

コラーゲンスポンジを用いた三次元培養における ヒト顎下腺由来腺癌細胞株の遺伝子発現

南 順子, 加茂 政晴, 客本 斉子

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座

(主任: 佐藤 詔子 教授)

(受付: 2005年10月26日)

(受理: 2005年11月17日)

Abstract : Expressions of genes and proteins of human salivary gland cells (HSG cells) were investigated on three-dimensional culture comprised in collagen sponge in order to understand the response of simple epithelial cells at the molecular level.

HSG cells were seeded in collagen sponges (COL-S) (three-dimensional culture) with an agitated seeding method, and cultured for various times. As a control, HSG cells were cultured on a polystyrene dish (PS) or a collagen coated dish (COL-C) (monolayer culture).

The morphological features indicate that HSG cells cultured with COL-S presented a globular shape compared with monolayer culture such as with PS or COL-C. We focused on cytokeratins (CK) that are used as the marker proteins for epithelia to characterize the cultured cells. In HSG cells, CK7, CK8, CK17 and CK18 are expressed, but CK13 which is expressed specifically in mucosal epithelia is not expressed. The expression levels of CK genes were investigated by RT-PCR. The results were that the level of CK 8 and CK18 were downregulated. The level of CK13 was upregulated. On the other hand, no alternation of the expression levels of CK 7 and CK17 was observed. Western Blotting was carried out to investigate the expression of protein. The bands of CK 8 and CK18 were detected. The expression level of CK 8 and CK18 protein was reduced as well as the mRNA level. CK13 protein was not detected in this way. The expression level of the Nm23-H1 gene, which is one of tumor suppressor genes and concerned with ERK/MAPK signal transduction, was downregulated.

These results suggest that HSG cells were altered by three-dimensional culture for different expression patterns of CKs which were not contained in the simple epithelium.

Key words : collagen sponge, three-dimensional culture, HSG cells, Nm23-H 1 and cytokeratin

緒 言

再生医学において細胞とその足場としての人工細胞外マトリクスおよび細胞増殖因子が大きな三つの柱であり, これらを組み合わせる組織

工学的手法を用いて様々な組織再生が可能となっている¹⁾。これらの再生メカニズムを理解する上で分子レベルでの相互作用を解明することが重要である。これまでにコラーゲンを基質とした三次元培養に関して骨芽細胞や幹細胞な

Gene expression in human salivary gland cells on three-dimensional culture comprised in collagen sponge

Junko MINAMI, Masaharu KAMO, Seiko KYAKUMOTO

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

どを用いて多くの研究がなされている。一方近年、粘膜、皮膚、腺組織などの上皮細胞の再生に関する研究が進みつつあるが、上皮細胞の三次元培養については解明されていない点が多い。

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG 細胞) は顎下腺導管上皮由来の腺癌細胞株であるが²⁾、分化誘導剤により導管上皮から腺房細胞等へ分化する幹細胞様の特性をもつ³⁾⁴⁾。この HSG 細胞をマトリゲルとともにマウス背部に接種すると腺管様構造を形成するという報告がある⁵⁾。また HSG 細胞は、コラーゲンでコートされたディッシュでの培養において、 $\beta 1$ インテグリンを介して接着することにより、30以上の遺伝子の発現が upregulate されることが判明している⁶⁾。

生体組織再生の足場となる生体材料は、細胞を三次元的に配置することによって細胞の機能を制御し、再生組織に特定な形を与えるとともに、再生のスペースを与える支持体として重要な役割を果たしている。この生体材料には生体親和性、機械的強度、そして新しい組織が形成されるのに比例して分解・吸収されるための生体吸収性などが要求される。コラーゲンスポンジは生体吸収性天然高分子の多孔質性の生体材料であり、細胞の接着がよく、数週間で体内に吸収される¹⁾。また、コラーゲンは各種細胞の基質の役割を果たしているため組織との親和性にも優れている。

