

A study on epithelial-to-mesenchymal transition mediated by Δ Np63 in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

後藤, 雄一
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21984>

出版情報 : 九州大学, 2011, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における
 Δ Np63 を介した上皮-間葉転換に関する研究

**A study on epithelial-to-mesenchymal transition mediated by Δ Np63
in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma**

2012 年

九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

後藤 雄一

指導教員

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は下記の学術雑誌に投稿中である。

Down-regulation of Δ Np63 Possibly Induces Acquisition of Mesenchymal Phenotype and Involves in Invasion and Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma

Yuichi Goto, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Takahiro Kiyosue, Mitsuhiro Hirano, Teppei Jinno, Takeshi Toyoshima, Ryoji Kitamura, Kazunari Oobu, and Seiji Nakamura

Submitted to **Cancer Research**

2011 年 The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research での 2012 IADR Hatton Award Competition において

「Possible involvement of Δ Np63 in invasion and metastasis of OSCC」として本研究の一部を発表し、The Hatton Award 2012 Finalist として表彰された。

2011 年 第 56 回日本口腔外科学会総会にて

「口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における Δ Np63 を介した上皮-間葉転換の関与」として本研究の一部を発表し、優秀ポスター発表賞を受賞した。

略語一覧

ALP: alkaline phosphatase (アルカリホスファターゼ)
ANOVA: analysis of variance
Bcl-2: B-cell lymphoma-2
BPB: bromophenol blue (ブロモフェノールブルー)
BrdU: 5-bromo-2-deoxyuridine
CDK: cyclin dependent kinase (サイクリン依存性キナーゼ)
cDNA: complementary DNA (相補的 DNA)
CK: cytokeratin (サイトケラチン)
DAB: 3,3'-diaminobenzidine (ジアミノベンジジン)
DEPC: diethyl pyrocarbonate (ジエチルピロカーボネート)
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates (デオキシリボヌクレオチド三リン酸)
DTT: dithiothreitol (ジチオスレイトール)
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
EMT: epithelial-to-mesenchymal transition (上皮-間葉転換)
FBS: fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
FITC: fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE: hematoxylin and eosin (ヘマトキシリン-エオジン)
HEK: human embryonic kidney (ヒト胎児腎臓細胞)
HRP: horse radish peroxidase
ICC: immunocytochemistry (免疫細胞化学的染色)
IgG: Immunoglobulin G (免疫グロブリン G)
IHC: immunohistochemistry (免疫組織化学的染色)
LB: Luria-Bertani
mRNA: messenger RNA
N.S.: not significant
OSCC: oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)
PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)
PCR: polymerase chain reaction
PI: propidium iodide (ヨウ化プロピジウム)
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride (フッ化フェニルメチルスルホニル)
P/S: penicillin/streptomycin (ペニシリン/ストレプトマイシン)
PVDF: poly vinylidene difluoride (ポリフッ化ビニリデン)
ROC: receiver operating characteristic
RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA: small interfering RNA
TAD: transactivation domain (転写活性領域)
TBS: Tris-buffered saline (トリス緩衝食塩水)
TGF β : transforming growth factor β (形質転換増殖因子 β)
WB: Western blotting
WST-1: water soluble tetrazolium-1 (水溶性テトラゾリウム塩)

目 次

要 旨	5
緒 言	8
材料および方法	12
結 果	26
研究 1 OSCC 細胞株における Δ Np63 の発現および機能に関する研究	
1-1. OSCC 細胞株における Δ Np63 および EMT 関連分子の発現	26
1-2. Δ Np63 ノックダウンが OSCC 細胞の増殖、分化、遊走および アポトーシスに与える影響	29
1-3. Δ Np63 過剰発現が OSCC 細胞の増殖、分化、遊走および アポトーシスに与える影響	35
研究 2 OSCC 生検材料における Δ Np63、vimentin および E-cadherin の 免疫組織化学的検討	
2-1. OSCC 生検材料における Δ Np63、vimentin および E-cadherin の 発現様式	42
2-2. 浸潤先端部における vimentin の発現および Δ Np63 発現強度の 減弱の有無と臨床病理組織学的所見との関連	42

考 察	47
謝 辞	53
参考文献	54

要 旨

近年、癌抑制遺伝子 p53 のホモログである Δ Np63 が、器官発生に必須である上皮-間葉転換 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) に関与していることが報告されている。EMT が誘導された細胞は線維芽細胞様の形態変化、上皮系マーカーの発現量減少、間葉系マーカーの発現量増加、遊走能の亢進、増殖能の低下、細胞間接着の減弱などの表現型を示し、このような細胞特性が癌の浸潤・転移に寄与していることが最近の研究により示唆されている。しかしながら、その分子機構については明らかではない。本研究では、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) の浸潤・転移の分子機構を解明するために、浸潤・転移における Δ Np63 を介した EMT の関与について検討を行った。

以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. OSCC 細胞株における Δ Np63 の発現および機能に関する研究

OSCC 細胞株 (HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS) およびヒト胎児由来腎細胞 (HEK293) を用いて、 Δ Np63、上皮系マーカーである E-cadherin、cytokeratin (CK) 5 および CK14、間葉系マーカーである vimentin と N-cadherin の発現を検討した。その結果、ほとんどの細胞株において Δ Np63 の発現を認めたが、高転移株である SQUU-B 細胞では Δ Np63 の発現を認めず、vimentin の発現を認めた。次に、OSCC 細胞の増殖、分化、および遊走における Δ Np63 の機能について検討した。まず、 Δ Np63 を高発現していた HSC-2 細胞に small interfering RNA (siRNA) を導入し、 Δ Np63 をノックダウンしたところ、多角形であった HSC-2 の細胞形態が紡錘形へと変化し、細胞増殖活性の低下および遊走能の亢進が認められた。また、上皮系マーカーの発現量は減少し、間葉系マーカーの発現

量は増加した。次に、 $\Delta Np63$ の発現を認めなかった SQUU-B 細胞に $\Delta Np63$ 発現ベクターを導入し、同様に機能解析を行った。その結果、empty ベクターを導入した SQUU-BC 細胞は紡錘形であったのに対し、 $\Delta Np63$ を過剰発現させた SQUU-BO 細胞は多角形に変化し、SQUU-BC 細胞と比較して細胞増殖活性の亢進、遊走能の低下、上皮系マーカーの発現量増加、および間葉系マーカーの発現量減少を認めた。

