

博士（歯学）樋田京子

学位論文題名

Antisense E1AF Transfection Restrains Oral Cancer Invasion by Reducing Matrix Metalloproteinase Activities.

(アンチセンス E1AF 遺伝子導入が口腔癌細胞の MMP 活性ならびに浸潤能に及ぼす影響に関する研究)

、学位論文内容の要旨

【緒言】

癌細胞の浸潤・転移能は腫瘍の悪性度を左右する因子であり、患者の予後にとって重要な意味を持つ。癌細胞が周囲の結合組織や血管内・リンパ管内に浸潤する際には、その構成成分である細胞外基質を分解することが必要であり、それ故腫瘍の浸潤・転移の過程ではマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの細胞外基質分解酵素が重要な役割を担っている。これまでに17種類のMMPの存在が報告されており、間質の主な構成成分であるI型やII型、III型コラーゲン（間質型コラーゲン）などを分解する間質型コラゲナーゼ (MMP-1), 上皮細胞と間質の境界部や血管内皮細胞下に存在する基底膜の主成分を分解するIV型コラゲナーゼ (MMP-9)，ならびにフィブロネクチン，ラミニンなどの糖タンパク質やプロテオグリカンを分解するストロメライシン (MMP-3) は、癌の浸潤・転移と深く関与していることが報告されている。

MMPの発現はAP-1やets癌遺伝子群転写因子などにより転写調節されることが示されている。E1AFは、1991年に発見されたets癌遺伝子群転写因子の一つで、Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assayにおいてMMP-1, MMP-3あるいはMMP-9の転写調節領域に結合し、その転写活性を上昇させている。その後、低浸潤性の乳癌細胞にE1AFを強制発現させることにより浸潤能が亢進すること、

またヒト口腔癌由来の高浸潤性の培養細胞株, HSC3がE1AFを強く発現していると同時に, MMP-1, -9も強発現していることなどが報告され, E1AFの浸潤・転移への関与が示唆されている。

今回, 著者らは, 高浸潤性の口腔扁平上皮癌培養細胞株, HSC3にアンチセンスE1AF発現ベクターを遺伝子導入し, E1AFの抑制が癌細胞の浸潤動態に及ぼす影響について検索した。

【材料と方法】

1. アンチセンスE1AF発現ベクターの構築と遺伝子導入

E1AF cDNA 断片 (n. n. 403-761) を真核細胞発現ベクター pRVSVneo にアンチセンス方向に挿入し, アンチセンスE1AF発現ベクター pRVSVneoAS-E1AFを構築した。このベクターに挿入されたE1AF遺伝子は, RSVプロモーターにより真核細胞内でアンチセンス方向にRNAを発現する。さらにこのベクターにはネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれており, 遺伝子導入株の選択を可能としている。このベクターを, LipofectAmineを用いてHSC3に遺伝子導入した。なお, pRVSVneoのみを導入した細胞株をControl細胞とした。

2. RNAの抽出およびNorthern blot分析

各細胞株より抽出した全RNAを材料として, E1AFプローブおよびMMP-1, -3, -9のcDNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。

なお, E1AFのプローブはn. n. 196/760のcDNA断片を用いた。コントロールとしてはヒト β -actin cDNA プローブを用い, 再度ハイブリダイゼーションを行った。

3. 蛋白レベルにおけるMMPの発現の検索

親株, Control細胞, アンチセンスE1AF発現ベクター導入細胞を24時間無血清下で培養した後, 回収した上清をサンプルとしたゼラチンザイモグラムを行い, 92kD IV型コラゲナーゼ (MMP-9) の活性を検索した。さらにMMP-1, -3, -9に対するモノクローナル抗体を用い, 免疫組織学的に各MMPを発現している細胞の同定を行った。

4. 浸潤能の検索

正常線維芽細胞を混入したコラーゲンゲルを作製し、そのうえに HSC3, Control細胞, HSC3 AS細胞をまき、Raft culture (in vitro 3次元培養)を行って、各細胞のコラーゲンゲル内への浸潤能の差を比較した。さらにHSC3, Control細胞, HSC3 AS細胞を各々 2×10^5 個ヌードマウス舌へ移植し、舌内に形成された腫瘍を組織学的に検索した。

