

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893167

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌細胞におけるインテグリン  $\alpha 6$  の蛋白翻訳後修飾とその機能解析

研究課題名(英文) Protein post-translational modifications and its function analysis of integrin beta6 in oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

藤井 隆彦 (FUJII, TAKAHIKO)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：50735264

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)：単量体の  $\alpha 6$  蛋白は翻訳後、細胞質内のプロテアソームにより分解されると考えられた。しかし、 $\alpha 6$  は  $\nu$  と二量体を形成することで、ユビキチン/プロテアソーム系による分解を受けず、安定発現していると推測された。

$\alpha 6$  の発現により、いずれの細胞外基質蛋白上での細胞増殖能は影響を受けなかったが、ラミニン以外の細胞外基質蛋白上での細胞遊走能が低下していた。蛋白分解活性に与える影響を検討すると、いずれの細胞外基質蛋白上でも上清中のMMP-9活性は低下したが、ウロキナーゼ活性は影響を受けなかった。ヌードマウスによる造腫瘍能に与える影響について検討すると、 $\alpha 6$  の発現により形成腫瘍の体積は抑制されていた。

研究成果の概要(英文)：After  $\alpha 6$  protein monomers translation, it was believed to be degraded by the proteasome in the cytoplasm. However,  $\alpha 6$  is by forming an  $\nu$  and dimer, is not subject to degradation by the ubiquitin / proteasome system, was estimated to be stable expression.

Expression of integrin  $\alpha 6$ , cell proliferation on any extracellular matrix proteins was not affected. However, cell migration capacity was reduced on extracellular matrix proteins other than laminin. When examined the effect on proteolytic activity of the integrin  $\alpha 6$ , the MMP-9 activity on all of the extracellular matrix proteins was reduced. However, urokinase activity was not affected. Results of investigation of effect on tumorigenicity, the volume of the tumor formed in nude mice was suppressed by the expression of the integrin  $\alpha 6$ .

研究分野：口腔外科

キーワード：医歯薬学 口腔外科学 口腔扁平上皮癌 浸潤・転移 インテグリン

1. 研究開始当初の背景

インテグリンは細胞外基質蛋白との接着分子として機能しているだけでなく、様々なシグナル伝達を調節し、器官発生や組織分化においても重要な役割を担っていることが知られている。本代表研究者は、扁平上皮癌細胞において、インテグリン 8 がユビキチン/プロテアソーム系で分解されることを見出してきた。インテグリン 8 同様、インテグリン v を唯一のカウンターパートとするインテグリン 6 の口腔扁平上皮癌における修飾機構と機能は未だ不明な点が多い。蛋白翻訳後修飾を解析することで、その発現を制御し増殖、転移における役割を解析できると予想された。

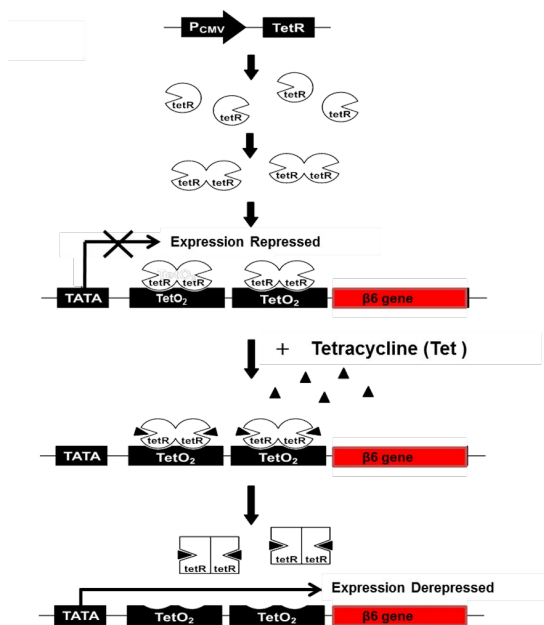
2. 研究の目的

本研究では、インテグリン 6 の蛋白翻訳後修飾とその機能解析を行うことで、口腔扁平上皮癌の機能制御標的となりうるかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌におけるインテグリン 6 の翻訳後修飾の解析と、v との二量体形成の 6 の安定化に与える影響についての検討

