



Title	口腔扁平上皮癌細胞の基底膜への浸潤能に関する検討
Author(s)	久島, 潔
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49244
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

氏 名	久 島 潔 <small>きよし</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 9 0 4 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 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	口腔扁平上皮癌細胞の基底膜への浸潤能に関する検討
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 古 郷 幹 彦 (副査) 教 授 上 崎 善 規 講 師 中 澤 光 博 講 師 森 本 佳 成

論 文 内 容 の 要 旨

[研究目的]

癌細胞の浸潤・転移の複雑なプロセスの中で基底膜基質を分解する過程は、癌細胞を制御する上で、最も重要な過程のひとつと考えられる。癌細胞による基底膜基質分解の過程を分子レベルで解析し、この過程を特異的に制御することができれば癌細胞の浸潤・転移を防ぐことは可能となる。われわれは癌細胞による基底膜基質分解を *in vitro* で観察することが可能なフィブロネクチン分解・浸潤モデルを用い、その分子機構の解明を行ってきた。

一方、口腔扁平上皮癌治療時、組織悪性度の判定基準として山本・小浜の分類 (Y-K 分類、1982 年) が用いられている。これまでに臨床的研究により口腔扁平上皮癌の Y-K 分類の浸潤様式の違いによる遠隔転移とその予後に関する報告が多数みられる。しかしその浸潤様式の分子機構に関しては不明な点が多い。そこで本研究では浸潤様式の異なったヒト扁平上皮癌由来の 3 種の細胞株を用いて以下の点を検討した。

1. 3 種の口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能と低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho、Rac、Cdc42 の発現および活性の差異の検討
2. 口腔扁平上皮癌細胞と線維芽細胞を混合培養することによる浸潤能の変化
3. 混合培養条件下における基底膜分解酵素 (MMP-2、MT1-MMP) の発現が浸潤能に与える影響

[実験方法]

1. 実験に用いた細胞

実験には口腔粘膜由来のヒト扁平上皮癌細胞で、Y-K 分類において 3 型、4C 型および 4D 型の浸潤像を示す細胞株 OSC-20 細胞、OSC-19 細胞、HOC313 細胞、および外科的に切除されたヒト口唇より得られた線維芽細胞を用いた。

2. フィブロネクチン分解・浸潤アッセイと線維芽細胞との混合培養モデル

スライドガラス上にゼラチンをコートし、FITC ラベルしたフィブロネクチンを結合させ、その基質上で扁平上皮癌細胞を培養した。癌細胞によって分解されたフィブロネクチンフィルムを蛍光顕微鏡で観察し、フィブロネクチンが分解された面積を NIH イメージソフトにて定量的に測定し、基底膜への浸潤能を評価した。さらに扁平上皮癌細胞と線維芽細胞との混合培養条件下での基底膜への浸潤能の差異を比較検討した。

3. 3種の口腔扁平上皮癌細胞の低分子量 GTP 結合蛋白 Rho、Rac、Cdc42 の発現と活性測定

扁平上皮癌細胞の低分子量 GTP 結合蛋白 Rho ファミリー Rho、Rac、Cdc42 各々の定性的発現をウエスタンブロット、定量的発現を免疫沈降法、その活性をプルダウンアッセイを用いて検討を行った。

4. 3種の口腔扁平上皮癌細胞の基底膜分解酵素 (MMP-2、MT1-MMP) の発現と活性の差異

3種の口腔扁平上皮癌細胞の基底膜分解酵素 (MMP-2、MT1-MMP) の発現をウエスタンブロット、活性をゼラチンザイモグラフィにて観察した。

5. MT1-MMP および MMP-2 の siRNA 導入

扁平上皮癌細胞と線維芽細胞にマトリックスメタロプロテアーゼ-2 (MMP-2) と膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MT1-MMP) の siRNA をリポフェクション法にて細胞へ導入し、ウエスタンブロットにてプロテアーゼの発現を確認し、フィブロネクチン分解・浸潤アッセイにて浸潤能への影響を観察した。

6. 混合培養条件下における、基底膜分解酵素 (MMP-2、MT1-MMP) 抑制による基底膜への浸潤能の変化

MMP-2 と MT1-MMP の siRNA を癌細胞に導入した場合、線維芽細胞に導入した場合、癌細胞と線維芽細胞両者に導入した場合での浸潤能の変化を比較検討した。

[実験結果]

1. 3種の扁平上皮癌細胞の浸潤能

浸潤能を比較すると、OSC-20 細胞の浸潤能が一番高く、次に OSC-19 細胞、HOC313 細胞の順となった。

2. 低分子量 GTP 結合蛋白 Rho、Rac、Cdc42 の発現と活性

3種の扁平上皮癌細胞ともに Rho、Rac、Cdc42 の恒常的発現が認められた。その活性は HOC313 細胞では Rho の活性、OSC-20 細胞では Rac の活性、OSC-19 細胞では Cdc42 の高い活性が認められた。

3. 線維芽細胞との混合培養比率を変化させた場合での癌細胞の浸潤能と混合培養条件下における 3種の口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能の変化

癌細胞と線維芽細胞との混合培養比率を変化させて浸潤能を比較検討した結果、癌細胞と線維芽細胞の比率が 2 : 1 の場合に浸潤能が一番亢進し、この比率を混合培養条件とした。次に混合培養条件下での 3種の口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能を観察したところ、すべての口腔扁平上皮癌細胞で線維芽細胞と混合培養することにより浸潤能は亢進した。特に HOC313 細胞は、混合培養条件下にて著明な浸潤能の亢進を認めた。

4. 扁平上皮癌細胞と線維芽細胞への MMP-2、MT1-MMP の siRNA 導入によるプロテアーゼ発現、および基底膜への浸潤能の検討

癌細胞、線維芽細胞ともに siRNA 導入後、MMP-2、MT1-MMP の発現は低下した。また癌細胞の基底膜への浸潤能が抑制された。

5. 混合培養条件下における、扁平上皮癌細胞と線維芽細胞のプロテアーゼ抑制による基底膜への浸潤能の変化

MMP-2 に関しては、線維芽細胞側の MMP-2 を抑制した場合に、浸潤能が顕著に抑制された。また MT1-MMP に関しては、扁平上皮癌細胞側の MT1-MMP を抑制した場合に、浸潤能は著明に抑制された。

[考察]

Y-K 分類による浸潤様式の異なる、3種類の扁平上皮癌細胞において組織悪性度と癌細胞単独の基底膜への浸潤能では相関関係が認められなかった。生体に近い環境モデルとして線維芽細胞と扁平上皮癌細胞を混合培養した条件で

基底膜への浸潤能を比較した結果、臨床的に悪性度が高いものの、フィブロネクチン分解・浸潤アッセイでは高い浸潤能を示さなかった HOC313 細胞が、著しく浸潤能の亢進を示した。

プロテアーゼに関しては、扁平上皮癌細胞は線維芽細胞の分泌している MMP-2 を有効に利用し、自身の MT1-MMP 発現をプロテアーゼカスケード活性化のキートリガーとしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は口腔扁平上皮癌細胞の基底膜浸潤の分子機構について研究を行ったもので、癌細胞を線維芽細胞と混合培養することで浸潤能が亢進すること、siRNA を用いてそれぞれのプロテアーゼの発現を阻害することにより、癌細胞自身の MT1-MMP をプロテアーゼ活性化カスケードのキートリガーにしている可能性があることを示唆しており、学位（歯学）授与に値するものと認める。