

学位論文題名

E1AF induces both matrix metalloproteinase transcription and cell cycle arrest that occurs in the stage of cancer cell invasion.

(がん細胞が浸潤する際に、E1AFはマトリックスメタロプロテアーゼの転写を亢進すると同時に細胞周期を停止させる)

学位論文内容の要旨

【緒言】

E1AFは *ets*-oncogene family に属する転写因子で、細胞外基質の分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP) -1、-3、-9 の転写を亢進し、口腔扁平上皮がん由来細胞の浸潤性増殖に E1AF による MMP 遺伝子の転写亢進が関連していることが明らかにされている。さらに E1AF mRNA を強く発現し同時に MMP タンパクの発現を示す細胞株に E1AF アンチセンス発現ベクターを導入することによって細胞の浸潤活性が低下することが報告されている。実際の口腔がん患者においても、口腔扁平上皮がんの 55%に E1AF mRNA が検出されており、E1AF の発現が口腔がんの浸潤活性と深く関係していることが示されている。

その一方で、E1AFは cell cycle inhibitor である p21<sup>waf1/cip1</sup> の転写を亢進させることがレポーターアッセイで示されている。本研究の目的は、E1AF が *in vivo* において細胞周期を停止させるかどうかを調べると共に、E1AF が癌の浸潤性増殖と細胞周期とにどのように関与しているかを明らかにすることである。

【材料と方法】

i) メタロチオネン誘導 E1AF 発現ベクターの構築

メタロチオネンプロモーターを有する真核細胞発現ベクター pSVneoHMT-Ter に E1AF の全長遺伝子を挿入し、メタロチオネン誘導 E1AF 発現ベクター pHMT II E1AF を構築した。この発現ベクターを遺伝子導入した細胞は、通常の培養条件下では挿入遺伝子の発現は示さないが、培養液中に亜鉛化合物を加えることによって遺伝子・遺伝子産物の発現が誘導される。今回は亜鉛化合物として ZnCl<sub>2</sub> を用いた。

ii) メタロチオネン誘導 E1AF 発現細胞の樹立

E1AF の発現が低く、浸潤活性の低い口腔扁平上皮がん由来細胞株 Ca9.22 を用いた。Ca9.22

に 1  $\mu$ g の phMT II E1AF を、LipofectoAmine を用いて遺伝子導入し、導入 48 時間後からネオマイシンを添加し導入株の選択を行い、約 3 週間後にネオマイシン耐性コロニーをクローニングし、これらをメタロチオネン誘導 E1AF 発現 Ca9.22 (Ca9.22MTF) とした。

### iii) Western blot assay

Ca9.22 および遺伝子導入細胞 Ca9.22MTF を培養し、Ca9.22MTF は 80%confluent に達した時点で培地に  $ZnCl_2$  を加え 12 時間培養した。細胞タンパクを抽出し、SDS-PAGE ゲル電気泳動を行った。1 次抗体として抗 E1AF/PEA3 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 p21 抗体を用い、HRP 標識二次抗体と反応させた後、ECL により化学発光しフィルムに露光した。なお、PEA3 はマウスから発見された *ets* 癌遺伝子で、その塩基配列は E1AF と相同性が非常に高く、E1AF は PEA3 のヒトホモログであることが知られている。

### iv) 免疫細胞学的検索

Ca9.22 および Ca9.22MTF を APS コートスライドグラス上で培養した。Ca9.22MTF は 80% confluent に達した時点で培地に  $ZnCl_2$  を加え 12 時間培養した。エタノールで固定後、一次抗体として抗 MMP-9 マウスモノクローナル抗体、抗 p21 ラビットポリクローナル抗体と反応させ、FITC 標識抗マウス二次抗体、rhodamine 標識および FITC 標識抗ラビット二次抗体と反応させ、一部は二重染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。

### v) 三次元浸潤モデル (ラフトカルチャー) による組織学的検索

In vitro 三次元浸潤モデル(ラフトカルチャー)により、浸潤活性を形態的に検索した。ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC5 を混入した I 型コラーゲンゲル上で Ca9.22 および Ca9.22MTF を各々培養し、confluent となった時点でゲルをステンレスグリッド上に載せ、air/liquid interface の状態で 10 日間培養した。Ca9.22MTF は培養期間中  $ZnCl_2$  で刺激した。ホルマリン固定、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い光顕的に観察した。