テトラサイクリン発現誘導システムを用いたインテグリン 6 の一過性発現系の構築  
インテグリン 6 蛋白の一過性発現のために、扁平上皮癌細胞に T-REx™ System (Life Technologies Corporation) にてテトラサイクリン (Tet) 発現誘導システムを構築、SCC 6T0 を作製した。



インテグリン 6 の転写後および翻訳後修飾の解析

テトラサイクリン (Tet) 存在下 (1 μg/ml) または Tet 除去、経時的に培養した SCC 6T0 の 6 蛋白、6mRNA 発現を Western blot 法及び RT-PCR 法にて解析した。

インテグリン 6 の蛋白翻訳後修飾に対する各種プロテアーゼ阻害剤の影響についての検討

Tet (1 μg/ml) 処理により SCC 6T0 に 6 蛋白発現を誘導した後、さらにリソソーム阻害剤 pepstatinA, カルパイン阻害剤 ALLN, あるいはプロテアソーム阻害剤 MG132 または lactacystin を添加した Tet を含まない培地で 24 時間培養し、6 蛋白の発現を Western Blot 法で解析した。

インテグリン v が、6 蛋白発現に与える影響についての検討

インテグリン v 発現ベクター pCl-neo/v を構築、pCl-neo/v を SCC 6T0 へ遺伝子導入し SCC v/ 6T0 を作製した。

共免疫沈降法によるインテグリン v と 6 の複合体形成についての検討

Tet (1 μg/ml) で 24 時間処理した SCC v/ 6T0 の cell lysate を、抗 v 抗体で免疫沈降した標品に対し、抗 6 抗体または抗 v 抗体を用いて Western blot を行った。

インテグリン 6 の蛋白翻訳後修飾に対するインテグリン v の影響

SCC 6T0 及び SCC v/ 6T0 を Tet (1 μg/ml) 24 時間処理後、Tet 非存在下で培養した際の 6 蛋白の経時的变化を Western blot 法にて解析した。

(2) インテグリン v 6 の扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖における機能解析

細胞外基質蛋白上での細胞増殖能の検討  
5 X 10<sup>3</sup> 個の SCC v/ 6T0 を、各種細胞外基質蛋白でコートした培養皿上で、Tet (1 μg/ml) 存在下 (Tet (+)) あるいは非存在下 (Tet (-)) で、5 日間無血清培養した後、増殖細胞数を算定した。

Boyden chamber の変法による細胞外基質蛋白上での細胞運動能の検討

メンブランを各種細胞外基質蛋白でコートしたケモタキセルの上室に、3 X 10<sup>5</sup> 個の SCC v/ 6T0 を加え、Tet (+) あるいは非存在下 Tet (-) で 24 時間培養後、メンブラン下面に遊走した細胞数を算定した。

Zymography による蛋白分解酵素活性の検討

SCC v/ 6T0 を各細胞外基質上で、Tet (+) あるいは Tet (-) で 24 時間培養後の培養上清中の、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) とプラスミノージェンアクチベーターを、それぞれゼラチンを基質としたザイモグラフィーと、プラスミノージェンを含むカゼインを基質としたザイモグラフィーにて解析した。

