

学位論文題名

Pim-1 activates cell motility that induces malignant phenotype of tongue carcinoma

(舌扁平上皮がんにおける Pim-1 の発現は細胞運動能を亢進し転移活性に関与する)

学位論文内容の要旨

Pim-1 は, MuLV (murine leukemia virus) の Proviral insertion により活性化する遺伝子として単離され, その後, セリン/スレオニンキナーゼをコードする遺伝子であることが明らかになった. Pim-1 は, 正常細胞では顆粒球にのみ発現し, リンパ性骨髄性悪性腫瘍細胞で高発現していることから, 血球系細胞のがん化への関与が示唆されている. 成長因子やサイトカイン刺激後, JAK/STAT 系を介して Pim-1 は発現調節され, G1/S の停止にはたらく p21 の阻害, あるいは G2/M の進行にはたらく CDC25 を活性化することで細胞周期の進行を促すことや, アポトーシス誘導にはたらく Bad の阻害, Bcl-2 を活性化することで抗アポトーシス効果をもたらす, 血球系細胞のがん化を導くことなどが報告されている. しかし, 上皮系悪性腫瘍, とくに口腔扁平上皮がんにおける Pim-1 の機能に関する研究はほとんどなされていない. そこで, 口腔扁平上皮がんにおける Pim-1 の役割について検索を行った.

口腔扁平上皮がん細胞株6種を用い Pim-1 タンパク質の発現を確認した. 検索を行った口腔扁平上皮がん細胞株 HSC2, HSC3, HSC4, OSC20, Ca9.22, SAS の全てに発現量に差はみられたが, Pim-1 の発現が認められ, 口腔扁平上皮がんの発生や悪性化に Pim-1 が関わっている可能性が示唆された.

次に, 実際の口腔がんにおける Pim-1 発現について患者からの病理標本を用いて Pim-1 の発現を免疫染色で検討した. 対象を, 北海道大学病院歯科診療センターを受診し, 病理組織学的に舌扁平上皮がんと診断された T1・T2 症例, 計 39 症例とした. Pim-1 抗体がホルマリン固定のパラフィン標本での発現を確認するかどうかを Pim-1 の発現がウエスタンブロットで確認されている, 大腸がん細胞株 HCT117 と, 発現を認めない膵がん細胞株 KPN4 を用いて検討した. 病理組織標本と同様にパラフィン包埋したセルブロック標本を作製し, 陽性細胞株 HCT117 の核に陽性所見を呈し, KPN4 が陰性である条件を決定し病理標本に適用した. その結果, 対象とした舌扁平上皮がん 39 症例中, Pim-1 は 17 例 (44%) で陽性だった.

Pim-1 の発現の有無と臨床的事項とくに患者の生命予後に大きな影響をもたらす所属リンパ節と遠隔臓器への転移および原病死の有無について検討した. その結果, Pim-1 陰性 22 例では, 頸部リンパ節転移 4 例, 遠隔転移 1 例, 原病死が 3 例であったのに対し, Pim-1 陽性症例 17 例では, 頸部リンパ節転移が 8 例, 遠隔転移が 5 例, 原病死が 10 例に認められ, Pim-1 陰性症例に比べ転移や死亡例が有意に多いことが明らかになった. 以上の結果より, Pim-1 の発現が口腔癌の転移活性と密接な関係をもっていることが示されたため, 腫瘍の転移メカニズムの一つである, がん細胞の運動能に対する Pim-1 の影響について分子レベルで検索を行った.