【結果】

ベクター導入後、ネオマイシンによる選択によって14株が分離された。Northern blot分析によって、そのうち3株に1.2kbのアンチセンスE1AF RNAの明瞭なシグナルが認められた。そこでこれらの細胞をアンチセンスE1AF発現細胞 (HSC3 AS細胞) として他の実験に用いた。なお、pRVSVneoのみを遺伝子導入して分離したControl細胞には親株HSC3と同様にE1AF mRNAのみが発現していた。

HSC3 AS 細胞は、Northern blot分析において親株やControl細胞に比べてMMP-1, -3, -9 mRNAのレベルが低下していた。

またゼラチンザイモグラムでMMP-9 活性の著明な低下がみられ、免疫組織染色でMMP-1, -3, -9抗体に対する染色性の低下が認められた。これらの所見は、E1AFのアンチセンス発現ベクターの導入により複数のMMPの発現がmRNA ならび蛋白レベルで抑制されたことを示している。

また、Raft cultureにおいて、HSC3 AS細胞のコラーゲンゲルへの浸潤能は著しく低下しており、さらにヌードマウス舌への移植実験でも、HSC3が周囲の筋層に浸潤性に増殖していたのに対して、HSC3 AS細胞は比較的境界明瞭な腫瘍を形成しており、浸潤能は明らかに低下していた。

【考察】

今回の結果は、E1AFを抑制することにより数種のMMPの発現が抑制され、その結果、腫瘍の浸潤能が低下したことを示している。このことは、逆に、E1AFは口腔扁平上皮癌細胞において複数のMMPの転写を活性化し、腫瘍の浸潤に重要な役割を担っていることを示すものと考えられる。

近年、分子生物学の発展に伴い、悪性腫瘍の診断・治療においてもその応用が試み始められてきている。今回、E1AFの抑制効果を検討するために用いたアンチセンス法は標的の遺伝子に相補的なRNAと二重鎖を形成させ、その発現を抑制させる遺伝子発現制御方法である。この方法が見いだされた当初は、クローニングされた塩基配列の機能の推定に用いられていたが、最近では癌やAIDSの治療への応用に関する研究が活発になってきている。

アンチセンスRNAが細胞内でどのように作用しているかについては未だ不明な点が多いが、現在までに、1) DNAと3重鎖を形成して種々の制御因子のDNAへの結合を阻害する、2) 転写後のスプライシングを阻害する、3) 標的遺伝子のRNAと結合し、リボゾームのmRNAへの転位や読みとりを阻害する、などのメカニズムが報告されている。アンチセンス法を治療に応用するには幾つかの課題が残されているが、今回の実験において、E1AF遺伝子を单一の標的としたアンチセンスRNAによる発現抑制が数種の細胞外基質分解酵素の抑制をもたらし、最終的に腫瘍の浸潤能を低下させたことは、E1AFが遺伝子治療におけるターゲットの一つになりうることを示している。また今回、培養系においてとはいえ、E1AFの発現が口腔癌細胞の浸潤に深く関与していることが示されたことは、E1AFが口腔扁平上皮癌の悪性度の指標の一つとなりうる可能性を示唆するものと思われた。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　戸　塚　靖　則

副　查　教　授　向　後　隆　男

副　查　教　授　松　本　　章

学　位　論　文　題　名

Antisense E1AF Transfection Restrains Oral Cancer Invasion by Reducing Matrix Metalloproteinase Activities.