### vi) フローサイトメトリーによる細胞周期の解析

E1AF による細胞周期におよぼす影響について flowcytometry を用いて検索した。Ca9.22MTF を 80%confluent に達した時点で培地に  $ZnCl_2$  を加えたものと加えないものと、それぞれを 12 時間培養した。Tripsynization により細胞回収後、エタノール固定し、popidium iodide で 5 分間染色し、flowcytometry により分析した。

## 【結果】

### i) メタロチオネン誘導 E1AF 発現遺伝子導入株の樹立

遺伝子導入の 3 週間後、12 株のネオマイシン耐性クローンが得られた。これらのうち  $ZnCl_2$  刺激により E1AF/PEA3 の発現が Western blotting で顕著にみられた細胞株を Ca9.22MTF とし、親株 Ca9.22 とともに実験に用いた。 $ZnCl_2$  で刺激した Ca9.22MTF で PEA3 は強く発現していたが、 $ZnCl_2$  非刺激 Ca9.22MTF での PEA3 の発現は軽度であった。Ca9.22 では PEA3 の発現はみられなかった。

## ii) Ca9.22MTF の ZnCl<sub>2</sub> 刺激の有無による MMP-9 および p21<sup>waf1/cip1</sup> の発現の変化

Western blotting において、Ca9.22 細胞および ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF 細胞は MMP-9 タンパクの発現は軽度であったが、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF では MMP-9 タンパクが強く発現していた。また、p21<sup>waf1/cip1</sup> タンパクの発現は Ca9.22 細胞、ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF 細胞では認められなかったが、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF では強く発現していた。免疫細胞学的検索でも、Ca9.22 と ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF 細胞では p21<sup>waf1/cip1</sup> の発現細胞はほとんど認められなかったが、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF 細胞では、多数の細胞の核に p21<sup>waf1/cip1</sup> が発現していた。p21<sup>waf1/cip1</sup> と MMP-9 の二重染色を行ったところ、MMP-9 と p21<sup>waf1/cip1</sup> がそれぞれ細胞質と核に一致して陽性の所見を示す細胞が ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF 細胞中に認められた。

## iii) 三次元浸潤モデルにおける浸潤活性

Ca9.22 と ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF 細胞では、コラーゲンゲル上に重層するのみでゲル内への浸潤は認められなかったのに対し、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF 細胞はゲル内に深く浸潤していた。

## iv) Flowcytometry による細胞周期の検索

ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF 細胞では、G1 が 38.2%、S 期が 41%、G2 期が 20%であったのに対し、ZnCl<sub>2</sub> 刺激した Ca9.22MTF では、G1 が 53%、S 期が 31.3%、G2 期が 14.9%であり、E1AF の発現により、G1 arrest の誘導が認められた。

### 【考察】

MMP および E1AF の発現が低い非浸潤性の口腔扁平上皮がん由来細胞株 Ca9.22 にメタロチオネン誘導 E1AF 発現ベクター hMT II E1AF を遺伝子導入し、亜鉛化合物存在下で培養すると E1AF タンパクを発現する細胞 Ca9.22MTF を樹立した。ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF では、E1AF 発現のレベルが上昇すると同時に、p21 タンパクの発現も上昇していた。これまでにレポーターアッセイによる *in vitro* の実験で E1AF は p21<sup>waf1/cip1</sup> の転写を亢進することが報告されているが、実際の細胞内においても E1AF の発現により p21<sup>waf1/cip1</sup> が誘導されることが本研究によりタンパクレベルで明らかになった。さらに、フローサイトメトリーによる解析で、E1AF の発現を亢進させた Ca9.22MTF 細胞では G1 期細胞の比率が増加していた。この結果は E1AF による p21 の転写亢進が細胞の G1 arrest を引き起こしたことを意味している。

これまでに E1AF は細胞外基質分解酵素である MMP 遺伝子の転写を亢進し、がん細胞の浸潤活性を高めていることが示されている。本研究においても、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF で E1AF の発現と関連した MMP-9 タンパクの発現増強が認められた。このことは、*In vitro* 三次元培養（ラフトカルチャー）により、がん細胞の浸潤性増殖が認められたことによっても証明された。

さらに、ZnCl<sub>2</sub> で刺激した Ca9.22MTF 細胞において、MMP-9 と p21<sup>waf1/cip1</sup> タンパクの両者の発現が同一細胞で確認された。このような結果は、E1AF はがん細胞内で p21<sup>waf1/cip1</sup> と MMP の発現をともに亢進させており、がん細胞の浸潤は増殖期以外の時期に生じている可能性が示唆された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則  
副 査 教 授 向 後 隆 男  
副 査 教 授 田 村 正 人  
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

E1AF induces both matrix metalloproteinase transcription and cell cycle arrest that occurs in the stage of cancer cell invasion.