サイトケラチン (CK) は上皮細胞の細胞骨格をつくる中間径フィラメントで、21種類のソフトケラチンと毛細胞のハードケラチンがある。ソフトケラチンは不溶性の分子量40kDaから70kDaの線維性タンパク質であり、酸性 (pH 4.9~5.4) のタイプ I ケラチン CK 9~CK20と中性~塩基性 (pH6.1~7.8) のタイプ II ケラチン CK 1~CK 8 に大別される。細胞内では通常タイプ I とタイプ II の 1 分子種がペアをつくり、そのヘテロダイマーが中間径フィラメントを形成する。上皮細胞の種類、分化の方向、程度によって特異的な分子種のペアが存在す

る^{7),8)}。HSG 細胞は細胞学的に単層上皮の形質を示し、CK 7, 8, 17および18をタンパク質レベルで発現していることが、プロテオミクス手法を用いた研究から明らかとなっている⁹⁾。

CK の発現変化と癌の転移能との関連性が研究されている^{10),11)}。また転移能には癌転移抑制遺伝子が関与している¹²⁾。Nm23-H 1 はよく知られた癌転移抑制遺伝子であり、口腔扁平上皮癌においても転移能に関与していることが明らかにされている¹³⁾。また、この遺伝子は ERK/MAPK シグナル伝達系に働き、細胞の増殖および分化に関与する^{12),14)}。そこで、CK の発現変化と細胞内のシグナル系との関係を探るステップとして癌転移抑制遺伝子の発現の解明が重要と考える。

本研究では HSG 細胞をコラーゲンスポンジにて三次元培養し、単層培養下の細胞形態と比較した。さらに三次元培養におけるコラーゲンスポンジと HSG 細胞の相互作用を分子レベルで解明するため、両者の培養条件下で発現する遺伝子の mRNA およびタンパク質の発現について検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

ブタ皮膚由来の I 型を主体としたコラーゲンを原料とし、37°Cで24時間熱架橋した直径15 mm、厚さ 2 mmのコラーゲンスポンジ (COL-S, 日本ハム) を12ウェル培養プレート (Greiner bio-one) 上に置き、そこへヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG 細胞) を500 μ l細胞懸濁液 (5 \times 10⁷ cells/500 μ l) として播種し、Kimらの方法¹⁵⁾に従って37°C、5%CO₂存在下にて、100 rpmで20時間振とう培養した。その後、90mm培養ディッシュ (Nalge Nunc) に移し、L-glutamine300mg/l、Kanamycin100mg/l および5%仔ウシ血清を含むMinimum Essential Medium Eagle (Eagle's MEM) 中で37°C、5%CO₂存在下にて静置培養した。この間毎日培地の交換を行った。播種からそれぞれ1, 3および6日間培養後、スポンジをPBSで

洗浄し, 0.1%コラゲナーゼ(新田ゼラチン)で処理し細胞を回収した。

対照としてポリスチレンディッシュ(PS, Nalge Nunc) および, I型コラーゲンをディッシュに塗布したコラーゲンコートディッシュ(COL-C, 旭テクノグラス)での単層培養を行った。同一の培地, 条件下で静置培養し, 同様に毎日培地を交換した。細胞はトリプシン-EDTA (1%trypsin, 0.05%EDTA) 含有 phosphate-buffer saline (PBS) を用いて回収した。CK13のポジティブコントロールとして用いた A 431細胞はヒト由来の Epidermoid carcinoma であり, glucose 4.5 g/l, および 10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's MEM 中で同一条件下にて PS で静置培養した。

2. 組織学的解析

COL-S 培養した HSG 細胞を, 播種からそれぞれ 1, 3, 6 日間培養後, スポンジを PBS で洗浄し, 10%中性ホルマリン緩衝液で固定した。その後通法に従いパラフィン包埋を行った。厚さ 5 μ m の切片を作製し脱パラフィンを行い, ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) した。

3. 二次元電気泳動法

回収した HSG 細胞を PBS で洗浄して培養液を十分に除去した後, 直接 Lysis buffer⁸⁾ 中で可溶化した。得られた試料を Immobiline DryStrip (pH 3~10, 13cm, アマシャム・バイオサイエンス) ゲルを用いて一次元目の電気泳動を行った。続いて二次元目として 12.5% アクリルアミドゲル (ゲルサイズ 16 \times 16cm) を用いて sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。電気泳動後, タンパク質のスポットをクーマシー ブリリアント ブルー (CBB) 染色により検出した。

4. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

回収した HSG 細胞から, Isogen (ニッポンジーン) を用いて全 RNA を調製した。全 RNA 1 μ g から Super script III (Invitrogen) と ランダム・プライマー (Invitrogen) を用いて 42°C, 60 分間逆転写反応を行い, cDNA を合成した。これを鋳型に 95°C, 30 秒 (解離), 60°C, 60 秒 (プライマーとのアニーリング), 72°C, 90 秒 (伸長) を 1 サイクルとし, これを繰り返して cDNA の増幅を行った。PCR サイクル数および用いたプライマーは以下の通りである。CK 7 : 28 サイクル, センスプライマー ; 5'-AGC TCCCCGGTATTCACCTCGCGCTCAGCC-3' アンチセンスプライマー ; 5'-CCAGCAATCTGGCCTCAAAGATGTCTGGG-3', CK 8 : 24 サイクル, センスプライマー ; 5'-TCCTACAAGGTGTCCACCTCTGGCCCCCGG-3' アンチセンスプライマー ; 5'-TTGTTGATGTA GCTCTCGAACATGTTGTCC-3', CK17 : 24 サイクル, センスプライマー ; 5'-CAATGTG GAGATGGACGCTGCCCCAGGCG-3' アンチセンスプライマー ; 5'-GGTTCTGCTGCTC CATCTCGCAGCGAAG-3', CK18 : 22 サイクル, センスプライマー ; 5'-GACCGTGGAGG TAGATGCCCCCAAATCTC-3' アンチセンスプライマー ; 5'-TGGGCCTGGCGCTGTCCCTCTGCCCCGGG-3', CK13 : 30 サイクル, センスプライマー ; 5'-CTCACCATGAGCCTCCGCCTGCAGAGCTCC-3' アンチセンスプライマー ; 5'-AGCCCCCTCCACCAAAACCA CAGCTCACGCC-3', Nm23-H1 : 30 サイクル, センスプライマー ; 5'-AACTGTGAGCGTACCT-3' アンチセンスプライマー ; 5'-CTACCAGTTCCTCAGGGTGA-3', Nm23-H2 : 30 サイクル, センスプライマー ; 5'-GAGATCATCAAGCGCTTCGA-3' アンチセンスプライマー ; 5'-CCCAGTCATGAGCA CAAGAC-3'。増幅産物は 0.005% エチジウムブロマイド存在下で 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い紫外線照射により検出した。各遺伝子の mRNA 量は NIH Image を用いた画像解析により測定したバンドの強度をハウスキー