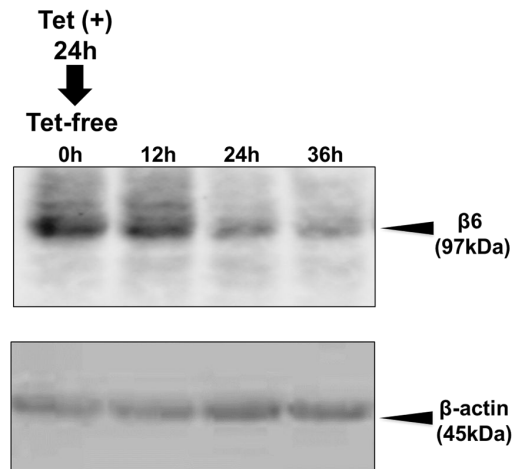
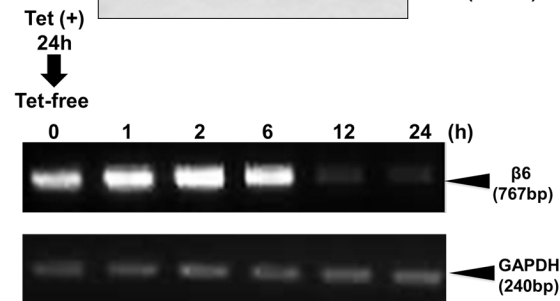
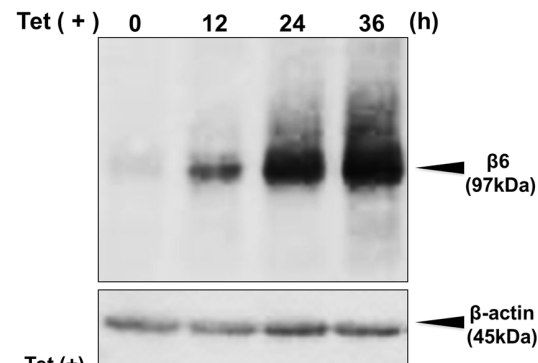
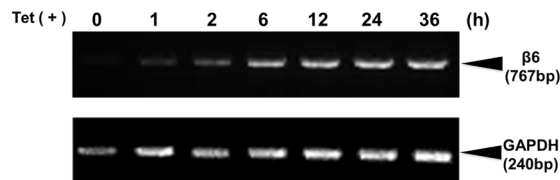
in vivo における造腫瘍能の検討  
 SCC v/ 6T0 ( $2 \times 10^6$  個) をヌードマウスの背部皮下に接種し, 200  $\mu$ g/ml のドキシサイクリンを含む Tet (+) あるいは Tet (-) 飲料水で 18 日間飼育後, 腫瘍を摘出し, 同腫瘍における 6 蛋白の発現を Western Blot 法と免疫組織染色にて解析した。

また, SCC v/ 6T0 ( $2 \times 10^6$  個) を, 4 週齢のヌードマウスの背部皮下に接種し, 接種直後より 200  $\mu$ g/ml のドキシサイクリンを含む Tet (+) あるいは Tet (-) 飲料水で 18 日間飼育し, 経時的に形成された腫瘍の体積を算定した。

#### 4. 研究成果

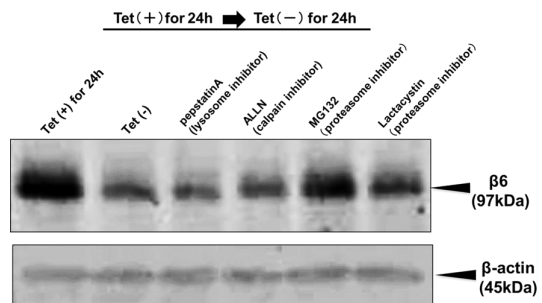
(1)

テトラサイクリン処理により, SCC 6T0 において一過性に発現誘導された 6 蛋白は, テトラサイクリン存在下で培養すると 2 時間後より mRNA 発現がみられ, 12 時間後にその発現が最大になった。また, 6 蛋白発現は, テトラサイクリン処理 12 時間後よりみられ, 経時的に発現が亢進した。テトラサイクリン処理した細胞をテトラサイクリン非存在下で培養すると, mRNA は 6 時間から 12 時間の間に, 6 蛋白は 12 時間から 24 時間後には著しく発現が低下した。このことから, 6 は蛋白翻訳後, 細胞内で分解等の修飾を受けていると推測された。