Pim-1 タンパク質を高発現している、口腔扁平上皮がん細胞株 HSC3 細胞に Pim-1 の siRNA を導入し、内在性 Pim-1 のノックダウンを行った。ウエスタンブロットで、Pim-1 タンパクの著しい減少を確認の後、Wound healing assay で細胞の運動能の変化を検索した。コントロール siRNA 導入細胞と Pim-1 siRNA 導入細胞の運動能を比較したところ、Pim-1 siRNA 導入細胞ではコントロールに比べ移動距離が有意に少なく($P < 0.01$)、Pim-1 siRNA 導入細胞での運動能が抑制されていることが明らかになった。さらに、Pim-1 siRNA 導入 HSC3 細胞を用い、ホイデンチャンパーによる Migration assay を行った。下層にケモアトラクタントとして上皮系腫瘍の増殖因子である EGF を添加し、4時間後にメンブレンを通過した細胞数を計測した。その結果、コントロール siRNA 導入細胞では、約 260 個の遊走細胞がみられたのに対し、Pim-1 ノックダウン細胞では約 140 個と遊走細胞が約半数に減少し、細胞の運動能が有意に低下することが示され($P < 0.01$)、Pim-1 は、細胞の運動能や遊走能を亢進し、転移活性に関与することが示唆された。

細胞が運動する際には、細胞の基質への接着、細胞骨格フィラメントの再構成、細胞膜の伸長が連続的に生じていて、この過程には低分子量 G タンパクである Rho ファミリータンパクが重要な役割を演じている。Rho ファミリーは Rho、Rac1、Cdc42 からなり、細胞運動の先端部分での Rac1 によるラメリポディアと Cdc42 によるフィロポディアとよばれる細胞膜の特殊な ruffling 構造の形成が重要である。siRNA を用い Pim-1 の knock down を行い、増殖因子である EGF 刺激下で Rac1/Cdc42 のリン酸化レベルを Western blot で検索したところ、Pim-1 ノックダウンによって Rac1/Cdc42 のタンパク発現量に変化はみられなかったが、EGF 刺激により増加した Rac1/Cdc42 リン酸化タンパクは pim-1 siRNA 導入により減少し、pim-1 をノックダウンすることでリン酸化が抑制されることが明らかになった。

低分子量 G タンパクは GTP と結合することで活性型の状態、GTPase 活性化タンパク GAP によって、GDP と結合すると不活性化の状態になる。この細胞運動能制御機構に Pim-1 がどのように関与しているかについて検討した。EGF で刺激した Pim-1 ノックダウン HSC3 細胞およびコントロール細胞から抽出したタンパクを出発材料として、GTP pull down assay により GTP に結合した活性型の Rac1、Cdc42 をウエスタンブロットで検出した。EGF による刺激後 1 分で GTP 結合活性化型 Rac1 の発現亢進がみられたが、siRNA を導入し Pim-1 の発現をノックダウンした細胞では活性型 Rac1 の発現は低下した。一方、活性型 Cdc42 の発現は Pim-1 のノックダウンによる影響を受けなかった。

この結果より、内在性の Pim-1 は、GTP と結合した活性型の Cdc42 に影響を与えることなく、活性型 Rac1 の発現を亢進しラメリポディアの形成することで細胞運動を促進することが示唆された。

まとめ

1. 検索を行った6種類の口腔扁平上皮癌細胞株全てに Pim-1 の発現が認められた。
2. 39 例の T1、T2 早期舌扁平上皮がん患者の生検標本で Pim-1 の発現を免疫染色で検索したところ、17 例(44%)に陽性所見が認められ、Pim-1 陽性症例では転移例が有意に多く、生存率の低下がみられた。
3. siRNA による Pim-1 ノックダウン細胞を用いた実験で、細胞運動能の低下がみられ、Rho ファミリータンパク Rac1/Cdc42 のリン酸化の抑制、さらに GTP 結合型である活性型 Rac1 の発現低下がみられた。
4. 以上の結果、Pim-1 タンパクは Rac1 の活性化を介して口腔がん細胞の運動能を亢進することで、腫瘍の転移活性を促す遺伝子の一つであることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 北 川 善 政

学 位 論 文 題 名

Pim-1 activates cell motility that induces malignant phenotype of tongue carcinoma

(舌扁平上皮がんにおける Pim-1 の発現は細胞運動能を亢進し転移活性に関与する)

