

口腔癌原発巣と頸部リンパ節転移巣から樹立した細胞株における生物学的特性と網羅的遺伝子解析

藤永, 貴大

<http://hdl.handle.net/2324/1441158>

出版情報 : Kyushu University, 2013, 博士 (歯学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)



区分	① 乙
----	-----

論文題目 口腔癌原発巣と頸部リンパ節転移巣より樹立した
細胞株における生物学的特性と網羅的遺伝子解析

氏名 藤永貴大

論文内容の要旨

口腔癌に限らず、あらゆる癌の予後向上には、原発巣の制御に加えて転移巣の制御が重要である。これまで転移に関する研究報告は、切除物の原発巣と転移巣を組織学的に検討したものが多かったが、同一患者の原発巣と転移巣から細胞株を樹立することが困難であったために細胞株を使って検討したものは少なかった。口腔領域において、同一患者より樹立された細胞株には、舌癌と頸部リンパ節転移巣から Easty らの樹立した HN-6、HN-6n1、HN-6n2 や、信森らの樹立した KK-p、KK-m などがある。それらの報告では、原発巣と転移巣では生物学的特性が異なっていると考えられているが、網羅的な遺伝子解析を行った報告は少ないためさらなる検討が必要である。本研究では、下顎歯肉扁平上皮癌患者の原発巣由来細胞株 (WK2) と後発頸部リンパ節転移巣由来細胞株 (WK3F) の樹立に成功した。その 2 つの癌細胞株について、網羅的な遺伝子解析を行い、転移関連遺伝子について生物学的特性を踏まえて検討した。この手法は、生体内をより反映した解析法で、転移機構の解明や治療の標的遺伝子の発見に役立つものと考えられた。

in vitro において生物学的特性を比較すると、WK3F は WK2 と比べ MTT assay で細胞増殖能が高く、細胞倍加時間も短縮された。Wound healing assay で細胞遊走能は向上し、原発巣離脱モデルにおいても浸潤能も高かった。血管内皮細胞 (HUVECs) への細胞接着能は、WK3F は WK2 よりも高かった。Sphere forming assay による自己複製能においても、スフェア形成数が多く、直径も大きかった。ヌードマウス異種移植による造腫瘍能・転移能の検討をしたところ、緑色蛍光タンパク質を導入した WK2-GFP と比較して、赤色蛍光タンパク質を導入した WK3F-RFP では腫瘍形成率と頸部リンパ節転移率が上昇した。これにより *in vivo* においても WK3F の方が WK2 より造腫瘍能および転移能に優れた細胞株であることが証明された。

WK2 と WK3F の発現遺伝子の変化をマイクロアレイ法で 50599 種の遺伝子プローブを用いて網羅的に解析した。発現が増幅したものを $Z\text{-score} \geq 2.0$ and $\text{ratio} \geq 5.0$ 、発現が減少したものを $Z\text{-score} \leq -2.0$ and $\text{ratio} \leq 0.2$ として抽出し、そこから癌や転移に関連する遺伝子候補を上位、下位より 15 位ずつ選別した。WK2 に比べて WK3F に発現が亢進した転移関連遺伝子候補は、転移性悪性黒色腫で高発現している MAGEC1 (melanoma antigen family C,

1)、大腸癌の浸潤転移に関連する MMP-7 (matrix metalloproteinase-7)、E-cadherin の転写抑制に関連する SNAI1 (snail homolog 1)、大腸癌の転移関連遺伝子である MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1) であった。発現が低下した遺伝子は、子宮内膜癌の転移能と予後に関わっていると推測されている HTRA1 (HtrA serine peptidase 1) であった。

癌細胞は、上皮間葉移行 (EMT : epithelial-mesenchymal transition) を起こし、より遊走性の高い間葉系細胞の表現型を獲得して転移を起こすといわれている。培養像では、WK3Fの一部に線維芽細胞様の形態をもった癌細胞を認め、前述のごとく遊走性が高かった。マイクロアレイの結果では、SNAI1 以外の EMT 関連マーカーに大きな差異は認めなかったが、転移関連遺伝子、細胞増殖調節因子、接着分子、細胞外基質分解酵素に差異を認めた。これらの分子は転移巣の癌細胞の特性 (転移機構) を解明する上で重要であり、治療の標的因子となりうることが示唆された。