

Title	Reptin遺伝子によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の基底膜浸潤制御機構の解明
Author(s)	徳宮, 元富
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/58419">http://hdl.handle.net/11094/58419</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	徳宮元富
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 24463 号
学位授与年月日	平成 23 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	Reptin 遺伝子によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の基底膜浸潤制御機構の解明
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 豊澤 悟 講師 上松 節子 講師 本間 志保

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

原発巣で増殖した癌細胞は多数の複雑なプロセスを経て遠隔転移を成立させている。なかでも癌細胞が細胞外基質を分解し、組織間を移動する過程は、癌細胞の浸潤・転移に最も重要な過程と考えられる。われわれは癌細胞による細胞外基質分解を *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、転移抑制を目標に分子標的治療のターゲット分子の検討を行ってきた。

近年、いくつかのクロマチンリモデリング因子が同定され、クロマチン構造を変化させ、GTP のプロモータへの結合を助ける本来の役割のみならず、細胞増殖、遺伝子発現、など種々の細胞動態に関与していることが解ってきた。しかしながら、このクロマチンリモデリング因子が癌細胞の浸潤・転移の過程にいかなる影響を及ぼしているかに関してはほとんど解明されていない。

本研究ではクロマチンリモデリングコンプレックスの一つである、**reptin** 遺伝子に焦点を当て、**reptin** がヒト口腔扁平上皮癌の浸潤・転移といかに関わっているのか、その制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 【材料と方法】

実験には浸潤様式の異なる 2 種のヒト口腔扁平上皮癌細胞株である OSC-19 細胞、OSC-20 細胞を用いた。各々の口腔扁平上皮癌細胞を  $2 \times 10^6$ /well で 6 穴プレートに播き、24 時間培養した後、**reptin** の siRNA を **superfect** を用いて導入し、さらに 24 時間培養した。各々の処理した細胞を用い、**Invasion assay**、**Wound healing assay** で浸潤能、遊走能を測定した。**Invasion assay** は **Boyden chamber** 法を用い、マトリジェルを浸潤

し、径 8 $\mu$ m ポアのメッシュを潜り抜けた細胞数をカウントすることにより、浸潤能の比較検討を行った。Wound healing assay は 24 穴プレートに 1000 $\mu$ l のクリスタルチップを用いてスクラッチを行い、径約 1 mm の wound field を作製し、6 時間後、12 時間後の wound field の幅を計測し、その差を測定した。さらにそれぞれの細胞形態の変化を観察するとともに、上皮系・間葉系マーカーの発現や、E-cadherin の転写抑制因子である Snail、Slug、Twist の発現を Western blotting で確認し、Gelatin zymography によりマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の発現、活性の測定を行った。さらに、アクチン重合を制御し、細胞運動に関与する低分子量 GTP 結合蛋白質である Rho、Rac、Cdc42 の定量的発現を免疫沈降法にて確認した。

#### 【研究結果】

1. Invasion assay では 2 つの細胞株で reptin の knockdown 群での細胞の浸潤能が、control 群、wild type 群と比較して有意に亢進していた。
2. Wound healing assay で遊走能を測定したところ reptin の knockdown 群での細胞の遊走能が、control 群、wild type 群と比較して亢進していた。一方、MMP-2、MMP-9 の発現および活性については、2 種の細胞株で reptin の knockdown 群とその他の群で差はみられなかった。
3. Reptin の knockdown 群と control 群、wild type 群で細胞形態の変化を観察したところ、2 つの細胞株で knockdown 群では線維芽細胞様の紡錘形の形態変化を認めた。
4. 低分子量 GTP 結合蛋白質の発現に関しては、reptin knockdown 群で OSC-19 細胞では Cdc42 が、OSC-20 細胞では Rac の発現が亢進していた。
5. Reptin の knockdown 群と control 群、wild type 群で上皮系マーカーである E-cadherin、Cytokeratin と間葉系マーカーである N-cadherin、Vimentin の発現を比較したところ、reptin を knockdown した群で上皮系マーカーの発現の低下と間葉系マーカーの発現の亢進が認められ、さらに E-cadherin の転写抑制因子である Snail、Slug、Twist の発現のなかで、Snail の発現の亢進が認められた。

#### 【考察および結論】

Reptin 遺伝子を knockdown することで、OSC-19 細胞、OSC-20 細胞ともに浸潤能、遊走能の有意な亢進が認められた。そのメカニズムとして考えられる、細胞外基質分解酵素の発現については、Gelatin zymography にて MMP-2、MMP-9 の発現および活性が、reptin knockdown 群と control 群、wild type 群とで差は見られないことより、reptin は細胞外基質の分解活性に直接的に関与していないことが示唆された。

細胞骨格の制御の観点から、Rho family (Rho、Rac、Cdc42) の定量発現を免疫沈降法にて確認した結果、reptin knockdown 群で OSC-19 細胞では Cdc42 が、OSC20 細胞では Rac の発現が亢進しており、低分子量 GTP 結合蛋白質の関与が示唆された。

癌の進展は上皮間葉移行 (EMT) という現象が大きく関与していると考えられている。reptin knockdown 群で、上皮系マーカーの発現の低下と間葉系マーカーの発現の亢進が認

められ、さらに E-cadherin の転写抑制因子である Snail、Slug、Twist のなかで、Snail の発現が亢進し、Snail の制御分子である GSK3 $\beta$  の亢進していたことから reptin 遺伝子は EMT 関連転写因子 Snail を介して EMT シグナルに関与していることが示唆された。

以上より、浸潤様式の異なるヒト口腔扁平上皮癌細胞である OSC-19 細胞、OSC-20 細胞において reptin 遺伝子は EMT に関与しながら癌細胞の運動能を抑制することが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、reptin 遺伝子のヒト口腔扁平上皮癌細胞の基底膜浸潤制御機構の解明を目的として検討したものである。浸潤様式の異なる 2 種の口腔扁平上皮癌細胞株である OSC-19 細胞と OSC-20 細胞において、reptin 遺伝子を knockdown すると癌細胞株の浸潤能の亢進を認めた。そのメカニズムの解析において、reptin knockdown 群で Rho ファミリーの Cdc42 と Rac の発現の亢進、それに伴う遊走能の亢進と細胞形態の紡錘形変化、上皮間葉移行 (EMT) の transcriptional factor である Snail の発現の亢進、上皮系マーカーである E-cadherin の発現の低下などの結果から、reptin 遺伝子は EMT に関与しながら癌細胞の運動能を抑制する可能性が示唆された。

本研究は、今後の癌治療に関する研究に対し有用な基礎的情報を提供するものであり、よって博士(歯学)の学位論文として価値あるものと認める。