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。

Pim-1 はセリン/スレオニンキナーゼをコードする遺伝子で、正常細胞では顆粒球にのみ発現し、リンパ性骨髄性悪性腫瘍細胞で高発現していることから、血球系細胞のがん化への関与が示唆されているが、口腔扁平上皮がんにおける Pim-1 の機能に関する研究はほとんどなされていない。本研究は、口腔扁平上皮がんにおける Pim-1 の役割について検索したものである。

まず、口腔扁平上皮がん細胞株 6 種を用いて Pim-1 タンパク質の発現を検索し、発現量に差はみられるものの、口腔扁平上皮がん細胞株 HSC2, HSC3, HSC4, OSC20, Ca9.22, SAS の全てにおいて、Pim-1 の発現が認められることを確認した。

次に、北海道大学病院歯科診療センターを受診し、病理組織学的に舌扁平上皮がんと診断された T1・T2 症例、計 39 症例の病理標本を対象として、実際の口腔がんにおける Pim-1 の発現を免疫染色で検討した。その結果、Pim-1 は 39 症例中 17 例 (44%) で発現していた。さらに Pim-1 陰性 22 例では、頸部リンパ節転移 4 例、遠隔転移 1 例、原病死が 3 例であったのに対し、Pim-1 陽性症例 17 例では、頸部リンパ節転移が 8 例、遠隔転移が 5 例、原病死が 10 例と、Pim-1 陰性症例に比べて転移や原病死例が有意に多いことが明らかとなり、Pim-1 の発現は口腔癌の転移活性と密接な関係をもっていることが示唆された。

Pim-1 タンパク質を高発現している HSC3 細胞に Pim-1 の siRNA を導入して Pim-1 をノックダウンし、ウエスタンブロットで Pim-1 タンパクの減少を確認後、Wound healing assay ならびに Boyden chamber による Migration assay で細胞の運動能ならびに遊走能の変化を

検索した。その結果、Pim-1 siRNA 導入細胞ではコントロールに比べて移動距離が有意に少なく ($P < 0.01$)、細胞の遊走能が有意に低下する ($P < 0.01$) ことが明らかとなり、Pim-1 は細胞の運動能や遊走能を亢進することにより、転移活性に関与することが示唆された。

そこで、細胞が運動する際、細胞運動の先端部分で重要な役割を演じている Rac1, Cdc42 について、EGF 刺激下でウエスタンブロットにより検索したところ、Pim-1 siRNA 導入細胞では Rac1, Cdc42 のタンパク発現量に変化はみられなかったが、EGF 刺激により増加した Rac1/Cdc42 リン酸化タンパクが減少し、pim-1 をノックダウンすることにより Rac1/Cdc42 のリン酸化が抑制されることが明らかになった。

さらに、低分子量 G タンパクの活性化と Pim-1 の関係を検討するため、EGF で刺激した Pim-1 ノックダウン HSC3 細胞とコントロール細胞から抽出したタンパクを出発材料として、GTP pull down assay により GTP に結合した活性型の Rac1, Cdc42 をウエスタンブロットで検出した。その結果、EGF 刺激後 1 分で GTP 結合活性化型 Rac1 の発現亢進がみられたが、siRNA 導入細胞では活性型 Rac1 の発現が低下した。一方、活性型 Cdc42 の発現は Pim-1 のノックダウンによる影響を受けなかった。これらの結果は、Pim-1 は GTP と結合した活性型の Cdc42 に影響を与えることなく、活性型 Rac1 の発現を亢進し、ラメリポディアを形成して細胞運動を促進することを示している。

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。

主な質問事項は、

- 1) si RNA の機能は、
 - 2) 切片標本を boil する理由は、
 - 3) Wound healing assay と Migration assay の違いは、
 - 4) 低分子量 G タンパクとはどのようなものか、
 - 5) GTP, Rac1, Cdc42, GAP, G protein の関係は、
 - 6) ラメリポディアとは、
- 等であった。

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、Pim-1 タンパクが Rac1 の活性化を介して口腔がん細胞の運動能を亢進することにより、腫瘍の転移活性を促す遺伝子の一つであることを明らかにしたことが高く評価された。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。