

氏名	中山 周子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第 2019 号
学位授与の日付	平成12年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	ヒト口腔扁平上皮癌における浸潤・転移機構の解析 ー浸潤・転移能の異なる細胞株の樹立とE-cadherinの メチル化に関する検討ー
論文審査委員	教授 古田裕昭 教授 菅原利夫 教授 松村智弘

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔癌は周囲臓器への浸潤と高い頸部リンパ節転移により特徴づけられ、その為この浸潤と転移の制御は癌克服への最重要課題である。悪性腫瘍は様々なphenotypeの癌細胞の集まりであることから、原発巣には浸潤・転移能の異なる細胞が混在していることが報告されている。これらの研究を行う上で、浸潤・転移能の異なる同一個体からの細胞株の樹立は不可欠である。しかしながら、ヒトの同一個体からの浸潤・転移能の異なる細胞株の樹立は報告されていない。今回、ヒト舌扁平上皮癌患者の同一個体の原発巣より浸潤・転移能の異なる二種類の細胞株UM1・UM2の樹立に成功したので、その生物学的性状を検討した。

癌の転移は複数の複雑な段階があり、癌の転移過程の初期段階である癌細胞の原発巣からの離脱に細胞間接着因子であるE-cadherinの発現低下が関与し、浸潤・転移形成に影響を及ぼすことが報告されている。近年、癌の発生や進展に関して遺伝子のgeneticな変化よりも可逆的変化であるepigeneticな変化が脚光を浴び、その現象の1つにDNAのメチル化が挙げられるが、そのDNAのメチル化がE-cadherinの発現の調節に関与する可能性が指摘されている。本研究では、口腔扁平上皮癌におけるE-cadherinの発現とそのCpG Island DNAのメチル化との関係を明らかにするために、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株および口腔癌組織を用いてE-cadherin蛋白の発現とメチル化について検討した。更に、我々が樹立した浸潤・転移能の異なる細胞株UM1・UM2を用いて、*In vitro*における浸潤・転移とE-cadherinの発現異常及びそのCpG Island DNAのメチル化との関係について検討を加えた。

【材料および方法】

細胞株の樹立とその性状

細胞は47歳男性の舌癌患者の未治療の原発巣の一部を組織培養法を用いて分離した。更に、限界希釈法を用いて、散在性の増殖様式を示すもの(UM1)、および島状の増殖様式を示すもの(UM2)の二種類の細胞株を樹立した。この細胞株の性状の検索として細胞増殖能、免疫染色によるケラチン蛋白、Western blot法によるE-cadherin蛋白の発現、ヌードマウスへの造腫瘍性、および、Gelatine Zymogramによる細胞外基質の分解能について検討した。

浸潤・転移能の解析

Wound assayおよび金コロイド法で運動能、Raft culture法で浸潤能、また、経尾静脈モデルを用いた

培養細胞株および臨床材料におけるE-cadherin蛋白の発現

細胞株は高転移細胞株UM1, 低転移細胞株UM2および理化学研究所細胞開発銀行及びヒューマンサイエンス研究資源バンクより供与された12種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いた。これらの細胞株のE-cadherin蛋白の検出はWestern blot法により行い, E-cadherin蛋白の定量は, ELISAにて行った。

臨床材料は岡山大学歯学部附属病院第二口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌患者で, 生検材料および術前治療を行わなかった症例の手術材料を用いた。臨床材料のE-cadherin蛋白の局在の検出は免疫組織化学染色により行い, E-cadherin蛋白の発現様式の評価は塩崎らの分類に従った。

培養細胞株および臨床材料におけるメチル化の解析

E-cadherin遺伝子のプロモーター領域の CpG Islandのメチル化についてMethylation Specific PCR (MSP) を用いて検索した。

脱メチル化剤5-Azacytidine処理によるUM1, UM2のE-cadherin 蛋白の発現およびその機能に関する検討

UM1, UM2を脱メチル化剤である10 μ M 5-Azacytidine (Sigma)で処理し, 形態観察, Western blot, およびRaft culture法を行い, 脱メチル化による影響を検討した。