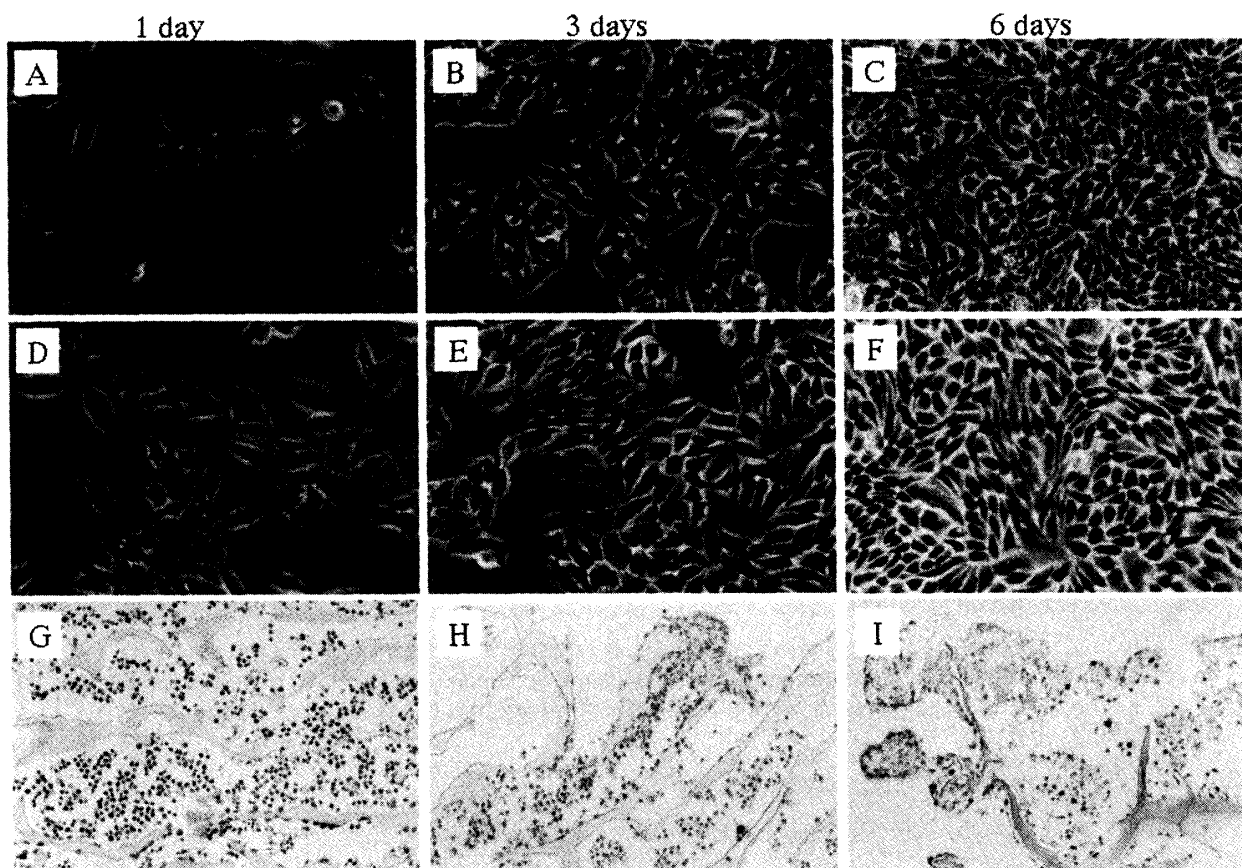


Fig. 1. Morphological changes of HSG cells in three-dimensional culture.

HSG cells were cultured on polystyrene dish (A, B, C), collagen coat dish (D, E, F) and collagen sponge (G, H, I) for 1, 3, or 6 days, respectively. HE staining of HSG cells was carried out for collagen sponge culture: $\times 200$

ピング遺伝子である GAPDH のバンドの強度に対する相対的発現量 (%) として示した。統計解析には Student's *t*-test を用い $P < 0.05$ の水準で有意差を判定した。

5. ウェスタンブロット法

HSG 細胞を SDS-Sample buffer (4% SDS, 2% 2-メルカプトエタノール, 12% グリセロールおよび 0.01% BPB を含む pH 6.8 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液) で可溶化後, 12.5% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。泳動終了後, セミドライ型ブロッティング装置 (アトー) を用い polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon™, ミリポア) に転写した。目的タンパク質の検出は, VECTASTAIN ABC-AmP™ Western Blotting Immunodetection Kit (Vector

Laboratories) を用い, アビジン-ビオチン複合体 (ABC) 法により行った。発色基質は 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP)/nitroblue tetrazolium chloride (NBT) を用いた。一次抗体として抗 CK 8 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), 抗 CK 18 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), および抗 CK 13 抗体 (PROGEN Biotech.) を用いた。二次抗体としてビオチン標識抗マウス IgM (Vector Lab.) を用いた。

結 果

1. 細胞形態の観察

HSG 細胞は, Fig. 1 に示すように PS (Fig. 1, A-C) および COL-C (Fig. 1, D-F) での単層培養で通常通り細胞は伸展して増殖した。とくに COL-C 培養では PS 培養と比較して強い伸

