

前癌病変である口腔白板症が悪性転化するメカニズムの解明 — 口腔扁平上皮癌新規治療法の開発を目指して —

東京歯科大学 生化学講座

東 俊文

はじめに

ES細胞、iPS細胞の未分化→分化のゲートコントロールに重要な働きを担うNodal-Leftyに注目した。NodalはTGF- β ファミリー分子で、ES細胞、iPS細胞で高発現し、特にES細胞やiPS細胞の未分化期に高発現している。一方、LeftyはNodalに拮抗する分子で、これもES細胞、iPS細胞の未分化期に高発現する。既報によるとNodalは未分化iPS細胞で特に高発現しており、これを制御するLeftyも発現しているがiPS細胞ではES細胞より若干発現が低いことがわかっている。両者は拮抗し未分化性を維持しているが、分化に向かうとき、Lefty発現が上回りES細胞やiPS細胞は万能性を捨て、分化過程に入る。しかし、ヒトES細胞に比べ、iPS細胞ではLefty発現が著しく低いことがわかり、分化への影響から、その発癌への影響も予想され、その機序の解明が重要な課題の一つである。

我々は口腔癌細胞、および、そのリプログラミング細胞を用いて、Lefty遺伝子の発現機序について詳細に検討し、前癌病変白板症のiPS細胞樹立を開始した。

方 法

ヒト細胞のリプログラミング

口腔癌組織のパラフィン切片を用いNodalおよびLeftyの発現を免疫組織学的に検討する。

倫理委員会にて適切に申請した症例から得られた口腔癌組織から、パラフィン切片作成しR&D社製 抗Nodal抗体、Abcam社製 抗Lefty抗体、を用いて発現を検討した。

口腔癌株化細胞におけるNodal-Lefty系の検討

NodalとLefty発現

口腔上皮扁平上皮癌 (Ho1N1, Ho1u1) 口腔癌 (CJM, HSC-2, T3M-1C1-10, T3m-1) 舌癌 (HSC-4, SAS) 舌扁平上皮癌 (HSC-3) を適切に培養し、NodalとLefty発現をReal-TimePCR法により検討した。

すでにprimer setについては有効性を確認している。我々の直近の報告 (Miyata, Net.al. Pancreas, in press) と同じ設定を用いた。

TGF- β 処理による Nodal と LeftyA, B 遺伝子発現の変化

TGF- β 10ng/ml で 24 時間処理し、Nodal-Lefty 発現の変化を上記細胞すべてで検討した。

TGF- β シグナルを調節する、Erk inhibitor (PD98059)、JNK inhibitor (SP60012) p38 inhibitor (SB203585) を用い、Nodal-Lefty 発現の変化を検討する。PI3K-inhibitor (LY293002) Akt - mTOR inhibitor (rapamycin)、wnt - β catenin 経路阻害剤 (PNU-74654)、DSK-3 β inhibitor (BIO) を用いて各々 TGF- β 10ng/ml 処理との相乗あるいは阻害効果を検討した。(Stem Cells. 2006;24(9):1998-2006によれば BIO 投与により ES 細胞では Lefty 発現が上昇する。)

LeftyA 遺伝子発現誘導時における口腔癌細胞の形態、増殖、運動能、腫瘍原性の検討

1) 上記検討で LeftyA, B 遺伝子発現を誘導した条件において、口腔癌細胞の形態変化を位相差顕微鏡下で観察する。増殖能は増殖曲線を作成して比較する。運動能は Wound healing assay により検討する。方法の詳細は (Witke W, Azuma T, et.al Cell. 81(1):41-51, 1995. Azuma T, Kothakota S, et.al Science. 278(5336):294-8, 1997 Azuma T, et.al EMBO J. 17(5):1362-70, 1998) にて詳細した方法を用いる。運動能に関係する重要な因子として small GTPase の活性を Active GTPase Pull Down 法により検討する。方法の詳細は (Azuma T, et.al EMBO J. 17(5), 1998. Phillips MJ, Azuma T, Lancet. 362(9390):1112-9, 2003;) に従う。SoftGel Agar 法により腫瘍原性を検討した。

