

学 位 論 文 題 名

口腔癌細胞株における E-カドヘリンの
癌細胞浸潤抑制効果

－ MAP キナーゼカスケードを介した MT1-MMP の抑制－

学位論文内容の要旨

癌の悪性度を考える上で癌細胞の浸潤は最も重要な因子の一つであるが、それには細胞間接着の低下あるいは細胞遊走能・細胞外基質分解能の亢進など複数の因子が関与している。上皮細胞における細胞間接着は主に E-カドヘリンによって行われているが、種々の癌細胞で E-カドヘリンの発現の低下および E-カドヘリン遺伝子の変異が生じることにより機能異常を引き起こすことが報告されている。さらに、癌細胞はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を多量に分泌して細胞外基質を破壊する。特に MMP-2 と MMP-9 は基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを分解する。

近年、E-カドヘリンによる細胞間接着が基質分解能を抑制することが報告されているが、E-カドヘリンが癌の浸潤を抑制する機構に関しては、癌細胞が集団から離脱しにくくなるという考えがある以外には直接的な証拠が少ない。本研究では E-カドヘリンが浸潤能に関与する MMP の発現および細胞遊走能をどのように変化させるかを明らかにするために、扁平上皮癌細胞株に E-カドヘリンを強制発現させて各因子の変化を検討した。

実験には舌癌由来扁平上皮癌細胞株 HN5 を使用し、通法に従い 10%FBS 含有 D-MEM 培地で培養した。コントロール発現細胞およびヒト E-カドヘリン発現細胞をそれぞれ作成し、それぞれ HN5-neo 細胞および HN5-EC 細胞と名付けた。E-カドヘリンおよびアクチンの局在を免疫蛍光組織化学染色で、各細胞の浸潤能および細胞遊走能の測定をボイデンチャンバー法で、各細胞が分泌する MMP の検出をゼラチンザイモグラフィーで、各遺伝子の発現を RT-PCR で行った。また、MAP キナーゼカスケードの活性化はリン酸化型 ERK (pERK) をウェスタンブロット法で検出することにより行った。

HN5 細胞および HN5-neo 細胞は上皮細胞様の形態および弱い細胞間接着を示した。これに対して、HN5-EC 細胞は細胞間接着の亢進が認められた。E-カドヘリンの発現は HN5 細胞および HN5-neo 細胞ではほとんど見られなかったのに対し、HN5-EC 細胞では細胞膜表面に強く認められた。浸潤能を調べたところ、 5×10^4 個の細胞に対して HN5 細胞および HN5-neo 細胞では約 750 個であったが、HN5-EC 細胞は 2 クローンとも約 450 個と約 60% の値となり有意に低下した。抗 E-カドヘリン抗体 HECD-1 を添加して E-カドヘリンの機能を阻害した場合、各細胞と

も HN5 細胞と同程度の浸潤能を示した。細胞遊走能は、 5×10^4 個の細胞に対して HN5 細胞は約 1900 個、HN5-neo 細胞は約 1700 個であったが、HN5-EC 細胞は 2 クローンとも約 1300 個と約 70% の値となり有意に低下した。HECD-1 を添加すると HN5 細胞と同程度の細胞遊走能を示した。MMP の発現を調べたところ、潜在型 MMP-2 は各細胞間で差は見られなかったが、活性化型 MMP-2 は HN5 細胞および HN5-neo 細胞と比較して HN5-EC 細胞で明らかに減弱した。MMP-2 mRNA に明らかな差は見られなかった。MMP-2 は MT1-MMP により活性化され、TIMP-2 により抑制されるため両者の発現を調べたところ、MT1-MMP は HN5 細胞および HN5-neo 細胞と比較して HN5-EC 細胞で明らかに減少した。また、HECD-1 を添加すると HN5-EC 細胞とも HN5 細胞および HN5-neo 細胞と同程度に発現した。TIMP-2 の発現に明らかな差は見られなかった。MT1-MMP の発現は MAP キナーゼカスケードにより制御されるため、その活性化の程度を調べた。pERK 量は HN5 細胞および HN5-neo 細胞と比較して HN5-EC 細胞では明らかに減少し、HECD-1 を添加するとある程度回復した。また、チロシンリン酸化の程度は、HN5-EC 細胞で約 165、145、100kDa のタンパク質のリン酸化の程度が減少し、HECD-1 を添加することにより HN5 細胞と同程度まで増加した。