2. OSCC 生検材料における $\Delta Np63$ 、vimentin および E-cadherin の免疫組織化学的検討

OSCC 生検材料における $\Delta Np63$ 、E-cadherin および vimentin の発現を免疫組織化学的に検索した。腫瘍中心部では、 $\Delta Np63$ と E-cadherin は癌細胞のほぼ全てに発現を認めたが、浸潤先端部では両者の発現が減弱している癌細胞を認め、これらの細胞では vimentin の発現が亢進していた。次に、浸潤先端部の癌細胞における vimentin 陽性率を算出し、臨床病理組織学的所見との関連について検討した。その結果、vimentin 陰性群 (<5%) に比べ、陽性群 ($\geq 5\%$) では、頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。また、浸潤先端部の癌細胞における $\Delta Np63$ 発現強度の減弱の有無についても同様に検討を行ったところ、 $\Delta Np63$ 発現強度の減弱を有する群では頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度の発生頻度が有意に高かった。さらに、疾患特異的累積 5 年生存率は、vimentin 陽性群および $\Delta Np63$ の発現強度の減弱を有する群は、vimentin 陰性群および $\Delta Np63$ の発現強度の減弱を認めない群とそれぞれ比較して有意に低く、予後不良であった。

本研究により、OSCC 細胞において $\Delta Np63$ の発現減弱が EMT を誘導し、間葉系細胞様の形質獲得に関与していることが示された。また、生検材料の浸潤先端

部で Δ Np63 および E-cadherin の発現が減弱し、vimentin の発現が亢進している癌細胞を認めたことから、EMT が誘導されている可能性が示された。さらに、浸潤先端部の癌細胞における vimentin 陽性率および Δ Np63 の発現強度の減弱の有無は、頸部リンパ節転移や遠隔転移と強い関連を示した。以上より、 Δ Np63 を介した EMT は OSCC の浸潤・転移に関与することが示唆された。

緒 言

近年、癌の診断技術や手術手技の進歩ならびに新たな抗癌剤の開発などにより、その治癒率は向上してきている。しかしながら、転移を伴う症例の生存率は依然として低く、転移は患者の生命を脅かす最も大きな予後因子の1つである(1-4)。口腔扁平上皮癌(oral squamous cell carcinoma: OSCC)もその例外ではなく、所属リンパ節である頸部リンパ節転移や肺などへの遠隔転移により、その生存率が著しく低下する(4-7)。転移のない OSCC 症例の5年生存率が76%であるのに対して、頸部リンパ節転移を認めた症例では41%、遠隔転移を認めた症例では12%と低下する(8)。それゆえ、頸部リンパ節転移および遠隔転移の制御は OSCC 患者の生存率向上に必要不可欠であり、その分子機構の解明が待たれている。

転移のメカニズムについて、1889年に Paget が“seed and soil theory”を、1928年に Ewing が“anatomical-mechanical theory”という概念を提唱し、転移における様々な研究が始まった(9-12)。この20世紀初頭より進められた癌の転移に関する研究は、1970年代に動物を用いた転移モデルが確立されたことで、その分子機構の解析が飛躍的に進むこととなった(13,14)。一般に転移は、癌細胞の原発巣からの離脱、細胞外基質への浸潤、血管やリンパ管への侵入、標的臓器への移動、標的臓器血管内皮細胞への接着、臓器内への浸潤および腫瘍形成と多くの段階を経て成立するとされており、これらの各段階において様々な分子が複雑に関与している(14-20)。転移の最も初期段階である癌の浸潤については、転移を早期に防止するという観点から多くの研究がなされてきた。特に、癌細胞が原発巣から離脱し脈管に浸潤するまでの過程は、病理組織学的にも観察が容易であり、浸潤・転移研究の中心的な役割を担った発見も多い。中でも Thiery (2002) は、浸潤先端部の癌細胞において細胞間接着因子 E-cadherin の発現が減弱し、上皮とし

ての表現型が失われ、間葉系細胞様の性質に変化したことを見出している (21)。

この癌細胞の特性の変化は、近年注目を集めている上皮-間葉転換

(epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) という現象が示す上皮細胞の間葉系細胞様細胞への形質転換と類似する点が多いことから、後に癌の浸潤・転移と EMT との関連性について研究が進められるきっかけとなった (21-23)。EMT は、1982 年に Hay が提唱してから定着した概念で、EMT が誘導された上皮細胞は、線維芽細胞様の形態変化、上皮系マーカーの発現低下、間葉系マーカーの発現上昇、細胞極性や細胞接着の喪失、遊走能の亢進および増殖能の低下を示し、間葉系細胞様の形質を獲得するとされている (21, 24-26)。本来 EMT は、器官形成において必須の現象として広く知られ、胚形成の初期段階で外胚葉である原始線条から EMT が誘導された細胞が中胚葉系の細胞となり、心臓の一部を形成する (27, 28)。また、頭部神経堤の癒合時には、EMT が誘導された細胞が組織内を遊走し、顎顔面の骨格筋、骨、軟骨および象牙芽細胞へ分化することが知られている

(29-32)。近年では、癌の発生段階において EMT が誘導され、それらの細胞が癌の浸潤・転移に関与している可能性が示されている (33)。すなわち、癌細胞は進行の過程で EMT が誘導され、間葉系細胞様の形質を獲得し、細胞間接着が減弱することにより原発巣から離脱するとともに、細胞骨格が再構築され遊走能が亢進することで、その後の間質への浸潤ならびに標的臓器への転移を容易にしている (21-23, 33, 34)。現在、この EMT を誘導する因子が徐々に明らかにされつつあるものの、詳細な分子機構の解明には至っていない。

癌細胞の EMT を誘導する分子の 1 つとして、我々の研究グループは癌抑制遺伝子 p53 ファミリーである Δ Np63 に着目し、OSCC の発生、増殖および分化における Δ Np63 の役割について報告してきた。p63 は 2 種類のプロモーター領域の違いにより、N 末端側に転写活性領域 (transactivation domain: TAD) を有する