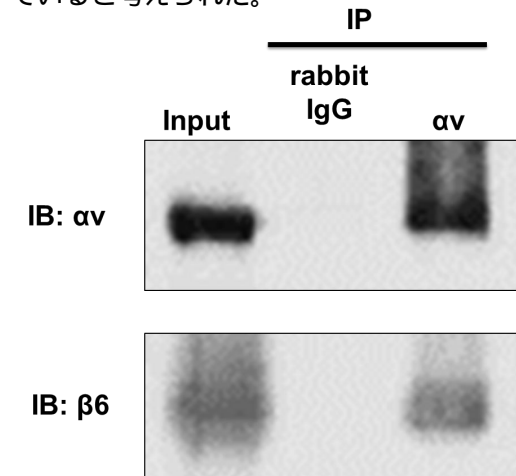
(1)

pepstatin A 及び ALLN の添加によっても, 6 蛋白発現は低下したが, プロテアソーム阻害剤の MG132 または lactacystin 添加により, 6 蛋白発現は維持されことから, 6 は蛋白翻訳後にユビキチン/プロテアソーム系で分解されていることが明らかとなった。SCC 6T0 は v をほとんど発現していないことから, SCC 6T0 において発現している 6 蛋白の大部分は単量体であり, 単量体の 6 がプロテアソームによって分解されたと考えられた。

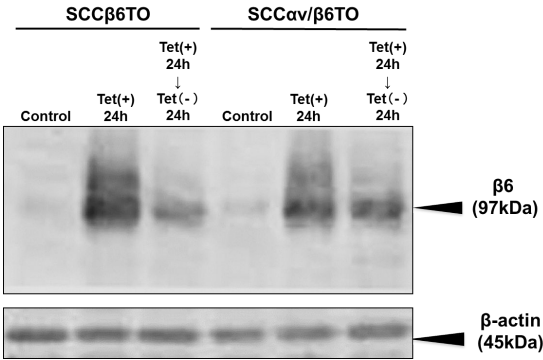


(1)

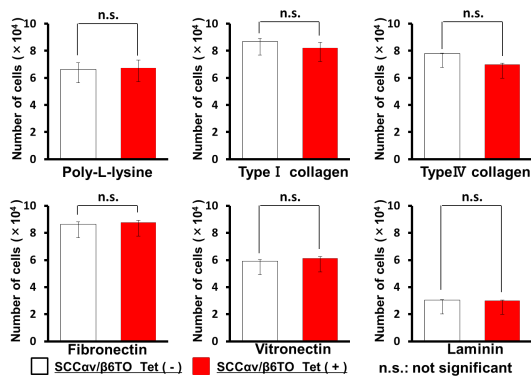
SCC v/ 6T0 の cell lysate は抗 v 抗体で免疫沈降した標品中にそれぞれ 6 が検出されたことから, 6 と v は二量体を形成していると考えられた。



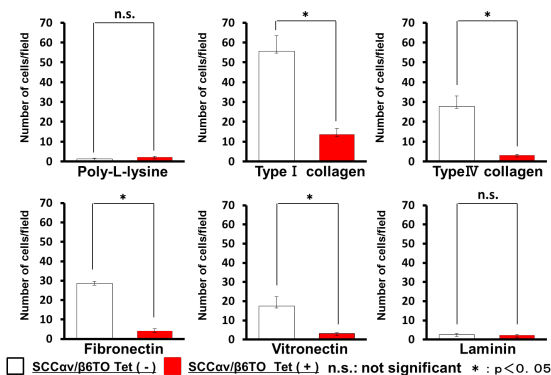
(1)  
 SCC 6T0 及び SCC v/ 6T0 においてテトラサイクリン処理により誘導された mRNA は、テトラサイクリン除去後すみやかに消失した。これに対し 6 蛋白は SCC v/ 6T0 においてはテトラサイクリン除去 24 時間後も、発現が維持されていたことから、6 は v と二量体を形成することでユビキチン/プロテアソーム系による分解を受けず、安定発現していることが推測された。



