10^3 個/wellの濃度で播種した。24~72時間後まで培養を行い、24時間毎に生細胞数を測定、評価した。MTT溶液を各wellに(25 μ l/well)加えた後、4時間培養を行った。その後dimethyl sulfoxideを各wellに加え(100 μ l/well)、490nmで吸光度測定を行った。

(7)Colony formation Assay

CALR-knockdown細胞を96wellプレートに 1×10^4 個/wellの濃度で播種した。CytoSelect™ 96-well Cell Transformation Assay (Cell Biolabs社)を使用して、7日間培養した後、MTT溶液を加えて、MTT Assayと同様に490nmで吸光度測定を行った。

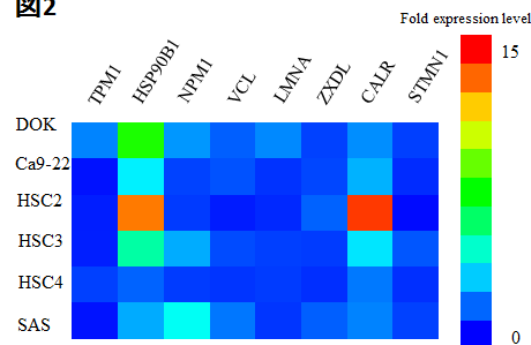
4. 研究成果

(1)研究結果の概要

炎症性マウス線維肉腫腫瘍モデル(細胞株)の単一腫瘍細胞由来の性質の異なる2種類のクローン細胞に関する、プロテオミクスによる差次的発現解析の結果得られた発現に有意差を認められたタンパク質の中で、Tropomyosin 1 alpha chain (TPM1)、Heat Shock Protein 90B1 (HSP90B1)、Nucleophosmin (NPM1)、Vinculin (VCL)、Lamin-A/C (LMNA)、Zing Finger Protein (ZFDL)、Calreticulon (CALR)、Stathmin (STMN)の8遺伝子について、Real-time PCRにより網羅的にm-RNAの発現レベルを検討した。

口腔扁平上皮癌由来細胞株Ca9-22, SAS, HSC2, HSC3, HSC4および口腔上皮異形成症由来細胞株DOKの相対的遺伝子発現レベルを、HaCaT細胞と比較することにより相対定量した。内部標準は、細胞株間で発現レベルが一定であったGUSBを使用した。検討結果をHeat Map表示して示す(図2)。この結果より、細胞内カルシウムホメオスタシス制御に関与するカルシウム結合タンパク質であるcalreticulin (CALR)の、口腔扁平上皮癌の発生や癌化を予測できるバイオマーカーとしての有用性を検討することとした。

図2



Western blotにて、口腔扁平上皮癌由来細胞株5種(HSC2, HSC3, HSC4, SAS, Ca9-22)と、正常上皮由来細胞株1種(非発癌性のヒト正常ケラチノサイト由来細胞株であるHaCaT)、口腔上皮異形成症由来細胞株1種(DOK)の計7種の細胞におけるCALRの発現を確認したところ、7種類全ての細胞株でCALRの発現を認められたが、HaCaTでは他の6種の細胞と比較して発現が減弱していた。

次に、HSC2細胞をCALR-knockdownした細胞株(CALR-shRNA-HSC2)を使用して、軟寒天コロニー形成試験(CytoSelect™

96-well 悪性形質転換アッセイキット)を行った。その結果、Control群と比較してCALR-shRNA-HSC2細胞株ではコロニーの形成が有意に減少を認めた。この結果より、CALRの悪性形質転換への関与が示唆された。

(2)今後の展望

CALRの口腔扁平上皮癌細胞における悪性化への関与が示唆されたが、そのメカニズムの詳細はまだ未解明である。今後、フローサイトメトリーを使用したCALRの細胞周期への関与への検討を初めとした機能的解析を行い、メカニズムの詳細を検索していく。また臨床検体の検討により、口腔扁平上皮癌の発生や癌化を予測できるバイオマーカーとしての有用性を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Harada K, Harada T, Ferdous T, Takenawa T, Ueyama Y. Osteogenic cell fractions isorated from mouse tongue muscle. Mol Med Rep. 査読あり、2015 Jul;12(1):31-6. doi: 10.3892/mmr.2015.3350. Epub 2015 Feb 13.

〔学会発表〕(計 2 件)

Takenawa T, Harada K, Harada T, Ueyama Y, Basic research on combined effect of Cetuximab and Paclitaxel on oral cell carcinomas、The XXII Congress of EACMFS (European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery)、2014年9月23日~9月26日、プラハ(チェコ)

竹縄 隆徳、原田 耕志、上山 吉哉、口腔扁平上皮癌細胞を用いた Cetuximab の Paclitaxel 増強効果に関する基礎的検討、第68回口腔科学会学術集会、2014年5月7日~2014年5月9日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹縄 隆徳 (TAKENAWA, Takanori)
山口大学・医学部附属病院・診療助教
研究者番号：30711270