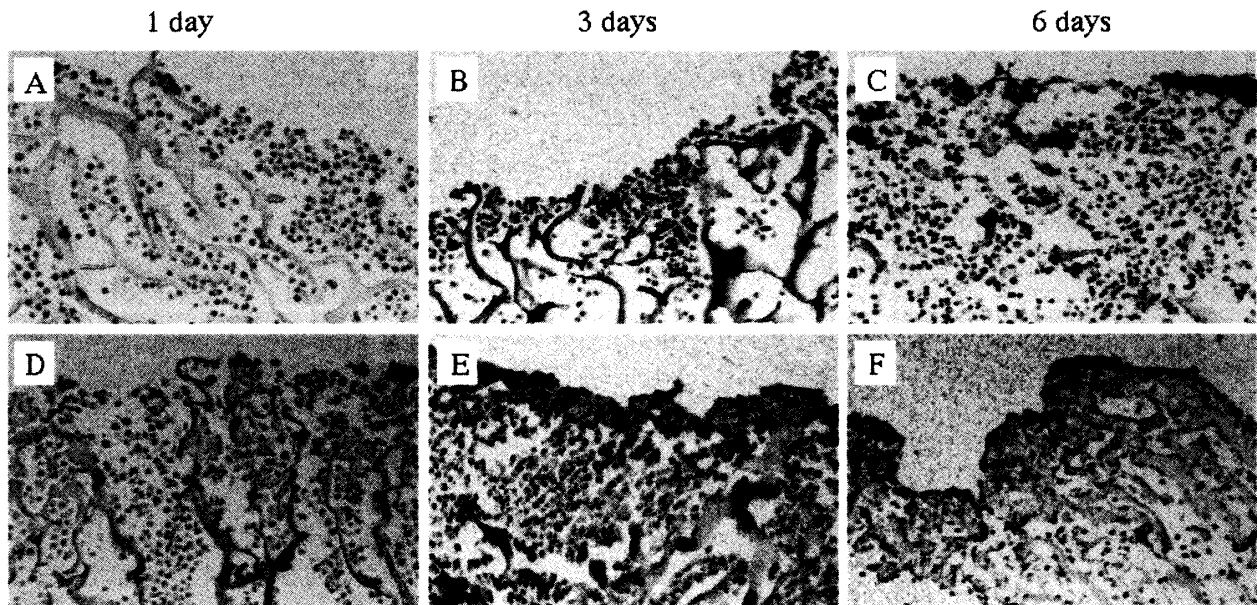


Fig. 2. Affect of agitation to human salivary gland cell line (HSG) cultured on collagen sponge. HSG cells cultured on collagen sponge after absence of agitation (A, B, C) or agitation for 20h (D, E, F) for 1, 3 or 6 days, respectively. HSG cells were stained HE staining: $\times 200$

展がみられた。COL-S 培養では、直接光学顕微鏡では観察できないため、切片を作成し HE 染色を行った。その結果 COL-S を用いた三次元培養での HSG 細胞は PS ならびに COL-C による単層培養と比較して、伸展がきわめて弱く球形を呈した (Fig. 1, G-I)。さらに局所的に細胞塊の形成がみられた。COL-S 培養において細胞を播種する際、細胞懸濁液を滴下しただけではスポンジ内部まで十分に細胞を取り込ませることができず、基質への十分な接着が得られないため、Kim らの方法¹⁵⁾に従い振とう培養を行った。一般に振とうにより形態が変化することがある。そこでこの形態の変化が振とう培養によるものであるか否か確認するため、振とうを行わず静置培養のみで三次元培養を行い同様に形態の変化を観察した。その結果、振とう培養 (Fig. 2, D-F) と同様、静置培養のみの三次元培養 (Fig. 2, A-C) においても HSG 細胞は球形を示した。このことから細胞形態の変化に、振とう培養の操作が関与しないことが確認された。従って足場の変化が形態の変化を引き起こしたと考えられた。

2. 二次元電気泳動による発現タンパク質の解

析

細胞形態の変化を分子レベルで検索するため、まず二次元電気泳動法によりタンパク質の発現パターンを解析した。今回用いた方法では等電点が約 4 から 9 の間でかつ分子量が 10kDa から 100kDa のタンパク質が分析可能である。その結果、COL-S 三次元培養と対照の PS および COL-C による単層培養間で、全体としてのタンパク質の発現パターンはほぼ同じで顕著な差は認められなかった (データを示さない)。この方法では分画を行わず細胞全体を俯瞰するため、細胞中に比較的多量に存在するタンパク質しか検出することができない。そこで、mRNA の発現について解析を行った。

