

学位論文審査の要旨

咀嚼筋の発達、離乳の前後において著明になることが知られている。ラットの咬筋では、筋線維は生後約10日齢から酸化酵素活性の異なる3つのタイプに分化し、急激に肥大することが知られている。近年、血管内皮細胞に特異性の高い増殖因子あるいは透過性因子として働くVEGF (vascular endothelial growth factor) とその受容体 (fms-like tyrosine kinase: Flt-1, kinase insert-domain-containing receptor: KDR) の存在が明らかにされ、血管系細胞が臓器固有の実質系細胞の分化および発達に密接に関係することが示唆されている。したがって、血管網の構築過程とその調節機構を明らかにすることは、臓器における発達のメカニズムを解明するために重要であると考えられる。

本研究は、咬筋の分化および発達に深く関与すると考えられる血管系の構築過程とその調節機構を明らかにすることを目的とし、離乳期におけるラット咬筋の血管網をATPase染色法を用いて組織化学的に観察するとともに、

VEGF、VEGF受容体(Flt-1, KDR)ならびにVEGFの転写因子として知られるHIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) の発現を主としてRT-PCR法を用いて分子生物学的に解析した。

その結果、咬筋の血管網は、出生直後から離乳期にかけて急速に発達することが明らかになった。この血管新生は、主としてVEGFとその受容体系を介しており、出生直後においてはVEGF120、VEGF164とKDR受容体による急速な血管内皮細胞の増殖が中心であり、離乳期においてはVEGF188、VEGF164とFlt-1受容体による血管網の形態形成が中心であると考えられる。また、血管網の形成過程においては、授乳あるいは咀嚼などの機能的運動負荷にともなう局所的な低酸素状態が関与していることが示唆された。

以上より、本論文は咀嚼筋の発達機構の解明に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	木下隆二(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙第54号
学位授与の日付	平成13年9月14日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) は口腔扁平上皮癌細胞の浸潤突起形成を制御している
論文審査委員	主査 教授 金澤正昭 副査 教授 矢嶋俊彦 副査 教授 田隈泰信

論文内容の要旨

[目的]

臨床的にStage I, IIの口腔扁平上皮癌の治療成績を見ると、近年の癌治療の進歩によりその生存率は向上している。しかし、比較的早期の癌で、治療後に原発巣が十分に制御されているにも関わらず、予期せぬ後発頸部転移などによって治療に難渋する症例がみられる。このた

め浸潤転移の有無は予後を決定する重要な因子となることから、浸潤転移の制御機構の解析が急務とされる。この浸潤転移の初期段階では、癌細胞の基底膜基質への接着と運動性を制御する因子の一つとして、脂質キナーゼであるPhosphatidylinositol3-kinase (PI3-K) が知られている。

そこで、著者は基底膜基質への初期浸潤過程を観察す

ることが可能なフィブロネクチンを用いたin vitro基質分解/浸潤アッセイにより、高浸潤性ヒト舌扁平嚢癌細胞SAS-H1の初期浸潤過程におけるPI3-Kの役割を検討するため、以下の実験的研究を行った。

[材料および方法]

- 1) 細胞：ヒト舌扁平上皮癌の原発巣より樹立したSAS細胞から限界希釈法により得られたクローンを、肺血管内皮細胞層下への癌細胞の潜り込みを指標としたin vitro浸潤アッセイで選択した高浸潤性癌細胞SAS-H1を用いた。
- 2) 試薬：PI3-Kの特異的阻害剤であるwortmaninn (和光純薬)とLY294002 (Biomol Res. Lab.)を用いた。プロテインAキナーゼ阻害剤にはKT57200 (Calbiochem), プロテインCキナーゼ阻害剤にはCalphostinC (協和メデイクス), ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤としてML7 (Calbiochem), チロシンキナーゼ阻害剤はgenistein (Sigma), チロシンフォスファターゼ阻害剤はorthovanadate (Sigma)を使用した。ゼラチン粉末は、熱変性化牛タイプIコラーゲン (Sigma)を用いた。さらに、Fluoresceini sothiocyanate (FITC)はResearch Organics Inc.のものを使用した。
- 3) invitro基質分解/浸潤アッセイ：15×15・のガラス製カバースリップ上にグルタルアルデヒドを用いてゼラチンを架橋・固定し、そのゼラチンに対してFITCで蛍光標識したヒト血漿フィブロネクチン (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA)を結合させた。35mm径培養皿にこの様に調製したカバースリップを挿入した後、SAS-H1細胞を10⁵個/・播種し、10%牛胎児血清を添加し経時的に試料を得た。
- 4) 共焦点レーザー顕微鏡による観察：経時的に細胞が付着したカバースリップを回収し4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.1% TritonX-100によって細胞透過性亢進処理を施したものに、ローダミン標識ファロイジンによりアクチン線維を染色し、形態的变化を観察した。また、PI3-Kの制御蛋白質であるp85に対する抗p85モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotech.)およびチロシンリン酸化蛋白質に対する4G10抗体 (UBI)を用いた間接蛍光抗体法により、おのおのの蛋白質の局在変化について共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- 5) 細胞からの各分画の調製：15cm径培養皿の底面にゼラチンをコートし、これをグルタルアルデヒドで架橋・固定した。この培養皿にSAS-H1細胞を8×10⁷個播種・接着後、さらに16時間培養し、Muellerらの方法に準じて細胞体画分およびゼラチン基質画分を調製し

