

学 位 論 文 題 名

nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression.

(nm23-H1 は口腔扁平上皮がん細胞の浸潤性を matrix metalloproteinase-2 および matrix metalloproteinase-9 の発現を変化させずに抑制する)

学位論文内容の要旨

{緒言}

nm23-H1 は悪性黒色腫細胞の転移抑制遺伝子としてクローニングされたタンパク質であり、現在までに 8 種類のサブユニットが報告されている。これらのうち nm23-H1 と H2 についての研究が多数行われており、肺がん、大腸がん、卵巣がん、乳がんなどにおいて nm23 が高発現している症例の予後が良いことが報告されている。しかしながら、nm23 による転移抑制の詳細なメカニズムについては不明な点が多く、また腫瘍の発生母地によっては nm23 の高発現が上記のがんとは逆の相関を示すことも知られている。今回、申請者はこの遺伝子が口腔扁平上皮がんの転移能に抑制的に機能するか否かを分子生物学的に検討した。

{材料および方法}

口腔扁平上皮がん細胞株間における nm23 の発現の差異およびその運動能・浸潤能を検討する目的で、6 種類の口腔扁平上皮がん細胞株 HSC2, HSC3, HSC4, KB, OSC19, OSC20 を使用し、ノザン法により nm23-H1 および H2 の mRNA の発現レベルを検討した。さらにタンパク質レベルでの発現解析には抗 nm23-H1、H2 モノクローナル抗体を使用したウエスタンブロットを行った。また、これら細胞株の運動能は boyden chamber 法、細胞浸潤能は raft culture 法にて評価した。

nm23-H1 の遺伝子導入にあたり、pcDNA3 ベクターに HA-tag を付与した nm23-H1 cDNA をサブクローニングした。pcDNA3 および pcDNAHA- nm23-H1 をリポフェクション法にて細胞株に導入し、G418 による選択培養の後、nm23-H1 高発現株を樹立した。外来性の HA nm23-H1 の発現はウエスタンブロット法および蛍光抗体法にて確認した。

{結果}

異なる 6 種類の口腔がん細胞株における nm23-H1 の発現とそれぞれの細胞株の運動

能および浸潤能との相関を検討したところ、nm23-H1 の発現が低かった 3 細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4) では運動能・浸潤能ともに高い傾向が見られたのに対し、nm23-H1 を高発現していた 3 細胞株 (KB, OSC19, OSC20) では前述の細胞株に比較して有意に低い傾向が認められた。raft culture 法による細胞浸潤能の比較においても、コラーゲン膜への浸潤能は nm23-H1 の発現と負の相関を示した。一方、nm23-H2 の発現は全ての細胞株において高く、遊走能との有意な相関は見出せなかった。

このような相関関係が nm23-H1 の発現量の差によって生じている可能性を検討するために、6 細胞株中、運動能・浸潤能ともに最大であり、かつ nm23-H1 の発現が最低であった HSC3 に nm23-H1 を遺伝子導入し、その運動能・浸潤能がどのように変化するかを解析した。上記方法により、3 株の nm23-H1 高発現株を樹立した (H1-4, H1-5, H1-10)。HA-nm23-H1 タンパク質の発現量は総 nm23-H1 タンパク質に対して約 3 % ないし 15 % を示していた。いずれの細胞においても、親株に比較して運動能が低下していることが boyden chamber 法にて確認された。このような細胞運動能の低下は 3 株のうち、HA-nm23-H1 のタンパク質発現量が最も多かった H1-10 細胞で最も低かった。

次に、HSC3 に pcDNA3 のみを導入した細胞と、H1-10 細胞の浸潤性を raft culture 法にて評価した。pcDNA3 のみを導入した HSC3 は親株と同様の高浸潤性を示したが、H1-10 は浸潤性を示さず、重層扁平上皮様の細胞増殖傾向を示すのみであった。

これらの浸潤性の変化と matrix metalloproteinase (MMP) の分泌性の変化が関連しているか否かを判定する目的で gelatine zymography を行ったところ、各 nm23-H1 高発現株でも pcDNA3 のみを導入した細胞と同様なレベルの MMP-2 および MMP-9 の発現が確認された。

蛍光抗体法による解析では HA-nm23-H1 は細胞質に彌漫性に分布していた。ローダミン・ファロイジンとの二重染色の結果、アクチンフィラメントの走行にも著明な変化が認められた。すなわち、pcDNA3 のみを導入した細胞では微細なアクチンフィラメントを細胞質内に認めるのみであったが、H1-10 細胞では細胞質の辺縁に顕著なアクチン束が観察された。

{考察}

今回の実験により、口腔扁平上皮がん細胞株における内在性の nm23-H1 の発現と各細胞株の運動性および人工的コラーゲン膜への浸潤性との間に負の相関があることが示された。すなわち、トランスフェクションにより樹立された HSC3 の nm23-H1 の高発現株では、親株でみられた細胞運動性および高浸潤性が著明に低下していた。しかしながら、これまでの細胞浸潤性に関する研究において、細胞の浸潤性を決定する因子として報告されてきた MMP-2 および MMP-9 の発現に著明な低下はみられず、nm23-H1 の細胞運動抑制作用が浸潤性を阻害する主たるメカニズムであることが考えられた。また、nm23-H1 の高発現株で認められたアクチンフィラメント束の細胞内での局在・分布の著明な変化は、この分子が、細胞運動時の細胞骨格再構成に関わる何らかのシグナル伝達機構に影響を与えていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 村 太 保
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression.