今回の研究で E-カドヘリンの発現により浸潤能は約 60%、細胞遊走能は約 70% に減少した。両者の実験における差は癌細胞によるマトリゲルの分解能の違いにより生じたものと考えられた。そこで MMP の変化を検索したところ活性化型 MMP-2 が減少し、その原因は MT1-MMP の発現の低下によるものであった。また、細胞接着を阻害することにより MT1-MMP の発現が回復しており、細胞間接着による MT1-MMP の制御が示唆された。これまでに、癌組織の免疫染色学的検索により E-カドヘリンと MMP の発現が負の相関を示していること、また、培養細胞を用いた研究により細胞間接着が MMP-2、MMP-7、MMP-9 などの MMP の発現を制御することが報告されている。しかしその機序に関しては現在のところほとんど解明されていない。また、E-カドヘリンを強く発現している細胞株は MT1-MMP をほとんど発現しておらず、逆に E-カドヘリンの発現が弱い細胞は MT1-MMP を強く発現しているという報告があり、今回の結果はこの報告と一致しているが、E-カドヘリンを発現させることにより MT1-MMP の発現の変化がみられたという点は今回の研究が初めての報告であり、この両者の関連をより直接的に示していると考えられる。

E-カドヘリンと MT1-MMP の関係はまだ不明な点が多いが、細胞骨格の構成により起こる情報伝達系の関与が考えられる。細胞骨格を破壊する薬物あるいは抗 E-カドヘリン抗体処理により細胞骨格の構造の破壊とプロテアーゼ発現の増加がみられたり、あるいは、細胞外基質に接着している線維芽細胞は MT1-MMP をほとんど発現していないが、コラーゲンゲル内で弛緩状態にするとアクチン線維の消失と MT1-MMP の発現が生じるなど細胞骨格の構成が細胞外基質の分解において重要な役割を果たしていることが報告されている。E-カドヘリンの発現あるいはカドヘリンに対する抗体を作用させることにより細胞骨格の構成が変化するため、細胞骨格の変化が MT1-MMP の発現を減少させた可能性が考えられる。次に、MAP キナーゼカスケードを介した MT1-MMP の制御機構が考えられる。今回の研究では、細胞間接着の有無と pERK 量が負の相関を示しており、E-カドヘリンに

よる細胞間接着が MAP キナーゼカスケードを抑制して MT1-MMP の発現を減少させる経路の存在を示唆している。さらにチロシンリン酸化の程度の変化が MT1-MMP の発現を制御していることが報告されており、今回、E-カドヘリンの発現によりいくつかのタンパク質のチロシンリン酸化の程度が著明な変化ではないが減少し、細胞間接着の阻害により回復している。これらのタンパク質の同定はできなかったが、MAP キナーゼカスケードと何らかの関連を持つ可能性が考えられる。

細胞間接着により生じる情報伝達に関してはほとんど解明されていないが、一つの経路だけで遺伝子発現が制御されているとは考えにくく、他の情報伝達系路とのクロストークを明らかにすることがこれからの研究課題と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

口腔癌細胞株における E-カドヘリンの 癌細胞浸潤抑制効果

－ MAP キナーゼカスケードを介した MT1-MMP の抑制 －

審査は審査担当者が全員一堂に会して行われた。まず、論文提出者に研究内容の説明を求めた。研究の概要は以下の通りである。

癌の悪性度を考える上で癌細胞の浸潤は最も重要な因子の一つであり、細胞間接着の低下あるいは細胞遊走能・細胞外基質分解能の亢進など複数の因子が関与している。上皮細胞における細胞間接着は E-カドヘリンによって行われているが、種々の癌細胞でその発現低下および遺伝子変異が生じることが多い。さらに癌細胞はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を多量に分泌して細胞外基質を破壊する。特に MMP-2 と MMP-9 は基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを分解する。近年、E-カドヘリンによる細胞間接着が基質分解能を抑制することが報告されているが、E-カドヘリンが癌の浸潤を抑制する機構に関しては、癌細胞が集団から離脱しにくくなるという考えがある以外には直接的な証拠が少ない。本研究では E-カドヘリンが MMP の発現および細胞遊走能にどのように影響するかを明らかにするために、扁平上皮癌細胞株に E-カドヘリンを強制発現させて各因子の変化を検討した。