2) Lefty A 遺伝子強制発現、ノックダウンによる癌細胞の変化。

すでに CMV promoter および EF1 α promoter を持つ発現ベクターに Lefty A cDNA を入れた Lefty 発現ベクターは作製済みである。これを癌細胞に対して用い lefty 強制発現により、細胞の形態、増殖、運動能、腫瘍原性を上記と同様に検討する。LeftyA, B ともに 効果的に発現を下げる siRNA を検討し確立したうえで、Lefty 遺伝子発現が上昇する条件化でこれをノックダウンし細胞の形態、増殖、運動能、腫瘍原性について上記と同様に検討した。

ヒト iPS 細胞 (201B7 細胞株) を使用する。誘導を開始する前に、pLSIN-EOS-C(3+)-EiP (Addgene より購入済み) を用いて産生させたレンチウイルスの感染により未分化細胞のみが EGFP を発現するようにする。その後、通法に従いフィーダー細胞上に iPS 細胞を培養したのち、低接着性プレートに播種し 6 日間培養することで Embryonic Body (EB、胚様体) を形成する。Thiazovivin (ROCK 阻害剤) 含有培地にて 1 時間前培養後、コラーゲナーゼ、およびトリプシン EDTA 処理により細胞へのダメージ無く EB を単一細胞にし、コラーゲンコートプレートに播種する。コンフルエントに達したのち OBM 培養による骨芽細胞分化を開始する。予備実験より抗 ALP 抗体を用いて FACS にて ALP 陽性細胞を分離可能であることが示されたので、OBM 培養から 7、14、21 日目で ALP 陽性および EGFP 陰性細胞を FACS にて分離・回収する。回収した細胞は FGF-2 を含む増殖培地にて培養し十分量に達したのち免疫不全動物に移植する。

レンチウイルスの感染がうまくいかないときは、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-80、Nanog といった未分化マーカーに対する抗体で免疫蛍光染色することによって腫瘍形成の可能性のある未分化細胞を排除した。

3) FACS 分離・回収

抗体はPE-conjugated anti-human ALP抗体 (R&D 社)、およびネガティブコントロールとしてPE-conjugated isotype control抗体 (R&D 社) を使用する。【方法】細胞をコラゲナーゼおよびトリプシンEDTA処理により単一細胞にし回収する。0.5% BSA/PBSで3回洗った後、 4×10^6 cells/mLで懸濁する。懸濁液25 μ Lに対し抗体 10 μ Lを加え氷上・遮光で45分間インキュベートする。0.5% BSA/PBSで3回洗ったあと、FACSにて分離・回収する。FACS操作の際には終始Thiazovivinをバッファー中に添加して操作することにより、細胞死を防ぐ。

結 果

図に示すとおり、リプログラムした癌細胞は高増殖、高腫瘍形成能を示す。(図1)

さらに TGF- β 刺激により、Lefty発現を増加させる。(図2)

そのとき lefty 遺伝子のCpGアイランドのメチレーションが著しく低下していた。(図3)

ヒト iPS 細胞でも Lefty メチレーションは低下していた。

ヒト iPS 細胞から骨組織への分化誘導において、未分化細胞の除去、骨芽細胞マーカータンパクによるFACSソーティングにより、骨芽細胞に分化を運命づけられている細胞を集積した。(図4, 5)