(がん細胞が浸潤する際に、E1AFはマトリックスメタロプロテアーゼの転写を亢進すると同時に細胞周期を停止させる)

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目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

E1AFは *ets*-oncogene family に属する転写因子で、細胞外基質の分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP) -1、-3、-9の転写を亢進することにより、口腔扁平上皮がんの浸潤・転移に深く関わっていることが知られている。一方、レポーターアッセイにおいて、E1AFは cell cycle inhibitor である p21 の転写を亢進させることが示されている。本研究は、E1AFが *in vivo* において実際に細胞周期を停止させるのか、また E1AFは癌の浸潤性増殖と細胞周期とにどのように関与しているかのを明らかにする目的で行われた。

まずメタロチオネンプロモーターを有する真核細胞発現ベクターpSVneoHMT-TerにE1AFの全長遺伝子を挿入し、メタロチオネン誘導E1AF発現ベクターphMT E1AFを構築した。このphMT E1AF1 $\mu$ gを、E1AFの発現が低く、浸潤活性の低い口腔扁平上皮がん由来細胞株Ca9.22にLipofectoAmineを用いて遺伝子導入し、ネオマイシンを用いてクローニングした。次いで、培地にZnCl<sub>2</sub>を加えて培養し、細胞タンパクを抽出したのち、SDS-PAGEゲル電気泳動を行ってE1AF/PEA3の発現を調べ、強く発現したものをメタロチオネン誘導E1AF発現Ca9.22細胞(Ca9.22 MTF)として以下の実験に用いた。

Ca9.22および遺伝子導入細胞Ca9.22MTFを培養し、80%confluentに達した時点で培地にZnCl<sub>2</sub>を加えて培養したのち、細胞タンパクを抽出し、SDS-PAGEゲル

電気泳動を行った。1次抗体として抗 MMP-9 抗体、抗 p21 抗体を用い、HRP 標識二次抗体と反応させたのち、ECL により化学発光させ、フィルムに露光させて MMP-9 および p21 の発現を調べた。また Ca9.22 および Ca9.22MTF を APS コートスライドガラス上で培養し、さらに ZnCl<sub>2</sub> を加えて 12 時間培養を続け、固定後、一次抗体として抗 MMP-9 マウスモノクローナル抗体、抗 p21 ラビットポリクローナル抗体と反応させ、さらに二次抗体と反応させた。一部は二重染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。

その結果、Western blotting において、MMP-9 タンパクの発現は Ca9.22 と ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF では軽度であったが、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF では強く発現していた。p21 タンパクの発現は Ca9.22 と ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF では認められなかったが、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF では強く認められた。免疫細胞学的検索の結果は、Ca9.22 と ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF では p21 あるいは MMP-9 を発現した細胞はほとんど認められなかったが、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF では、多数の細胞の核に p21 が、また細胞質に MMP-9 が発現していた。p21 と MMP-9 の二重染色では、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF 中に、MMP-9 と p21 がそれぞれ細胞質と核に一致して陽性を示す細胞が多数認められた。

In vitro 三次元浸潤モデル(ラフトカルチャー)を用いた浸潤活性の検索では、Ca9.22 と ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF では、コラーゲンゲル上に重層するのみでゲル内への浸潤は認められなかったのに対し、ZnCl<sub>2</sub> 刺激 Ca9.22MTF はゲル内に深く浸潤していた。フローサイトメトリーを用いて細胞周期におよぼす影響について検索した結果は、ZnCl<sub>2</sub> 非刺激 Ca9.22MTF 細胞では、G1 が 38.2%、S 期が 41%、G2 期が 20%であったのに対し、ZnCl<sub>2</sub> 刺激した Ca9.22MTF では、G1 が 53%、S 期が 31.3%、G2 期が 14.9%であった。この結果は、E1AF による p21 の転写亢進が細胞の G1 arrest を引き起こしたことを意味している。

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 が MMP の発現のみならず、p21 の発現も亢進させていることをタンパクレベルで明らかにしたこと、ならびにがん細胞の浸潤は増殖期以外の時期に生じている可能性のあることを示唆した点が高く評価された。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。