TAp63 と TAD が欠損した $\Delta Np63$ の 2 つのアイソフォームに分けられ、さらに C 末端側での選択的スプライシングによりそれぞれ 3 つのバリエーション (α, β, γ) を持つ (35-39)。p53 および TAp63 は、細胞老化や DNA 傷害に伴うアポトーシス亢進および細胞増殖の抑制に関与するとされているのに対し $\Delta Np63$ は p53 および TAp63 の転写領域に結合し、標的遺伝子の発現をドミナントネガティブに抑制する。その結果、細胞増殖の亢進や抗アポトーシスに働くと考えられ、*oncoprotein* として認識されている (40-50)。我々はこれまでの研究において、口腔白板症の上皮性異形成が重度になるにつれて $\Delta Np63$ の陽性率が高くなり、陽性率が高い症例ほど癌化しやすいこと、さらに OSCC では低分化なものほど $\Delta Np63$ の陽性率が有意に高く、 $\Delta Np63$ 高発現群では頸部リンパ節転移や遠隔転移の発生頻度が有意に高いことを報告してきた (51)。一方、Barbieri (2006) らは p63 の発現が SCC 細胞株に与える影響をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、p63 のノックダウンにより間葉系細胞マーカーの 1 つで神経細胞間接着因子である *N-cadherin* などの発現が有意に増加し、細胞遊走能が亢進したと述べている (52)。また Carroll (2006) らは、乳癌細胞の $\Delta Np63$ ノックダウンにより細胞接着因子である *integrin* の発現が減弱したことを示している (53)。これらの細胞特性は、EMT が誘導された細胞の表現型と類似しており、癌細胞での $\Delta Np63$ の発現が EMT と関連している可能性を示している。しかしながら、 $\Delta Np63$ を介した EMT の分子機構についてはいまだ不明な点が多い。

そこで本研究では、OSCC の浸潤・転移における $\Delta Np63$ を介した EMT の関与を明らかにするために、まず OSCC 細胞株を用いて、 $\Delta Np63$ および EMT に関連する分子マーカーの発現について検討した。次に、 $\Delta Np63$ をノックダウンまたは過剰発現させることにより、OSCC 細胞の増殖、分化、遊走およびアポトーシスがどのように影響を受けるかについて検討を行った。さらに、OSCC 患者の生検

材料を用い、 Δ Np63、E-cadherin および間葉系細胞の中間径フィラメントである vimentin の発現を免疫組織化学的に検索し、浸潤先端部での vimentin の発現および Δ Np63 発現強度の減弱の有無と臨床病理組織学的所見ならびに予後との関連について検討を行った。

材料および方法

1. 対象患者

対象は、2004 年 1 月から 2008 年 12 月に九州大学病院顎口腔外科を受診し、病理組織学的に OSCC と診断された 78 例（男性：54 例、女性：24 例、平均年齢：61.9±15.0 歳〈19～88 歳〉）であった（表 1）。

2. 生検材料の病理組織学的診断

OSCC の組織学的悪性度分類として、Grade 分類（WHO）と山本-小浜の分類（YK 分類）を用いた（51, 52）。Grade 分類により腫瘍細胞の分化度に応じて Grade 1（高分化型）、Grade 2（中分化型）、Grade 3（低分化型）に、また、YK 分類により腫瘍宿主境界部における浸潤様式に応じて Grade を 1、2、3、4C、4D に分けた。

YK 分類の基準を以下に示す：Grade 1：腫瘍と宿主の境界線が明瞭である。Grade 2：境界線にやや乱れがある。Grade 3：境界線は不明瞭で大小の癌胞巣が散在している。Grade 4C：境界線は不明瞭で小さな癌胞巣が索状に浸潤している。Grade 4D：境界線は不明瞭で癌は胞巣を作らず、び漫性に浸潤している。

表1 OSCC患者78例の内訳

臨床病理組織学的所見		症例数	(%)
性別			
	男性	54	(69.2)
	女性	24	(30.8)
原発部位			
	舌	42	(53.9)
	歯肉	24	(30.8)
	口底	9	(11.5)
	頬粘膜	3	(3.8)
臨床発育様式			
	表在型	8	(10.2)
	外向型	13	(16.7)
	内向型	57	(73.1)
臨床病期 (Stage分類)			
	I	15	(19.2)
	II	27	(34.6)
	III	12	(15.4)
	IV	24	(30.8)
組織学的悪性度			
分化度 (Grade分類)			
	Grade 1	59	(75.6)
	Grade 2	14	(18.0)
	Grade 3	5	(6.4)
浸潤様式 (YK分類)			
	Grade 1	2	(2.6)
	Grade 2	16	(20.5)
	Grade 3	41	(52.6)
	Grade 4C	15	(19.2)
	Grade 4D	4	(5.1)

3. 細胞培養

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-2 (口底癌由来; 低転移株)、HSC-3 (舌癌由来; 低転移株)、SQUU-A (舌癌由来; 非転移株)、SQUU-B (舌癌由来; 高転移株)、SAS (低分化型舌癌由来; 低転移株) 細胞およびヒト胎児腎細胞をアデノウィルスの E1 遺伝子により形質転換して樹立された細胞株である human embryonic kidney (HEK) 293 細胞を用いた (54-58)。培地には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 (Sigma-Aldrich, USA) に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, Sigma-Aldrich, USA)、100 unit/ml のペニシリンおよびストレプトマイシン (penicillin/streptomycin: P/S, Invitrogen, USA) を添加したものをを用い、37°C、5%CO₂ 存在下で細胞培養を行った。

4. RNA の抽出および相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) の合成

RNA 抽出は acid guanidium-phenol-chloroform 法を用いた。まず、培養皿中の細胞に TRIzol® (Invitrogen, USA) を 1.0 ml 加え、セルスクレーパーにて破碎した。その後、これらに 0.2 ml のクロロホルム (Nacalai Tesque, Japan) を加えて攪拌し、4°C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った後、RNA を含む水層を採取した。これに 1.0 ml のイソプロパノール (Nacalai Tesque, Japan) を加えて攪拌後、4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去後に得られた RNA ペレットを 75%エタノール (Nacalai Tesque, Japan) にて洗浄した。さらに、4°C、14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、再沈殿させたペレットを乾燥させ、50 µl の 0.1%ジエチルピロカーボネート (diethyl pyrocarbonate: DEPC) 処理水に溶解した。その後、吸光度計 (NANO DROP 1000; Thermo Scientific, USA) にて total RNA の濃度を測定した。

cDNA の合成には、DEPC 処理水に約 2.0 µg の total RNA、25 unit/ml の recombinant RNase inhibitor (Nacalai Tesque, Japan) を 1.0 µl、100 mM Tris-HCl (pH 8.8)、500 mM

KCl および 0.8%Nonidet P40 を含む 10×Taq DNA Polymerase Buffer を 2.0 μ l、25 mM $MgCl_2$ (以上、Bio Basic, Canada) を 4.0 μ l、2.0 mM デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphates: dNTP) mix (Toyobo, Japan) を 2.0 μ l、50 mM Random Hexamers を 1.0 μ l、50 unit/ml MuLV Reverse Transcriptase (以上、Roche Diagnostics, Swiss) を 1.0 μ l 加えて合計 20.0 μ l とし、42°C で 15 分間インキュベートした。その後、99 °C で 5 分間加温して酵素を失活させ、5°C で 5 分間冷却し、これを messenger RNA (mRNA) の発現解析に用いた。