(アンチセンス E1AF 遺伝子導入が口腔癌細胞の MMP 活性ならびに浸潤能に及ぼす影響に関する研究)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科について口頭試問により行われた。審査論文の概要是、以下の通りである。

E1AFは、1993年に発見された*ets*癌遺伝子群転写因子の一つで、MMP-1、MMP-3ならびにMMP-9の転写活性を上昇させることにより、癌細胞の浸潤能を亢進させることが知られている。本研究は、E1AFの抑制が癌細胞の浸潤動態にどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で、高浸潤性の口腔扁平上皮癌培養細胞株(HSC3)にアンチセンスE1AF発現ベクターを遺伝子導入し、その浸潤能の変化について検索したものである。

まず、E1AF cDNA断片(n.n.403-761)を真核細胞発現ベクター(pRVSVneo)にアンチセンス方向に挿入し、アンチセンスE1AF発現ベクター(pRVSVneoAS-E1AF)を構築した。このベクターに挿入されたE1AF遺伝子は、RSVプロモーターにより真核細胞内でアンチセンス方向にRNAを発現する。このベクターにはネオマイシン耐性遺伝子も組み込まれており、遺伝子導入株の選択を可能としている。Lipofect Amineを用いてpRVSVneoAS-E1AFならびにコントロールのためのpRVSVneoをHSC3に遺伝子導入し、ネオマイシン(G418)による選択で、14株が分離された。各細胞株より抽出した全RNAを材料として、E1AF cDNAのn.n.196-760断片をプローブとしたNorthern blottingにより、14株中3株に1.2kbのアンチセンスE1AF RNAの明瞭なシグナルを認めた。そこでこの3株の細胞をアンチセンスE1AF発現細胞(HSC3-AS細胞)として以下の実験に用いた。なお、pRVSVneoのみを遺伝子導入して分離したコントロール細胞には親株HSC3細胞と同様にE1AF mRNAのみが発現していた。

最初に、MMP-1, -3, -9 mRNAの発現量を検索するため、HSC3-AS細胞とHSC3細胞、コントロール細胞より抽出したRNAを材料として、MMP-1, -3, -9のcDNAをプローブとしたNorthern blottingを行った。結果は、HSC3-AS細胞では親株HSC3細胞やコントロール細胞に比べてMMP-1, -3, -9 mRNAのレベルが低下していた。次いで、蛋白レベルにおけるMMPの発現を確認するため、HSC3細胞とHSC3-AS細胞、コントロール細胞をそれぞれ24時間無血清下で培養し、回収した上清をサンプルとしてゼラチンザイモグラムを行い、92kD型コラゲナーゼ(MMP-9)の活性を検索した。また、MMP-1, -3, -9に対するモノクローナル抗体を用い、免疫組織学的に各

MMPを発現している細胞の特定を行った。結果は、HSC3-AS細胞はゼラチンザイモグラムでMMP-9活性の著明な低下を示し、また免疫組織染色でもMMP-1, -3, -9抗体に対する染色性が低下していた。

次に、各細胞の浸潤能を検索するため、正常線維芽細胞を混入したコラーゲンゲルを作製し、HSC3細胞とHSC3-AS細胞、コントロール細胞を用いてRaft culture (in vitro 3次元培養)を行った。さらにHSC3細胞、HSC3-AS細胞、コントロール細胞を各々2x10⁵個ヌードマウスの舌へ移植し、舌筋内に形成された腫瘍を組織学的に検索した。結果は、Raft cultureにおいてHSC3-AS細胞のコラーゲンゲルへの浸潤能は著しく低下しており、またヌードマウス舌への移植実験でも、HSC3細胞が周囲の筋層に浸潤性に増殖していたのに対して、HSC3-AS細胞は比較的境界明瞭な腫瘍を形成しており、浸潤能は明らかに低下していた。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について、主査および副査より質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、E1AFアンチセンス発現ベクターの導入によるE1AFの抑制が複数のMMPの発現をmRNAならび蛋白レベルで抑制し、腫瘍の浸潤能を低下させることを明らかにし、E1AFが遺伝子治療におけるターゲットの一つになりうることを示したことが高く評価された。また、本研究の結果は、逆に、E1AFは口腔扁平上皮癌細胞において複数のMMPの転写を活性化し、腫瘍の浸潤に重要な役割を担っていることを示しており、E1AFが口腔扁平上皮癌の悪性度の指標の一つとなりうる可能性も示唆している。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。