3. RT-PCR 法による CK の mRNA 発現解析

COL-S 培養により細胞の形態が変化したことから、中間径フィラメントとして細胞骨格を形成し、細胞の形態に関与する上皮細胞の分化マーカーである CK に着目した。プロテオーム解析から HSG 細胞で発現することが明らかとなっている CK 7, 8, 17, 18 を選択した⁹⁾。また HSG 細胞が属する単層上皮以外の上皮細胞で発現する CK として、CK13 を選び RT-PCR

Fig. 3

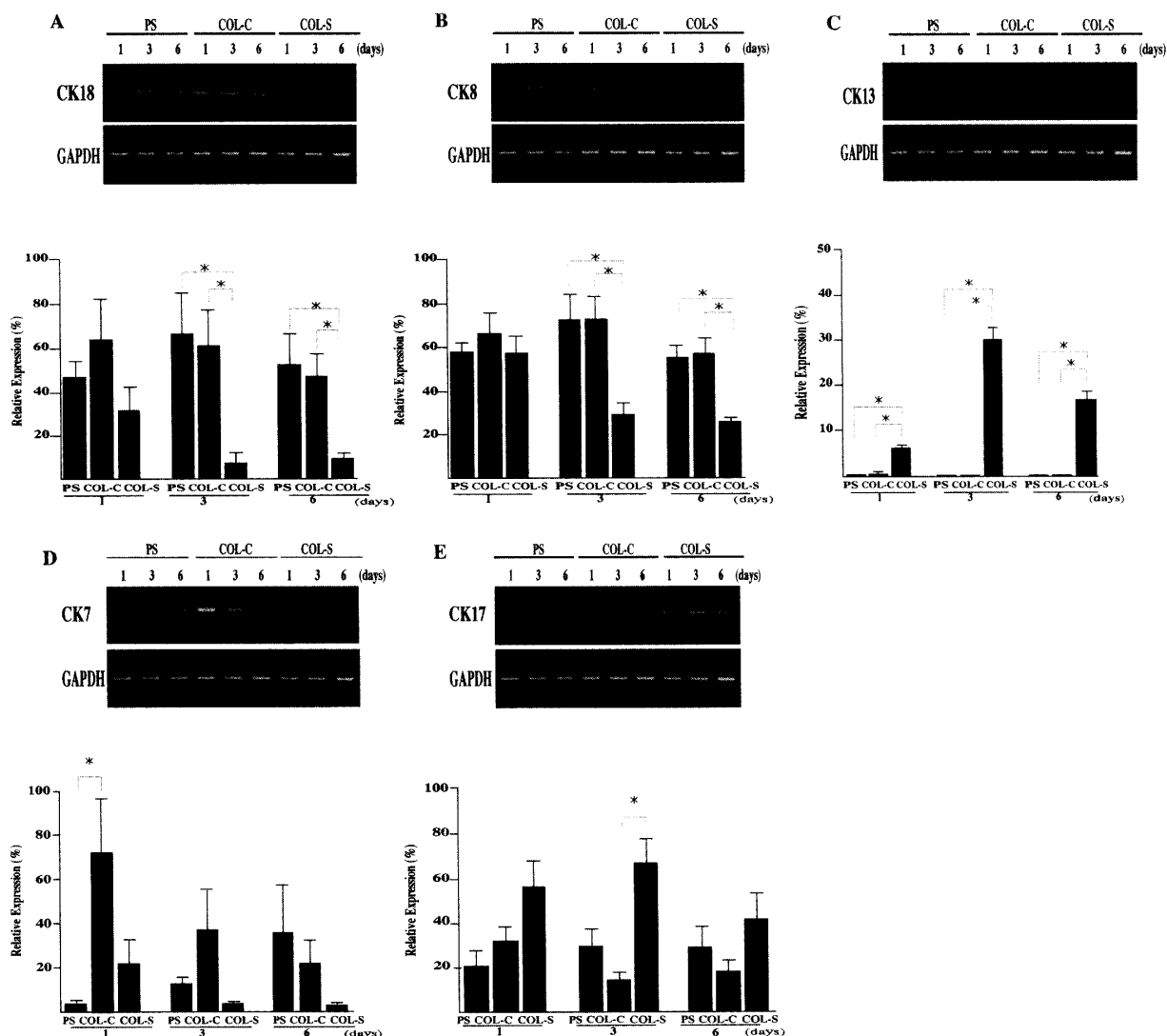


Fig. 3. Expression of cytokeratin in HSG cells.