5. reverse transcriptase (RT) - polymerase chain reaction (PCR) および real-time PCR による mRNA の発現解析

RT-PCR は滅菌水に template DNA を 100 ng、10×Taq DNA Polymerase Buffer を 1.25 μ l、25 mM $MgCl_2$ を 1.0 μ l、5 unit/ml Taq DNA polymerase を 0.1 μ l、2.0 mM dNTPmix を 0.5 μ l、20 pM センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μ l 加えて全反応量を 13.5 μ l とした。反応条件は、熱変性は 94°C で 1 サイクル目が 3 分間、2 サイクル目以降は 30 秒間で行い、アニーリングは 60°C で 30 秒間、伸長反応は 72°C で 15 秒間とした。

real-time PCR は Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA) を用いて行った。滅菌水に Master Mix を 10 μ l、template DNA を 10 ng、20 pM センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μ l 加え、全反応量を 20.0 μ l とした。反応条件は、熱変性は 95°C で 1 サイクル目が 5 分間、2 サイクル目以降は 30 秒間で行い、アニーリングは 30 秒間、伸長反応は 72°C で 15 秒間とし、全 45 サイクルの増幅を行った。

解析する遺伝子として、 *Δ Np63*、*TAp63*、*E-cadherin*、上皮基底細胞のマーカーである *cytokeratin (CK) 5* ならびに *CK14*、*vimentin* および *N-cadherin* を用いた。また、

これらの mRNA 発現量を定量化するため、ハウスキーピング遺伝子である *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) を用いて補正し、 $\Delta\Delta C_t$ 法により相対的発現量を算出した。なお、得られた PCR 産物を 2.0% アガロースゲル (Invitrogen, USA) 上で電気泳動を行い、臭化エチジウム溶液 (Nacalai Tesque, Japan) を用いて染色し、紫外線により可視化した。各プライマー配列、PCR 産物のフラグメントサイズ、アニーリング温度を表 2 に示す。

表2 PCRのプライマーと反応条件

mRNA	PCR産物の サイズ (bp)		プライマーの塩基配列	アニーリング 温度(°C)
<i>ΔNp63</i>	117	forward	5'-TGCCCAGACTCAATTTAGTGAG-3'	60
		reverse	5'-TGCGCGTGGTCTGTGTTATA-3'	
<i>TAp63</i>	127	forward	5'-TGTATCCGCATGCAGGACT-3'	60
		reverse	5'-CTGTGTTATAGGGACTGGTGGAC-3'	
<i>E-cadherin</i>	196	forward	5'-TGCTCTTCCAGGAACCTCTG-3'	60
		reverse	5'-AGGGAAACTCTCTCGGTCCA-3'	
<i>CK5</i>	207	forward	5'-GGTTGATGCACTGATGGATG-3'	60
		reverse	5'-TACCAGGACTCGGCTTCTGT-3'	
<i>CK14</i>	135	forward	5'-ATCCTGCTGGACGTGAAGAC-3'	60
		reverse	5'-GGAGGAGGTCACATCTCTGG-3'	
<i>vimentin</i>	196	forward	5'-TGCCCTTAAAGGAACCAATG-3'	60
		reverse	5'-CTCAATGTCAAGGGCCATCT-3'	
<i>N-cadherin</i>	163	forward	5'-TGAAGGAGTCAGCAGAAGTTGA-3'	60
		reverse	5'-TCAGACCTGATCCTGACAAGC-3'	
<i>Bcl-2</i>	164	forward	5'-TACAACATCACAGAGGAAGTAGACTG-3'	60
		reverse	5'-GAGGGGGTGTCTTCAATCAC-3'	
<i>GAPDH</i>	104	forward	5'-ATCAGCAATGCCTCCTGCAC-3'	60
		reverse	5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'	

6. タンパク質の抽出

培養皿中の細胞をリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline: PBS; 137mM NaCl、2.7mM KCl、8.1mM Na₂HPO₄、1.5mM KH₂PO₄) にて洗浄後、lysis buffer (20 mM HEPES、40mM KOH、150 mM NaCl、0.5%Nonidet P40、50 mM NaF、10 mM Na₄P₂O₇・10H₂O、1 mM ジチオスレイトール 〈dithiothreitol: DTT〉、1 mM フッ化フェニルメチルスル

ホニル (phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF)、Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque, Japan) を 90 μ l 加え、セルスクレーパーにて破碎した。その後、4°C、10,000 rpm で 5 分間遠心分離し、タンパク質を含む上清を 70 μ l 採取し、これにサンプルバッファーとして 1 M Tris-HCl (pH 6.8)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、グリセロール、ブロモフェノールブルー (bromophenol blue: BPB) を混和し 1 mM DTT を加えたものを 20 μ l 添加した。さらに、98°C で 2 分間熱変性処理を行い、これをタンパク質の発現解析に用いた。

7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) および Western blotting

抽出したタンパク質は 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動 (60 mA、120 分間) し、ポリフッ化ビニリデン (poly vinylidene difluoride: PVDF) 膜 (Millipore, USA) に転写 (200 mA、180 分間) した。その後、抗体の非特異的吸着を防ぐため、10%スキムミルク (Nacalai Tesque, Japan) で 30 分間反応させ、washing buffer (1 M Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 0.05% Tween 20) にて 15 分間洗浄し、一次抗体を 4°C にて 24 時間反応させた。使用した一次抗体を表 3 に示す。二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス免疫グロブリン G (Immunoglobulin G: IgG) ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch, USA, 希釈倍率 1:5000) または HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch, USA, 希釈倍率 1:5000) を室温で 30 分間反応させた。最後に、washing buffer にて洗浄後、SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA) にて標識し、特異的なバンドを検出した。なお、陽性対照としてハウスキーピング遺伝子である β -actin を用いた。

**表3 免疫組織化学的染色、免疫細胞化学的染色、およびWestern blotting
使用した一次抗体**

抗体 (clone名, 製造会社, 国)	用途	希釈倍率
monoclonal mouse anti-human ΔNp63 antibody (clone 4A4, Dako Cytomation, Denmark)	IHC, ICC	1:100
	WB	1:1000
monoclonal rabbit anti-human E-cadherin antibody (clone EP-700Y, Millipore, USA)	IHC, ICC	1:500
	WB	1:1000
monoclonal rabbit anti-human CK5 antibody (clone EP1601Y, Epitomics, USA)	WB	1:1000
monoclonal mouse anti-human CK14 antibody (clone LL002, Chemicon, USA)	WB	1:1000
monoclonal mouse anti-human vimentin antibody (clone V9, Sigma-Aldrich, USA)	IHC	1:100
	WB	1:1000
polyclonal goat anti-human vimentin antibodies (Millipore, USA)	ICC	1:50
monoclonal mouse anti-human β-actin antibody (clone AC-15, Sigma-Aldrich, USA)	WB	1:2000