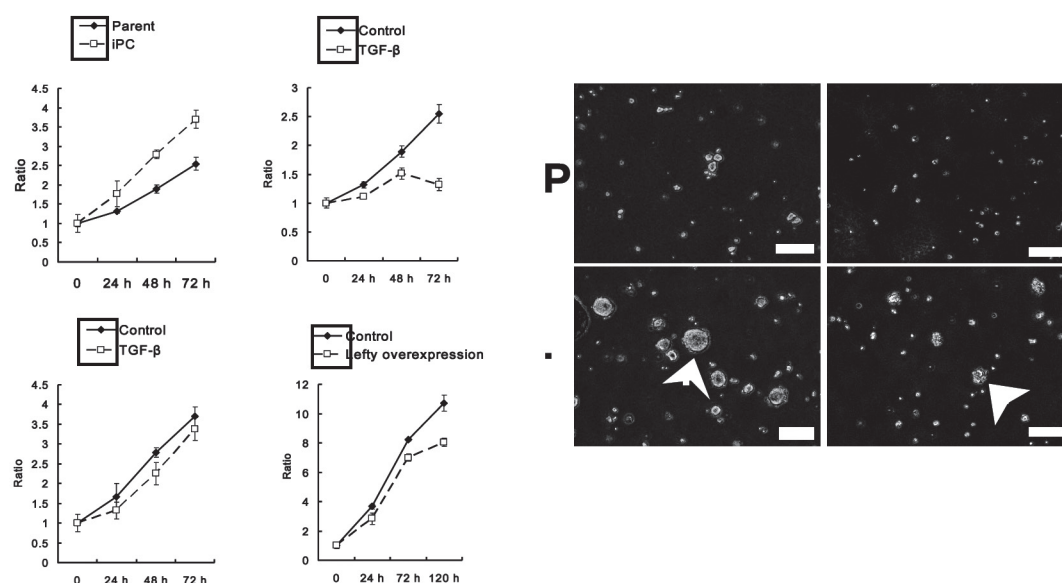


図 1

要 約

Lefty 遺伝子の発現は遺伝子内 CpG island メチレーション、MiR302、ヒストンアセチレーションが重要な調節機構であることを明らかにし、Lefty 遺伝子発現はエピジェネティック因子により厳重にコントロールされていることを示した。(Faseb J in press)

さらに Hendrix 等は Nodal を高発現している癌細胞を報告し (Nat Med. 2006 12(8):925-32) これに ES 細胞由来の Lefty を作用させると悪性形質が弱まるとの報告から、癌抑制遺伝子としても注目される (Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 18;105(11):4329-34.)。我々も癌細胞での発現誘導により癌増殖抑制を確認し報告している (Pancreas. 41(5):745-752, 2012.)。さらにリコンビナント Lefty は応用されている (理化研*高橋等、ヒト網膜細胞分化誘導プロトコル) が、我々の検討ではリコンビナント Lefty の Nodal 抑制作用は ES 細胞から分泌される Lefty に比べ著しく低い。(上述のように Nodal 高発現メラノーマ細胞を用いた上述した既報でも報告されている。) 我々は his タグをつけた Lefty 分子を酵母に強制発現させて精製した。このリコンビナント Lefty は容易に純化でき、腫瘍増殖抑制作用を持つことを確認した。

我々は 東京歯科大学における白板症患者の病組織から iPS 細胞を樹立する前段階として、上記 Lefty を利用した、iPS 細胞の樹立と、骨組織への分化誘導を行い同時に癌化のリスクの頻度を比較し Lefty を適切に作用させることで 癌化リスクを下げ分化誘導も促進されることが示された。

文 献

1. Fujishiro Y, Tonogi M, Ochiai H, Matsuzaka K, Yamane GY, Azuma T. The receptor tyrosine kinase inhibitor vandetanib activates Akt and increases side population in a salivary gland tumor cell line (A253). Int J Oncol. 41(1):362-8. 2012
2. Ochiai H, Okada S, Saito A, Hoshi K, Yamashita H, Takato T, Azuma T. Inhibition of IGF-1 expression by prolonged TGF- β 1 administration suppresses osteoblast differentiation. J Biol Chem. 287(27), 22654-22661, 2012.,
3. Miyata N, Azuma T, Hozawa S, Higuchi H, Yokoyama A, Kabashima A, Igarashi T, Saeki K, Hibi T. Transforming Growth Factor β and Ras/MEK/ERK Signaling Regulate the Expression Level of a Novel Tumor Suppressor Lefty. Pancreas. 41(5):745-752.2012.
4. Differential signaling by TGF- β 1 and BMP-2/-7 during induction of osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells – Involvement of a PI3K/mTOR/p70S6K mechanism. Natsuko Aida, OchiaiH, Tezen C, Yoshizawa Y, Matsuzaka K, Morinaga K, Azuma T. J.Hard Tissue Biology, 2012. in Press,
5. Multiple factors regulate Lefty expression induced by transforming growth factor. Saito A, Ochiai H, Okada S, Hoshi K, Yamashita H, Takato T, Azuma T Faseb J 2012 in press
6. Requirement for JNK and ERK activation in BMP-2/BMP-7 -induced osteogenesis of human periodontal ligament cells. Tezen C, Ochiai O, Aida N, Okada S, Saito A, AzumaT J.Hard Tissue Biology, 2012. in Press,