【結果】

1. 同一患者の原発部位から樹立した細胞株の性状は, 両細胞株の増殖能に差はなく, ケラチン蛋白陽性で, いずれもヌードマウス可植性を示した。Gelatin Zymogramでは, MMP-2, 9の産生を両細胞株で認めたが, 特にUM1において高く, 活性型MMP-2も認めた。また, 浸潤・転移能の解析では, Wound assayおよび金コロイド法でUM1はUM2と比較し運動能が高く, Raft culture法ではUM1は強い浸潤能を示した。更に, 経尾静脈モデルおよびリンパ節転移モデルではいずれもUM1に高い転移能を認めた。以上の結果より, 高浸潤・高転移能を示すUM1と, 低浸潤・低転移能を示すUM2が樹立できた。
2. 口腔扁平上皮癌細胞株ではメチル化されている細胞株ではE-cadherin蛋白発現の低下が認められ, 逆に非メチル化を示す細胞株では蛋白発現があり, 蛋白の発現量に有意差が認められた。口腔癌組織においても同様の傾向を認めた。
3. 樹立したUM1はUM2と比較し, E-cadherin蛋白の発現が低下しており, UM1にメチル化が認められたが, UM2では認められなかった。
4. UM1を5-Azacytidineで処理したところ, メチル化は検出されなくなり, E-cadherin蛋白が回復し, 強い細胞接着を示し, UM2と同様に島状に増殖するのが観察された。更にRaft culture法にてUM1はゲル上への細胞の重層と, 浸潤の抑制を認めたが, UM2では特に変化を認めなかった。

【考察】

同一個体の原発巣から高浸潤・高転移能を示すUM1と, 低浸潤・低転移能を示すUM2が樹立でき, 悪性腫瘍は様々なphenotypeの癌細胞の集まりであることが傍証できた。また, Fidlerらが行った方法とは異なり, 転移過程におけるhost selection pressuresによる影響を受けていない原発巣から浸潤・転移能の異なる細胞株の樹立に成功した点から, 原発巣における浸潤・転移能の獲得に関与した遺伝子や, 転移形質に関わる分子の探索に有用なモデルになると期待できる。

E-cadherinは, その減弱が浸潤・転移形成と相関することから注目されている。本研究では, 口腔扁平上皮癌におけるE-cadherinの発現異常の原因をepigeneticな変化の一つであるDNAのメチル化に着目し検討を行った。口腔扁平上皮癌細胞株, 及び臨床検体について検索した結果, E-cadherin蛋白の発現の低下へのCpG Islandのメチル化の関与が示唆された。また, UM1を脱メチル化させE-cadherin蛋白の発現が回復したことは, 上述のメチル化がE-cadherin蛋白の発現低下に深く関与しているという考えを裏付けるものであった。UM1を脱メチル化させることにより, E-cadherin蛋白の再発現だけでなく, 細胞の増殖形態がE-cadherin蛋白の発現の高いUM2に類似した強い細胞接着を示す性格を呈したことは, 5-Azacytidine処理により脱メチル化を起こし, E-cadherin遺伝子のsilencingから解放され, 細胞はClonal changeを引き起こすという報告に矛盾のない結果が得られ, この再発現は機能的なE-cadherinの再発現を導いていると考えられる。これらのUM1, UM2細胞株を用いた結果は, 口腔癌の原発巣におけるE-cadherin遺伝子のスイッチのon/off機構にCpGのメチル化が関与することを示唆した。癌細胞が転移する以前に原発巣での浸潤・転移能を有する細胞の存在を予測する因子を同定することは临床上重要となる。本研究の結果から, E-cadherin geneのメチル化は転移予知因子としてのみならず, このメチル化を標的とした治療戦略が展開できる可能性を秘めており, 口腔癌患者の治療に貢献するものと考えられる。

論文審査結果の要旨

癌細胞の浸潤・転移は癌治療上の大きな問題であり、この機構の解明は重要な研究課題である。本研究前半においては、ヒト舌扁平上皮癌患者の同一癌原発部位より浸潤・転移能の異なる2種類の細胞株UM1・UM2の樹立に成功、その生物学的性状を比較検討した。

近年、癌細胞の転移過程において細胞接着因子の活躍が注目されている。上記2種類の癌細胞の性状は接着因子の中、E-cadherinの発現の相違が顕著であったので、本研究後半部分では、E-cadherinの発現異常と浸潤能などとの関連性をE-cadherin遺伝子のメチル化に注目し研究を行った。低浸潤・低転移能を示すUM2はE-cadherin蛋白の発現が低く、E-cadherin遺伝子は非メチル化状態であったのに対し、高浸潤・高転移能を示すUM1はE-cadherin蛋白の低下がみられ、遺伝子のメチル化が検出された。UM1を脱メチル化すると蛋白の回復・浸潤の抑制が認められた。

本研究においては、癌の浸潤・転移機構を研究する上で有用な細胞株を樹立し、その細胞株を用いて浸潤・転移過程において細胞接着因子であるE-cadherinの発現が関与することを明らかにした。さらに、E-cadherin遺伝子のメチル化が浸潤と関連する可能性を示すと同時に、この遺伝子のメチル化を標的とした転移治療の可能性をも示唆しており、口腔癌の浸潤・転移の研究を行うにあたり、本研究内容は価値あるものである。

したがって、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。