IHC : 免疫組織化学的染色、ICC : 免疫細胞化学染色、WB : Western blotting

8. 免疫細胞化学的染色

免疫細胞化学的染色では、OSCC 細胞をカバーガラス上で 50%コンフルエントになるまで培養し、75%メタノールで 20 分間固定を行った。次に、カバーガラスをパラフィルム上に移し、PBS にて 5 分間で 2 回洗浄した。抗体の非特異的吸着を防ぐために 5%スキムミルクを室温で 30 分間反応させた。使用した一次抗体を表 3 に示す。ΔNp63 と vimentin の蛍光免疫二重染色では、マウス抗 ΔNp63 モノクローナル抗体 (clone 4A4, Dako Cytomation, Denmark, 希釈倍率 1:100) およびヤギ抗 vimentin ポリクローナル抗体 (Millipore, USA, 希釈倍率 1:50) を室温で 1 時間反応させた後、PBS にて 5 分間で 3 回洗浄した。その後、蛍光標識された抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Alexa Fluor® 488, Molecular Probes, USA, 希釈倍率 1:400) および 抗ヤギ IgG ポリクローナル抗体 (Alexa Fluor® 546, Molecular Probes, USA, 希釈倍率 1:400) を室温で 30 分間反応させ、PBS にて 5 分間で 3 回洗浄し、1 μg/ml の Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA) にて 5 分間核染色を行った。

E-cadherin と vimentin の蛍光免疫二重染色では、ウサギ抗 E-cadherin モノクローナル抗体 (clone EP-700Y, Millipore, USA, 希釈倍率 1:500) およびマウス抗 vimentin モノクローナル抗体 (clone V9, Sigma-Aldrich, USA, 希釈倍率 1:100) を室温で 1 時間反応させた後、PBS にて 5 分間で 3 回洗浄した。その後、蛍光標識された抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Alexa Fluor® 488, Molecular Probes, USA, 希釈倍率 1:400) および 抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Alexa Fluor® 546, Molecular Probes, USA, 希釈倍率 1:400) を室温で 30 分間反応させ、PBS にて 5 分間で 3 回洗浄し、Hoechst 33342 を用い同様に核染色を行った。その後、PBS で洗浄し、水溶性封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) にてスライドグラス上で封入し、蛍光顕微鏡 (BZ-8000; KEYENCE, Japan, 対物レンズ ×20) にて観察を行った。

9. *ΔNp63* small interfering RNA (siRNA) の導入

ΔNp63 を高発現している HSC-2 細胞に siRNA を導入し、*ΔNp63* の機能解析を行った。なお、*ΔNp63* siRNA 導入にはリポフェクション法 (使用試薬; Oligofectamine™, Invitrogen, Japan) を用いた。まず、24 穴プレートに 2.5×10^4 /穴の HSC-2 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養後、無血清の DMEM/F-12 に培地交換し、120 nM の *ΔNp63* siRNA (Sigma-Aldrich, Japan) を導入した。さらに、37°C、5%CO₂ 存在下で 6 時間培養後、培地を FBS および P/S 含有の DMEM/F-12 に交換した。siRNA 導入 48 時間後に mRNA を、72 時間後にタンパク質を抽出し、それぞれの発現解析を行った。なお、使用した *ΔNp63* siRNA の塩基配列は、5'-GGACAGCAGCATTGATCAATT-3'である。また陰性対照として scrambled siRNA (5'-CAGTCGCGTTTGGCGACTGG-3') の導入を行った。

10. $\Delta Np63$ 発現ベクターの作製ならびに $\Delta Np63$ 過剰発現細胞株の樹立

次に、 $\Delta Np63$ 過剰発現細胞株を樹立するために、 $\Delta Np63$ 発現ベクターの作製を行った。まず、HSC-2 細胞の cDNA より、表 2 に示すプライマーを用いて $\Delta Np63$ のコーディングシーケンス領域を増幅し、その増幅産物を pEF6/V5-His-TOPO[®] ベクター (Invitrogen, USA) に接合させた。次に、ベクターを導入した大腸菌形質転換受容性細胞 (One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* kit, Invitrogen, USA) を Luria-Bertani (LB) 寒天培地に塗布し、37°C で一晚培養した。培地上で形成されたコロニーより任意に 8 つのコロニーを選択し、ベクターに予め組み込まれたプライミングサイトを利用して PCR を行い、その増幅産物を電気泳動し、ベクターが挿入されていることを確認した。目的の PCR 産物を認めたコロニーを LB 培地にて培養し、QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Germany) を用いてプラスミドベクターの精製を行った。得られたベクターは吸光度計 (NANO DROP 1000; Thermo Scientific, USA) にて DNA 量を測定し、ダイターミネーター法にてシーケンス解析を行い、 $\Delta Np63$ コーディングシーケンスの塩基配列と一致していることを確認した。得られたベクター 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をリポフェクション法により、 $\Delta Np63$ の発現を認めなかった SQUU-B 細胞へ導入した。陰性対照として empty ベクターを同様の方法にて SQUU-B 細胞へ導入した。次に、 $\Delta Np63$ 過剰発現細胞株の樹立を行った。ベクターが導入された細胞は形質転換体の選択試薬である Blasticidin[™] (Invitrogen, USA) に耐性を持つため、ベクター導入細胞をトリプシン処理にて細胞懸濁液にし、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Blasticidin[™] を加えて培養した。限界希釈法によるクローニングを 3 回繰り返した後に、single cell から増殖した細胞を $\Delta Np63$ 過剰発現細胞株 (SQUU-BO) とし、mRNA 抽出およびタンパク質抽出を行った。陰性対照として empty ベクターを導入した細胞も同様にクローニングを行い、陰性対照株 (SQUU-BC) の樹立を行った。

表4 $\Delta Np63$ コーディングシーケンス増幅用プライマーと反応条件

mRNA	PCR産物の サイズ (bp)	プライマーの塩基配列		アニーリング 温度 (°C)
$\Delta Np63$	1,761	forward	5'-AACATGTTGTACCTGGAAAACAATGCCC-3'	56
		reverse	5'-CTCCCCCTCCTCTTTGATGC-3'	