(nm23-H1 は口腔扁平上皮がん細胞の浸潤性を matrix metalloproteinase-2 および matrix metalloproteinase-9 の発現を変化させずに抑制する)

審査は、全審査委員出席のもと、口頭にて行った。

最初に、論文提出者から提出論文の研究内容の説明を受けた。説明の要旨は以下の通りであった。

nm23-H1 は悪性黒色腫細胞の転移抑制遺伝子としてクローニングされたタンパク質であり、現在までに 8 種類のサブユニットが報告されている。これらのうち nm23-H1 と H2 についての研究が多数行われており、肺がん、大腸がん、卵巣がん、乳がんなどにおいて nm23 が高発現している症例の予後が良いことが報告されている。しかしながら、nm23 による転移抑制の詳細なメカニズムについては不明な点が多く、また腫瘍の発生母地によっては nm23 の高発現が上記のがんとは逆の相関を示すことも知られている。今回、申請者はこの遺伝子が口腔扁平上皮がんの転移能に抑制的に機能するか否かを分子生物学的に検討した。

口腔扁平上皮がん細胞株間における nm23 の発現の差異およびその運動能・浸潤能を検討する目的で、6 種類の口腔扁平上皮がん細胞株 HSC2, HSC3, HSC4, KB, OSC19, OSC20 を使用し、ノザン法により nm23-H1 および H2 の mRNA の発現レベルを検討した。これら細胞株の運動能は boyden chamber 法、細胞浸潤能は raft culture 法にて評価した。

nm23-H1 の遺伝子導入にあたり、pcDNA3 ベクターに HA-tag を付与した nm23-H1 cDNA をサブクローニングした。pcDNA3 および pcDNA3-HA- nm23-H1 をリポフェクション法にて細胞株に導入し、nm23-H1 高発現株を樹立した。外来性の HA nm23-

H1 の発現はウエスタンブロット法および蛍光抗体法にて確認した。

異なる 6 種類の口腔がん細胞株における nm23-H1 の発現とそれぞれの細胞株の運動能および浸潤能との相関を検討したところ、nm23-H1 の発現が低かった 3 細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4) では運動能・浸潤能ともに高い傾向が見られた。一方、nm23-H1 を高発現していた 3 細胞株 (KB, OSC19, OSC20) では前述の細胞株に比較して有意に低い傾向が認められた。raft culture 法による細胞浸潤能の比較においても、コラーゲン膜への浸潤能は nm23-H1 の発現と負の相関を示した。一方、nm23-H2 の発現は全ての細胞株において高く、遊走能との有意な相関は見出せなかった。

6 細胞株中、運動能・浸潤能ともに最大であり、かつ nm23-H1 の発現が最低であった HSC3 に nm23-H1 を遺伝子導入し、3 株の nm23-H1 高発現株を樹立した (H1-4, H1-5, H1-10)。その運動能・浸潤能がどのように変化するかを解析した。HA- nm23-H1 タンパク質の発現量は総 nm23-H1 タンパク質に対して約 3 % ないし 15 % を示していた。いずれの細胞においても、親株に比較して運動能が低下していることが boyden chamber 法にて確認された。このような細胞運動能の低下は 3 株のうち、HA- nm23-H1 のタンパク質発現量が最も多かった H1-10 細胞で最も顕著に認められた。

次に、HSC3 に pcDNA3 のみを導入した細胞と、H1-10 細胞の浸潤性を raft culture 法にて評価した。pcDNA3 のみを導入した HSC3 は親株と同様の高浸潤性を示したが、H1-10 は浸潤性を示さず、重層扁平上皮様の細胞増殖傾向を示すのみであった。

これらの浸潤性の変化と matrix metalloproteinase (MMP) の分泌性の変化が関連しているか否かを判定する目的で gelatine zymography を行ったところ、各 nm23-H1 高発現株でも pcDNA3 のみを導入した細胞と同様なレベルの MMP-2 および MMP-9 の発現が確認された。蛍光抗体法による解析では HA- nm23-H1 は細胞質に瀰漫性に分布していた。

今回の実験により、口腔扁平上皮がん細胞株における内在性の nm23-H1 の発現と各細胞株の運動性および人工的コラーゲン膜への浸潤性との間に負の相関があることが示された。しかしながら MMP-2 および MMP-9 の発現に著明な低下はみられず、nm23-H1 の細胞運動抑制作用が浸潤性を阻害する主たるメカニズムであることが考えられた。

以上の説明に続いて、各審査委員から提出論文の内容及びそれに関連した事項について口頭で、種々質問があった。主な質問内容として、従来の肺がんの研究は腺癌についてか、MMP-2, MMP-9 の発現があっても nm23-H1 があれば浸潤性は弱くなるのか、nm23-H1 は kinase activity を有しているのか、がんの転移を抑制する gene にはどんな gene があるか等。論文提出者はこれらの質問に明解に解答し、今後の研究の展望も示した。

本論文の研究内容が高く評価されるとともに、専門領域のみならず、関連分野についても十分な学識を有していることが認められ、論文提出者は、博士 (歯学) の学位を授与されるにふさわしいと認められた。