The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	口腔癌細胞株HSC-3の浸潤能におけるESE-1の関与
Author(s)	雨河, 茂樹
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41882
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【15】

氏　　名	雨河茂樹（あめかわしげき）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　15343　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	**口腔癌細胞株HSC－3の浸潤能におけるESE－1の関与**
論文審査委員	（主査） 教授　作田　正義 （副査） 教授　米田　俊之　　講師　豊澤　悟　　講師　村上　伸也

論文内容の要旨

【目的】

癌細胞は細胞外基質を分解し、周囲の組織に浸潤する性質によって癌の再発・転移を惹起する。癌細胞の細胞外基質分解にはmatrix metalloproteinases（MMPs）やurokinase type plasminogen activator（u－PA）等が重要な役割を果たしている。これらの蛋白分解酵素をコードする遺伝子の中には転写制御領域にets結合配列を有するものがあり、ets転写因子の制御下で癌の浸潤・転移に関与している。

ESE－1は上皮細胞においてのみ発現するetsファミリー転写因子であり、上皮特異的遺伝子の発現制御を介して表皮の最終分化とケラチノサイトの分化に関与すると考えられている。また、細胞の増殖、分化、細胞外基質合成などのシグナル伝達に関わるTGF－βのtypeⅡ receptorの発現をESE－1が制御していることなどがこれまでに報告されている。しかし上皮細胞特異的ESE－1がMMPsやu－PAの発現制御を介して癌の浸潤、転移へ関わる可能性については検討されていない。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌の浸潤、転移におけるESE－1の関与を分子生物学的実験方法にて検討した。

【実験方法及び結果】

まず口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能に与えるESE－1の影響を調べるため、浸潤能が低いKB細胞と、浸潤能が高いHSC－3細胞を用い、それぞれの細胞にESE－1発現ベクターをリポフェクション法によって導入した。ノーザンブロッティングによる解析からKB細胞及びHSC－3細胞の親株ではESE－1 mRNAの発現が弱いのに対し、トランスフェクタントではESE－1を強発現していることが確認された。次いで各々の親株、空ベクター導入株及びトランスフェクタントを用いてMatrigelインベージョンアッセイを行い、ESE－1による基底膜浸潤能の変化をin vitroで評価した。KB細胞では浸潤能に変化を認めなかったがHSC－3の浸潤能は有意に（$p<0.01$）抑制された。Matrigel浸潤能の結果がⅣ型コラーゲナーゼの変化によるか否かをin vitroで検討するためゼラチンザイモグラフィーを行ったところKB細胞では親株、トランスフェクタントとも全く酵素活性を示さなかったが、HSC－3細胞ではトランスフェクタントにおいてMMP－9（92kD typeⅣ collagenase）の酵素活性が顕著に低下した。MMP－9の活性とmRNA発現との相関を調べるためにノーザンブロッティングを行ったところ、KB細胞では発現を認めなかったのに対し、HSC－3細胞ではトランスフェクタントにおいてMMP－9 mRNAの発現は約50％に低下した。このことからKB細胞ではMMP－9の発現が抑制されているためESE－1を強発現させても浸潤に影響がないことが示

唆された。一方HSC－3細胞ではMMP－9の発現が抑制されることでMMP－9の酵素活性が低下しMatrigelへの浸潤が抑制されたと考えられた。そこでESE－1によるMMP－9遺伝子の転写制御を調べるため、ESE－1発現ベクターとMMP－9のプロモーター領域（－670～＋34）をルシフェラーゼレポーターに組み込んだMMP－9ルシフェラーゼレポーターをHSC－3細胞にco-transfectionしルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ESE－1の量依存的にルシフェラーゼ活性の低下を認めた。この結果からESE－1が転写因子としてMMP－9の発現を抑制することが示された。またMMP－9上流のets結合配列（EBS）に変異を加え同様のルシフェラーゼアッセイを行ったところ活性は低下しなかった。このことからESE－1はEBSを介して転写を抑制することが明らかとなり、ESE－1によるMMP－9の直接的な転写制御が示唆された。

さらに本学歯学部付属病院第二口腔外科を受診した5名の口腔扁平上皮癌患者より癌組織を採取しESE－1の発現をin situ hybridization（ISH）法にて調べたところ、角化層の下方の癌組織で発現しており、癌組織の浸潤部分及び角化層では発現がみられなかった。

【結論】

以上の結果より口腔扁平上皮癌細胞株HSC－3においてESE－1を高発現させた場合、MMP－9 mRNAの発現がEBSを介して抑制されることでMMP－9の酵素活性が低下し、その結果HSC－3細胞のMatrigelへの浸潤能が抑制されることが示された。また口腔癌細胞のISHの結果から癌組織の浸潤局面においてESE－1の発現が消失することでMMP－9が発現するのではないかと考察された。これらの結果は上皮由来の一部の癌の浸潤、とりわけ基底膜分解においてESE－1が抑制的に働くことを示唆し、癌細胞の浸潤機構を理解するうえで重要な知見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、口腔扁平上皮癌の浸潤、転移におけるESE－1（etsファミリー転写因子）の関与を分子生物学的実験法にて検討したものである。

その結果、口腔扁平上皮癌細胞株であるHSC－3細胞においてESE－1を高発現させた場合、MMP－9 mRNAの発現がESE－1を介して抑制されることでMMP－9の酵素活性が低下し、その結果HSC－3細胞の基底膜類似物質への浸潤能が抑制されることが示された。また、口腔癌組織のin situ hybridizationの結果から癌組織の浸潤局面においてESE－1の発現が消失することでMMP－9が発現する可能性を示唆した。

これらの結果は上皮由来の一部の癌の浸潤、とりわけ基底膜分解においてESE－1が抑制的に働くことを示唆し、癌細胞の浸潤機構を理解する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。