11. 細胞増殖解析

$\Delta Np63$ が OSCC 細胞の増殖に与える影響を検討するため、以下の方法により細胞増殖解析を行った。

11-1. water soluble tetrazolium (WST) -1 assay

96 穴プレートに 2.0×10^3 /穴の HSC-2 細胞、SQUU-BC 細胞および SQUU-BO 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 存在下で 12 時間培養後、HSC-2 細胞には $\Delta Np63$ siRNA と scrambled siRNA の導入を行った。HSC-2 細胞は siRNA 導入時および導入 12、24、48、72、96 時間後、SQUU-BC 細胞と SQUU-BO 細胞は播種後 12 時間を 0 時間とし、0、12、24、48、72、96、120、144、168 時間後の生細胞数を WST-1 Cell Counting Kit (Dojin, Japan) を用いて計測した。各穴に水溶性テトラゾリウム塩 (WST-1; 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) を 10 μ l ずつ添加し、37°C、5%CO₂ 存在下で 2 時間、呈色反応を行った。その後、WST-1 が細胞内脱水素酵素により還元されて生じた水溶性ホルマザン色素をマイクロプレートリーダー (MULTI SKAN FC; Thermo Scientific, USA) にて測定した (測定波長: 450 nm、参照波長: 620 nm)。なお、今回行った WST-1 Cell Counting Kit による計測では、細胞数と生成する水溶性ホルマザンの量が直線的な比例関係にあることを確認した。

11-2. 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay

24 穴プレートに 2.5×10^4 /穴の HSC-2 細胞、SQUU-BC 細胞および SQUU-BO 細胞を播種し、HSC-2 細胞には上記と同様に siRNA の導入を行った。HSC-2 細胞は siRNA 導入 48 時間後に、SQUU-BC 細胞と SQUU-BO 細胞は播種後 72 時間経過した後に 10 mM の BrdU 標識試薬 (BrdU labeling & detection kit 1; Roche Diagnostics, Swiss) を 400 μ l 添加し、37°C、5%CO₂ 存在下に 45 分間静置した。その後、75%メタノールにて 20 分間固定を行い、PBS で 2 回洗浄した。一次抗体としてマウス抗 BrdU モノクローナル抗体 (clone BMG 6H8, Roche Diagnostics, Swiss, 希釈倍率 1:10) を室温で 30 分間、さらに、フルオレセイン標識抗マウス Ig 抗体 (Roche Diagnostics, Swiss, 希釈倍率 1:10) を室温で 30 分間反応させ、PBS にて 3 回洗浄後、ヨウ化プロピジウム (propidium iodide: PI) 含有水性封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium with PI, Vector Laboratories, USA) にて核染色および封入を行った。その後、蛍光顕微鏡 (対物レンズ $\times 20$) にて観察を行った。また、試料上の 0.4 mm² の範囲を無作為に 5 か所選択して、BrdU 陽性細胞数を計測し、それらを PI 陽性細胞数で除したものを BrdU 陽性細胞率として算出した。

12. annexin V によるアポトーシス解析

アポトーシスが誘導された細胞を annexin V にて検出することにより、 Δ Np63 が OSCC 細胞のアポトーシスに与える影響について検討した。24 穴プレートに 2.5×10^4 /穴の HSC-2 細胞、SQUU-BC 細胞、および SQUU-BO 細胞を播種し、HSC-2 細胞には上記と同様に siRNA の導入を行った。HSC-2 細胞は siRNA 導入 48 時間後に、SQUU-BC 細胞と SQUU-BO 細胞は播種後 72 時間経過した後に PBS で 2 回洗浄し、binding buffer (0.1 M HEPES, 1.4 M NaCl, 25mM CaCl₂) にて 10 倍希釈したフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate: FITC) 標識 annexin V (MBL,

Japan) を 15 分間反応させた。その後、Hoechst 33342 および PI にて核染色を行い、蛍光顕微鏡（対物レンズ $\times 20$ ）にて観察を行った。また、試料上の 0.4 mm^2 の範囲を無作為に 5 か所選択して、annexin V 陽性細胞数を計測し、それらを Hoechst33342 陽性細胞数で除したものを annexin V 陽性細胞率として算出した。さらに、抗アポトーシス遺伝子である *B-cell lymphoma-2* (*Bcl-2*) の発現量を real-time PCR を用いて検索した。mRNA の発現量を定量化するため *GAPDH* を用いて補正し、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により相対的発現量を算出した。使用したプライマーおよび反応条件を表 2 に示す。

13. wound healing assay

ΔNp63 が OSCC 細胞の遊走能に与える影響を検討するため、wound healing assay を行った。まず、24 穴プレートに 2.5×10^4 /穴の HSC-2 細胞、SQUU-BC 細胞および SQUU-BO 細胞を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下にコンフルエントになるまで培養した。HSC-2 細胞には前述の方法と同様に siRNA を導入し、導入 24 時間後に $200 \mu\text{l}$ 用滅菌ピペットチップ (greiner bio-one, Germany) の先端を用いて間隙を設けた。SQUU-BC 細胞および SQUU-BO 細胞は、コンフルエントの状態と同様に間隙形成を行った。また、細胞増殖による影響を回避するため、 $10 \mu\text{g/ml}$ の mitomycin C を間隙形成後より 2 時間作用させた。その後培地を交換し、間隙形成 24 時間後の遊走状態を倒立顕微鏡 (CKX41 NB-31PHP; Olympus, Japan, 対物レンズ $\times 4$) にて観察した。

14. 免疫組織化学的染色

OSCC 患者より採取した生検材料は、直ちに 4% パラホルムアルデヒドに $24 \sim 48$ 時間浸漬固定し、パラフィン包埋を行った。ミクロトーム (Leica Microsystems, Japan) にて $5 \mu\text{m}$ の切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (hematoxylin and eosin: HE) 染色および免疫組織化学的染色に用いた。本研究では、 ΔNp63 、E-cadherin および

vimentin を使用し、免疫二重染色を行った。作製したパラフィン切片をキシレンに 20 分間、さらに、100%、95%、85%、75%エタノールに各 5 分間浸漬させ、脱パラフィン処理および水和処理を行い、Tris-EDTA buffer (10 mM Tris、1 mM エチレンジアミン四酢酸〈ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA〉、0.05%Tween 20、pH 9.0) を用いて、抗原の賦活化処理 (121°C、5 分間) を行った。切片をトリス緩衝食塩水 (Tris-buffered saline: TBS; 10mM Tris-HCl、150mM NaCl) にて洗浄し、内因性ペルオキシダーゼ除去のために 1.0%過酸化水素水を室温で 30 分間反応させた後、抗体の非特異的吸着を防ぐために 5%スキムミルクを室温で 30 分間反応させた。