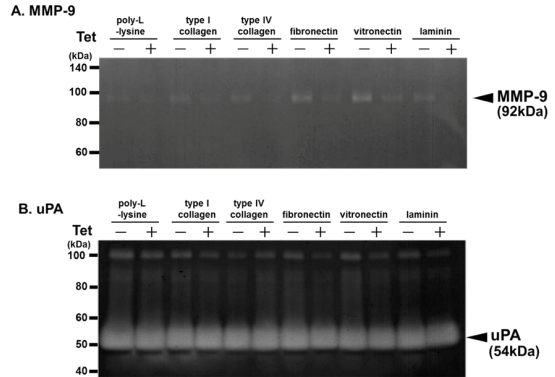
(2)  
 テトラサイクリン処理により 6 蛋白発現を誘導しても、SCC v/ 6T0 の細胞増殖能は影響を受けなかった。



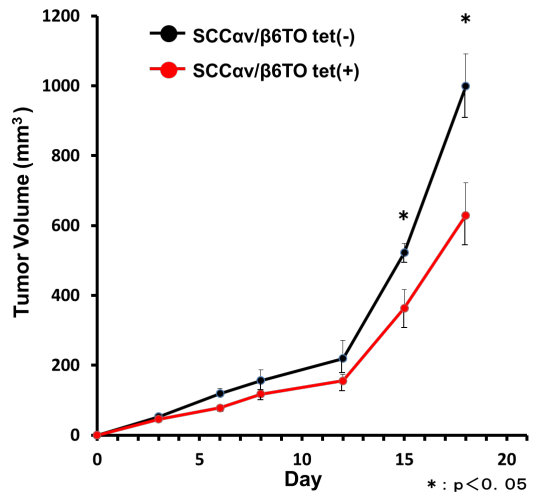
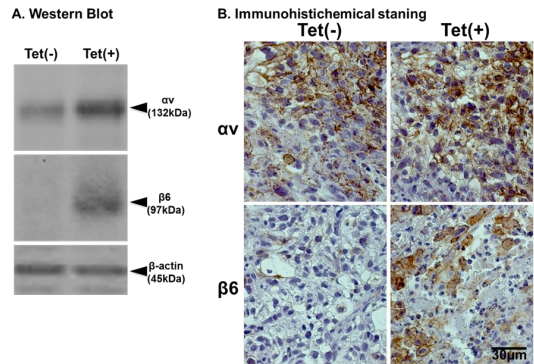
(2)  
 SCC v/ 6T0 は 6 蛋白発現が誘導されると、ラミニン以外の細胞外基質蛋白上での細胞遊走能が低下していた。



(2)  
 SCC v/ 6T0 は、MMP-9 とウロキナーゼ (u-PA) を産生していたが、6 蛋白発現誘導することで、ウロキナーゼ活性には影響を与えなかったが、MMP-9 活性を低下させた。



(2)  
 WesternBlot の結果から、テトラサイクリンを投与されたマウスに形成された腫瘍では、6 蛋白発現が強く誘導されていた。さらに、免疫組織染色から v 蛋白と 6 蛋白は、細胞膜上で発現しているが確認できた。また、テトラサイクリン投与群では、非投与群に比べ、ヌードマウスでの形成腫瘍の体積は、強く抑制されていたことから、v 6 発現は、扁平上皮癌細胞のヌードマウスでの造腫瘍能を低下させると考えられた。



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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 隆彦 (FUJII TAKAHIKO)  
広島大学・大学病院・歯科診療医  
研究者番号：50735264