



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | $\beta$ -cateninの細胞内集積が口腔扁平上皮癌細胞の生物学的特性に及ぼす影響   |
| Author(s)    | 孔, 知恵   |
| Citation     | 大阪大学, 2008, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49238">https://hdl.handle.net/11094/49238</a>   |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 孔 知 恵  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (歯 学)  |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 1 9 0 7 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 20 年 3 月 25 日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>歯学研究科統合機能口腔科学専攻                        |
| 学 位 論 文 名     | $\beta$ -catenin の細胞内集積が口腔扁平上皮癌細胞の生物学的特性に及ぼす影響             |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 由良 義明<br>(副査)<br>教 授 阪井 丘芳 准教授 大倉 正也 講 師 前田 隆史 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [研究目的]

Wnt シグナル伝達経路は動物の形態形成の際に多彩な役割を演じるだけでなく、細胞の増殖や分化の制御に重要である。この Wnt シグナル伝達経路の中心的な構成分子のひとつが細胞接着に關与する  $\beta$ -catenin である。大腸癌を始め多くの癌において Wnt シグナル伝達経路の破綻による  $\beta$ -catenin の細胞質や核での異常な蓄積と Tcf/Lef の転写活性の亢進による標的遺伝子の高発現が報告されており、そのなかには細胞の増殖や浸潤に關連する標的遺伝子も含まれている。

口腔扁平上皮癌組織においても  $\beta$ -catenin が細胞質や核に蓄積するとの報告がみられる。しかしながら、この  $\beta$ -catenin の細胞内集積が癌の浸潤や転移にどのような影響を及ぼすかについては、ほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では口腔扁平上皮癌細胞における  $\beta$ -catenin の発現と  $\beta$ -catenin 遺伝子を導入することによる口腔扁平

上皮癌細胞の細胞生物学的特性の変化について検討を行った。

### [材料と方法]

1. ヒトの口腔扁平上皮癌細胞株として、Ca9-22、FI、HSC-2、HSC-3、KB、SAS 細胞を用いた。2. トランスフェクションには  $\beta$ -catenin 遺伝子の exon3 を欠失した  $\beta$ -catenin 遺伝子が組み込まれたプラスミドベクターを用い、geneticin による選択を行った。なお、このプラスミドベクターは Tet-off system であり、ドキシサイクリン存在下では導入された遺伝子が発現しない。3. mRNA の発現を検出するために、 $\beta$ -catenin 遺伝子の exon3 を挟むプライマーを設計し、RT-PCR 法を行った。定量的測定には real-time RT-PCR 法を用いた。4.  $\beta$ -catenin タンパク質は、 $\beta$ -catenin 抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて検出し、局在は  $\beta$ -catenin 抗体を用いて蛍光染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。5. 増殖能は細胞増殖曲線、遊走能はマイグレーションアッセイ、浸潤能はマトリゲルインベージョンアッセイにて測定した。6. 転写活性の測定では、Tcf の DNA 結合配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだプラスミド TOPflash をトランスフェクションし、 $\beta$ -catenin-Tcf/Lef 複合体の転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。negative control として変異させた DNA 結合配列を組み込んだプラスミド FOPflash を用いた。7. matrix metalloprotease 7 (MMP7) の活性は、無血清の培養液にかえて培養した細胞上

清を検体として採取し、カゼインザイモグラフィーにて検出した。

#### [結果]

#### 1. 培養口腔扁平上皮癌細胞における $\beta$ -catenin の発現

口腔扁平上皮癌細胞を抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いて蛍光染色を行った結果、Ca9-22 細胞を除く他の 5 細胞株では細胞質及び核における  $\beta$ -catenin の集積が認められた。これに対し、Ca9-22 細胞では  $\beta$ -catenin が細胞質や核に局在せず、細胞膜にのみ局在した。

#### 2. 変異 $\beta$ -catenin 導入細胞株の確立

Ca9-22 細胞に変異した  $\beta$ -catenin 遺伝子をトランスフェクションし、geneticin に抵抗性を示し安定な増殖を示す細胞株のうち、RT-PCR 法とウェスタンブロッティング法で恒常的に変異型  $\beta$ -catenin の発現を確認できる 2 株が得られ、それぞれ C1、C5 と命名した。導入したプラスミドは Tet-off system であるため、2 ng/ml の濃度のドキシサイクリン存在下では導入遺伝子の発現はみられなかった。 $\beta$ -catenin の局在を蛍光染色法で調べたところ、親株では  $\beta$ -catenin が細胞膜に限局するのにに対し、C1 と C5 では細胞質や核で存在が観察された。

#### 3. 変異 $\beta$ -catenin 導入細胞の細胞形態と増殖様式

親株の Ca9-22 と遺伝子導入細胞である C1 と C5 で増殖能に差はみられなかったが、細胞形態では親株が多角形で細胞間接着が密なコロニーを形成したのに対して、C1 と C5 は紡錘形を呈し、細胞間の接着が疎なコロニーを形成した。

#### 4. 変異 $\beta$ -catenin 導入細胞の遊走能と浸潤能

遊走能をマイグレーションアッセイで、浸潤能をマトリゲルインバージョンアッセイにて測定した結果、いずれも親株と比較して C1 と C5 で亢進していた。

#### 5. Wnt シグナル伝達経路における転写活性

$\beta$ -catenin-Tcf/Lef 複合体の転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した結果、親株に比べ C1 と C5 において転写活性の亢進が認められた。

#### 6. MMP7 の発現と活性

報告されている Wnt シグナル伝達経路の標的遺伝子について、その発現を RT-PCR にて調べたところ、親株に比べ C1 と C5 において MMP7 の mRNA レベルの発現上昇が認められた。細胞外に分泌される MMP7 活性を測定するために培養上清を調整し、カゼインザイモグラフィーを行ったところ、親株に比べ C1 と C5 で上昇がみられた。

#### [考察]

口腔扁平上皮癌細胞株の大多数で  $\beta$ -catenin の細胞内集積を認めた。細胞膜に  $\beta$ -catenin が限局する口腔扁平上皮癌細胞に  $\beta$ -catenin 遺伝子を導入して細胞内に  $\beta$ -catenin を集積させると、細胞の形態が変化して紡錘形を呈し、遊走能と浸潤能が亢進することが明らかとなった。これらの遺伝子導入細胞では  $\beta$ -catenin-Tcf/Lef 複合体の転写活性が上昇しており、遊走能ならびに浸潤能の亢進には基質を分解する MMP7 をはじめとする Wnt シグナル伝達経路の標的遺伝子の転写の上昇が関与するものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は口腔扁平上皮癌における  $\beta$ -catenin の細胞内集積の意義について変異型  $\beta$ -catenin 遺伝子を用いて研究したものである。その結果、口腔扁平上皮癌細胞における  $\beta$ -catenin の細胞内集積が、MMP7 をはじめとする Wnt シグナル伝達経路の標的遺伝子の転写活性を介して細胞の遊走能と浸潤能の亢進をもたらすことを明らかにした。

以上の結果は、口腔扁平上皮癌の浸潤ならびに転移のメカニズムを解明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。