ΔNp63 と vimentin の免疫二重染色では、マウス抗 ΔNp63 モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:100) を室温で 3 時間反応させた後、二次抗体に HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体およびアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase: ALP) 標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体を含む MACH 2 Double Stain 1 (BIOCARE MEDICAL, USA) を用い、室温で 1 時間反応させた。TBS にて 20 分間洗浄後、3,3'-ジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine: DAB, BIOCARE MEDICAL, USA) にて可視化し、Dissociation Kit (BIOCARE MEDICAL, USA) を 5 分間反応させ呈色反応を停止させた。TBS にて 20 分間洗浄後、マウス抗 vimentin モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:100) を室温にて 3 時間反応させ、二次抗体に HRP 標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体および ALP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を含む、MACH 2 Double Stain 2 (BIOCARE MEDICAL, USA) を用い、室温で 1 時間反応させた。TBS にて 20 分間洗浄後、PermaBlue/ALP (Biotrend, USA) にて可視化し、さらに、ヘマトキシリン (Mayer's Hematoxylin Solution; Wako, Japan) を用いて対比染色を行った。また、E-cadherin と vimentin の免疫二重染色では一次抗体であるウサギ抗 E-cadherin モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:500) とマウス抗 vimentin モノクローナル抗体 (希釈倍率 1:100) を混和し、二次抗体として MACH 2 Double Stain 2 を用い、同様に行

った。その後、切片を 75%、85%、95%、100%エタノールに各 5 分間浸漬させ、脱水処理を行い、Malinol mounting medium (Muto Pure Chemicals, Japan) を用いて封入した。陰性対照として、一次抗体の代わりに TBS を用いた。観察には光学生物顕微鏡 (BX50; Olympus, Japan, 対物レンズ $\times 10$) を用いた。

また、切片の浸潤先端部より 0.6 mm^2 の範囲を無作為に 3 か所選択して、vimentin 陽性癌細胞数を計測し、それらを同範囲に含まれる全癌細胞数で除したものを vimentin 陽性細胞率として算出した。なお、vimentin 陽性細胞率は receiver operating characteristic curve (ROC) を用いた解析により、最も感度と特異度の高かった陽性細胞率 5% をカットオフ値とし、5% 以上を陽性群、5% 未満を陰性群とした (59)。

また、腫瘍中心部と比較して浸潤先端部における ΔNp63 の発現強度の減弱の有無を観察し、臨床および病理組織学的所見との関連について解析した。さらに、浸潤先端部における vimentin の発現ならびに ΔNp63 の発現強度の減弱の有無と予後との関連について検討するため、Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し、疾患特異的累積 5 年生存率を算出した。

15. 統計学的解析

統計処理には χ^2 test、Fisher's exact test、Mann-Whitney *U*-test、analysis of variance (ANOVA)、Student's *t*-test を用いた。また、生存分析は Kaplan-Meier 法により解析を行い、統計処理には log-rank test を用いた。なお、統計解析ソフトとして JMP software version 8 (SAS Institute, USA) を使用し、 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

研究 1

OSCC 細胞株における Δ Np63 の発現および機能に関する研究

1-1. OSCC 細胞株における Δ Np63 および EMT 関連分子の発現

OSCC 細胞株 (HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS) および HEK293 細胞を用いて、 Δ Np63、TAp63、E-cadherin、CK5、CK14、vimentin および N-cadherin の発現を RT-PCR と Western blotting にて検索した。その結果、 Δ Np63 の発現は SQUU-B 細胞を除くすべての OSCC 細胞で発現を認めた。 Δ Np63 の発現量が高い HSC-2 細胞および SAS 細胞では CK5 と CK14 が強く発現しており、発現量が低い HSC-3 細胞および SQUU-A 細胞では CK5 と CK14 の発現は低いかほとんど認められなかった。 Δ Np63 が発現していない SQUU-B 細胞では、CK5 と CK14 の発現を認めなかった。また、SQUU-B 細胞では vimentin の発現を認め、N-cadherin の発現が亢進していた。TAp63 は全ての細胞株において発現が認められなかった。E-cadherin はすべての OSCC 細胞株で発現していた (図 1)。

次に、免疫細胞化学的染色法により、 Δ Np63、E-cadherin および vimentin の発現を検索した。 Δ Np63 は SQUU-B 細胞を除く OSCC 細胞の細胞核に発現しており、vimentin は SQUU-B 細胞の細胞質にのみ発現を認めた。E-cadherin は全ての OSCC 細胞の細胞膜および細胞質に発現していた (図 2)。また SQUU-B 細胞では、vimentin を高発現している細胞の一部で E-cadherin の発現減弱が認められた (図 2 矢印)。