実験には舌癌由来扁平上皮癌細胞株 HN5 を使用し、遺伝子導入により HN5-neo 細胞 (コントロール発現細胞) および HN5-EC 細胞 (ヒト E-カドヘリン発現細胞) を作成した。ボイデンチャンバー法により HN5 細胞および HN5-neo 細胞に対して HN5-EC 細胞の浸潤能は約 60%、細胞遊走能は約 70% と有意に低下した。抗 E-カドヘリン抗体 HECD-1 を添加して細胞間接着を阻害すると各細胞とも HN5 細胞と同程度の浸潤能または細胞遊走能を示した。MMP の発現を調べたところ、潜在型 MMP-2 は各細胞間で差は見られなかったが、活性化型 MMP-2 は HN5 細胞および HN5-neo 細胞と比較して HN5-EC 細胞で明らかに減弱した。MMP-2 の活性化因子である MT1-MMP は HN5 細胞および HN5-neo 細胞と比較して HN5-EC 細胞で明らかに減少し、HECD-1 を添加すると HN5 細胞と同程度まで発現した。

MMP-2 の抑制因子である TIMP-2 の発現に明らかな差は見られなかった。MT1-MMP の発現は MAP キナーゼカスケードにより制御されるため、その活性化の程度をリン酸化型 ERK (pERK) 量で調べた。pERK 量は HN5 細胞および HN5-neo 細胞と比較して HN5-EC 細胞では明らかに減少し、HECD-1 を添加すると回復した。また、HN5-EC 細胞で約 165、145、100kDa のタンパク質のリン酸化の程度が減少し、HECD-1 の添加により HN5 細胞と同程度まで増加した。

E-カドヘリンが MT1-MMP の発現を減少させる機序に関してはまだ不明な点が多いが、以下の可能性が考えられる。まず MAP キナーゼカスケードを介した MT1-MMP の制御機構が考えられる。細胞間接着の有無と pERK 量が負の相関を示しており、E-カドヘリンによる細胞間接着が MAP キナーゼカスケードを抑制して MT1-MMP の発現を減少させることが示唆された。次に、細胞骨格の構成により生じる情報伝達系の関与である。E-カドヘリンの強制発現あるいはカドヘリンに対する抗体を作用させることにより細胞骨格の構成が変化するため、細胞骨格の変化が MT1-MMP の発現を減少させた可能性が考えられる。さらにチロシンリン酸化の程度の変化が MT1-MMP の発現を制御していることが報告されており、今回、E-カドヘリンの発現によりいくつかのタンパク質のチロシンリン酸化の程度が減少し、細胞間接着の阻害により回復している。これらのタンパク質は同定できなかったが、MAP キナーゼカスケードと何らかの関連を持つことが考えられる。

細胞間接着により生じる情報伝達に関してはほとんど解明されていないが、一つの経路だけで遺伝子発現が制御されているとは考えにくく、他の情報伝達系路との関連を明らかにすることが必要と思われる。

続いて、口頭による試問が行われた。

使用細胞株の選択／細胞接着および細胞遊走の機序／癌細胞の浸潤に関与すると思われる因子／本実験の臨床応用の可能性と限界について等の質問があった。論文提出者はこれらの質問に明快に回答し、十分な学識を有すると認められた。

本研究では、E-カドヘリンを発現していない舌扁平上皮癌細胞という適切な細胞株を使用し、クリアーカットな実験結果を出している。また、この細胞株の入手の苦勞が察せられた。一方、特殊な細胞株を使用していることから、臨床症例とのギャップも指摘された。

本論文提出者は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定された。