た。

- 6) 抗p85ポリクローナル抗体による免疫沈降物の調製：Muellerらの方法に準じて細胞画分および浸潤突起画分を得、これらの画分にPI3-K調節蛋白質p85を認識する抗p85ポリクローナル抗体 (UBI)を反応させて、免疫沈降産物を得た。
- 7) ウェスタンブロッティング：上記の各画分の免疫沈降産物から、7.5% SDS-PAGEにより蛋白質を展開、PVDF膜 (Millipore Co., Bedford, MA, USA)に転写した。この転写膜を用いて、抗p85モノクローナル抗体およびPI3-K解媒蛋白質p110 α を認識する抗C未満p110 α ポリクローナル抗体によるウェスタンブロッティングを行った。
- 8) PI3-K活性の測定：各画分の免疫沈降産物について、Ninomiyaらのin vitroキナーゼアッセイを準用してPI3-K活性を測定した。
- 9) 統計学的処理：各実験は3回実施し、得られたデータを平均値±標準偏差で表示した。統計学的有意差は全てMann-Whitney検定によっていった。

[結果および考察]

- 1) In vitro基質分解/浸潤アッセイによるSAS-H1細胞の初期浸潤過程の観察と浸潤能

SAS-H1細胞は、カバースリップ上にコートされたフィブロネクチン基質に接着後、基質を分解するとともに浸潤突起を形成して基質内に侵入する所見が得られた。このことから、本アッセイによってSAS-H1細胞の初期浸潤過程を観察できることが確認された。
- 2) 基質分解活性と浸潤突起形成を制御するシグナル分子

SAS-H1細胞と各種情報伝達阻害剤で処理し、基質分解活性と浸潤突起の形成を制御するシグナル分子について検討した。その結果、SAS-H1細胞はPI3-K阻害剤により、濃度依存性に基質分解活性と浸潤突起の形成が抑制され、PI3-Kが癌細胞の基質への浸潤能を促進するシグナル分子であることが示唆された。また、チロシンキナーゼおよびチロシン脱リン酸化阻害剤でも、この細胞の基質分解活性と浸潤突起の形成が抑制されたことから、チロシンリン酸化レベルの変化も浸潤能促進シグナルとして関与することが示唆された。
- 3) 浸潤突起におけるPI3-K調節蛋白質p85の凝集とPI3-K活性化

SAS-H1細胞の免疫蛍光染色により、PI3-K調節蛋白質p85とチロシンリン酸化蛋白質が浸潤突起に凝集している所見が得られた。さらに、抗p110 α 抗体によるウェスタンブロッティングで、浸潤突起を含むゼラチン

基質画分にPI3-K触媒蛋白質p110 α が認められ、浸潤突起内でPI3-Kの活性化が生ずることが推測された。SAS-H1細胞から得られた各画分のPI3-K活性を検討した結果、細胞体画分に比べ浸潤突起を含むゼラチン画分で有意に高いphosphatidylinositol 3, 4, 5-tri-phosphate (PIP3)の産生がみられ、浸潤突起に局在するPI3-Kは活性化されていることが示された。

[結 語]

本研究から、PI3-Kは高浸潤性舌扁平上皮癌細胞SAS-H1の初期浸潤過程で、基質分解活性と浸潤突起形成を制御していることから、PI3-K活性化阻害剤が、臨床応用可能な新しい分子標的抗腫瘍薬剤となり得ることが示唆された。

学位論文審査の要旨

口腔癌にあっても、その予後を左右する重要な因子の一つとして、浸潤転移の有無があげられる。この浸潤転移の初期段階として、癌細胞の基底膜との接着、基底膜基質の分解、周囲組織内への遊走浸潤などの過程を経るが、この際の癌細胞の接着と運動性を制御する因子の一つとして、脂質を基質とした細胞内シグナル分子PI3-Kがある。

最近開発されたin vitro基質分解/浸潤アッセイによって、基底膜基質への初期浸潤過程を観察することが可能となった。その知見から、基底膜浸潤の初期において限局的な基質分解とともに浸潤突起の形成が認められ、これらの現象がチロシンリン酸化シグナルをはじめとする様々な分子によって制御されていることが報告されている。

そこで、木下は口腔悪性腫瘍の大部分を占める扁平上皮癌について、ヒト下扁平上皮癌細胞に由来する高浸潤性舌扁平上皮癌細胞(SAS-H1)を用い、基底膜構成成分であり細胞外基質でもあるフィブロネクチンを用いたin vitro基質分解/浸潤アッセイによって、SAS-H1細胞の

初期浸潤過程におけるPI3-Kの役割について検討し、

- ・SAS-H1細胞は、前述のアッセイのカバースリップ上にコートされたフィブロネクチン・ゼラチン基質に接着、基質を分解するとともに浸潤突起を形成して基質内に侵入していた。
 - ・この際、PI3-Kは、SAS-H1細胞の浸潤突起に局在した。
 - ・また、浸潤突起中には、PI3-K調節蛋白質p85とチロシンリン酸化蛋白質、およびPI3-K触媒蛋白質p110 α が凝集していた。
 - ・しかし、PI3-K活性化の阻害剤で処理したSAS-H1細胞は、基質分解と浸潤突起形成を惹起しなかった。
- などの所見を得、PI3-Kは口腔扁平上皮癌細胞の浸潤突起形成を制御していることが示唆された。

本研究が、口腔癌の浸潤・転移に対する新しい治療法の開発の糸口となるであろうことを期待し、今後の歯科医学発展に寄与することが大であると考え、審査の結果、学位授与に値するものと判定した。