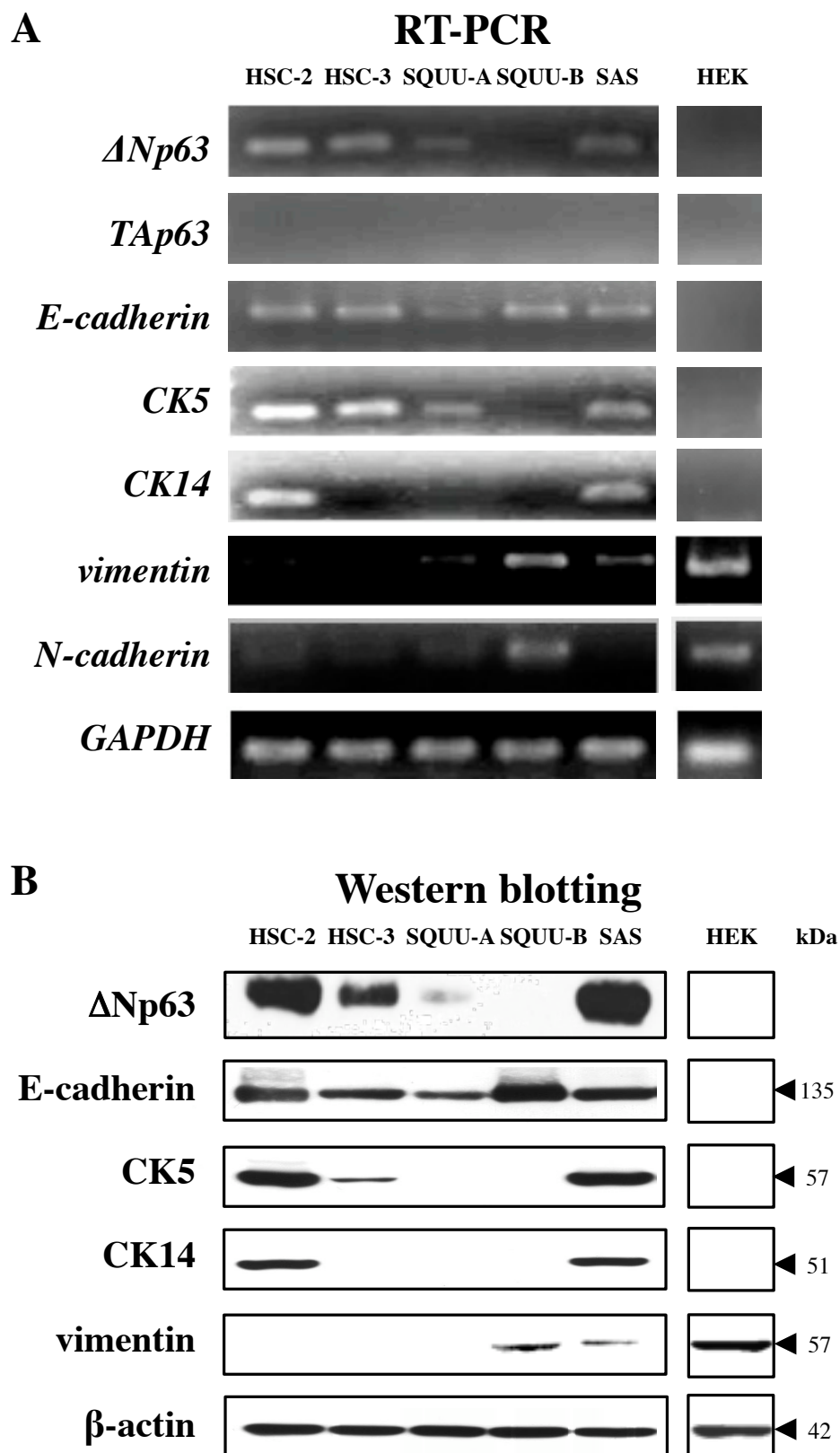


図1 OSCC細胞におけるEMT関連分子の発現 (A; RT-PCR, B; Western blotting)
 ΔNp63はSQUU-B細胞以外のOSCC細胞において発現を認めた。また、
 SQUU-B細胞ではvimentinの発現を認めた。

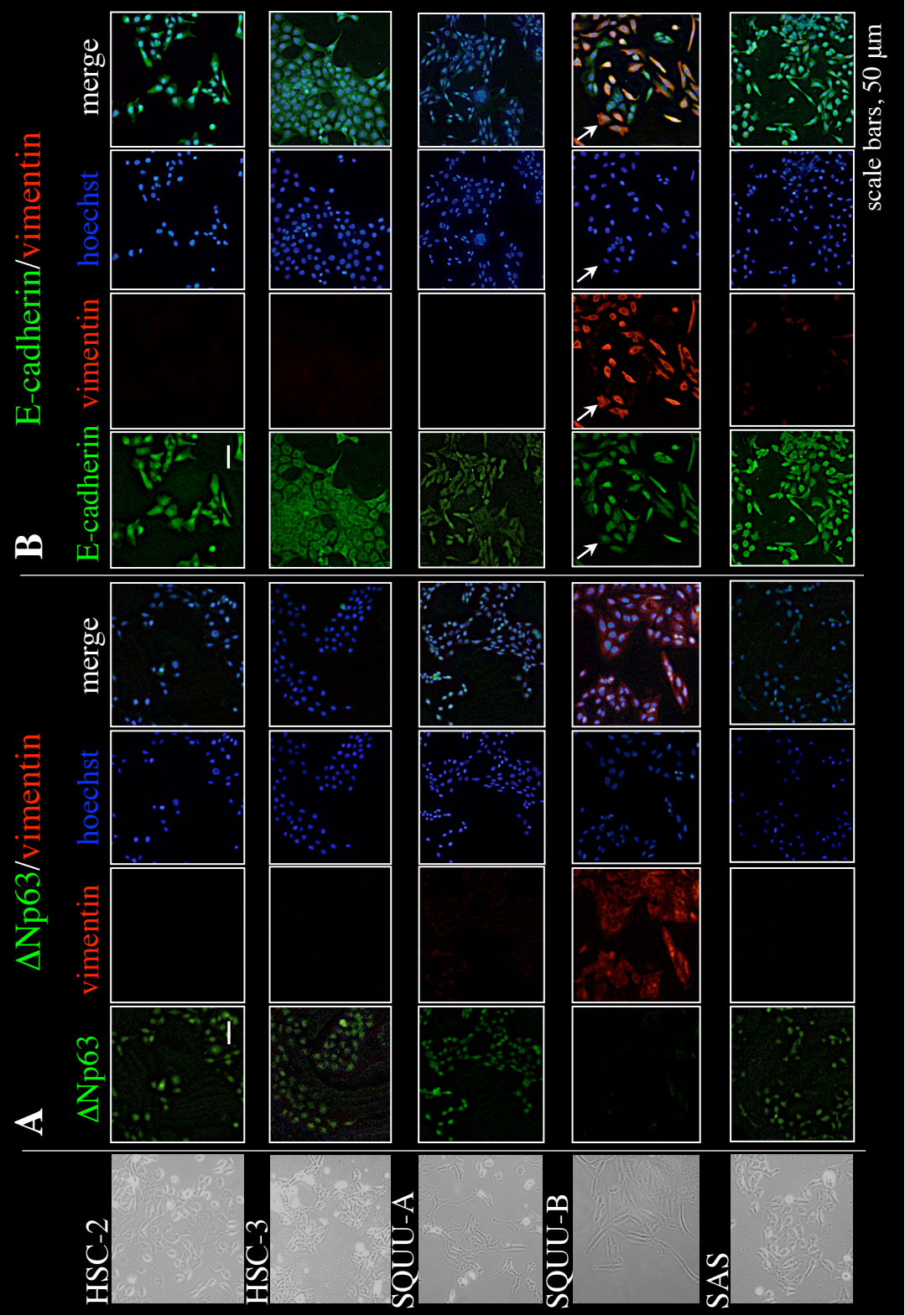


図2 免疫細胞化学的二重染色 (A; Δ Np63 と vimentin, B; E-cadherin と vimentin)
 Δ Np63はほとんどのOSCC細胞で発現を認めたが、SQUU-B細胞では発現を認めず、vimentinの発現を認めた。E-cadherinはすべてのOSCC細胞に発現を認めた。また、SQUU-B細胞では、vimentinを高発現している一部の細胞で、E-cadherinの発現が減弱していた (矢印)。Aの緑色は Δ Np63、赤色はvimentin、青色はhoechstを示し、Bの緑色はE-cadherin、赤色はvimentin、青色はhoechstを示している。