HSG cells were cultured on polystyrene dish (PS), collagen coat dish (COL-C), collagen sponge (COL-S), respectively. After the indicated points of incubation, total RNA was isolated from HSG cells, and expression levels of cytokeratin 7, 8, 17, 18 and 13 mRNA were analyzed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Samples were resolved on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide. All bands were quantified by densitometry using NIH Image. Values for cytokeratin were normalized to those obtained for the corresponding glyceraldehydes adenosine-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The relative expression level is shown as the percent of each band based on the GAPDH. Results shown are representative of data obtained from two additional experiments (data are means \pm SD, n = 3), *, P < 0.05, from *t*-test.

法により mRNA の発現を調べた。その結果、CK 8 と CK18 の発現量 (Fig. 3, A,B) は、単層培養である PS と COL-C においては 1 日から 6 日間を通じて比較的多く発現しており、両者において有意な差は認められなかった。これに対して COL-S による三次元培養では発現量は 3 日目および 6 日目で単層培養と比較して有意 (P < 0.05) な減少を示した。CK13 の発現につい

ては、PS や COL-C での単層培養では、6 日間を通じてほとんど発現が認められなかったのに対して、COL-S 培養では、1 日目から発現が認められ、3 日目および 6 日目においても有意 (P < 0.05) な発現が認められた (Fig. 3, C)。CK 13 の発現量は、いずれもかなり低いですが 3 日目に発現量が最大 (30%) となった。CK 7 の発現量 (Fig. 3, D) に関しては、PS 培養と COL-C 培養

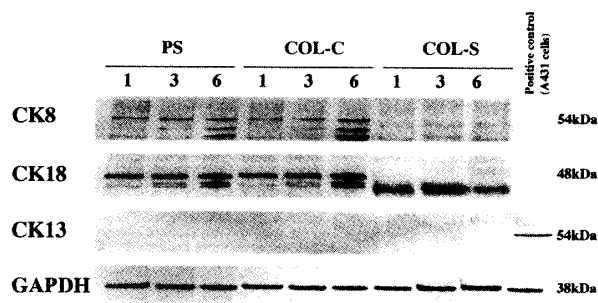


Fig. 4. Western blotting of cytokeratins in HSG cells.

HSG cells were cultured on polystyrene dish (PS), collagen coat dish (COL-C), collagen sponge (COL-S), respectively. After the indicated points of incubation, total cell lysates were prepared and samples were analyzed by Western Blotting using anti-CK8, 18 and 13 monoclonal antibodies, respectively. A431 cells were used as positive cells of CK13.

で発現のパターンが異なる傾向を見せた。PS培養では、CK 7の発現量は培養日数の増加に伴い上昇するのに対して、COL-C培養ではCOL-S培養と同様に減少する傾向が見られた。COL-S培養のCK17の発現量 (Fig. 3, E) は、単層培養と比較して1日目, 3日目および6日目のいずれも高かった。

4. ウェスタンブロット法によるCKのタンパク質発現解析

mRNAレベルで発現量に変化が認められたCK 8, CK18およびCK13に関して特異抗体を用いたウェスタンブロット法によりタンパク質の発現量について調べた (Fig. 4)。CK 8とCK18は、PS培養およびCOL-C培養においては6日間を通じて54kDaと48kDaの濃いバンドが認められた。一方、COL-Sでは、CK 8 (54 kDa) で薄いバンドが観察され mRNAと同様タンパク質レベルでも減少を認めた。CK18は、本来の分子量 (48kDa) に対して低い分子量の位置に薄いバンドが認められた。これらに対し、COL-S培養ではCK13のタンパク質の発現は確認できなかった。A431細胞は、扁平上皮の形質を示す細胞で、CK13を発現していることが知られている¹⁶⁾。そこで、CK13のポジティ

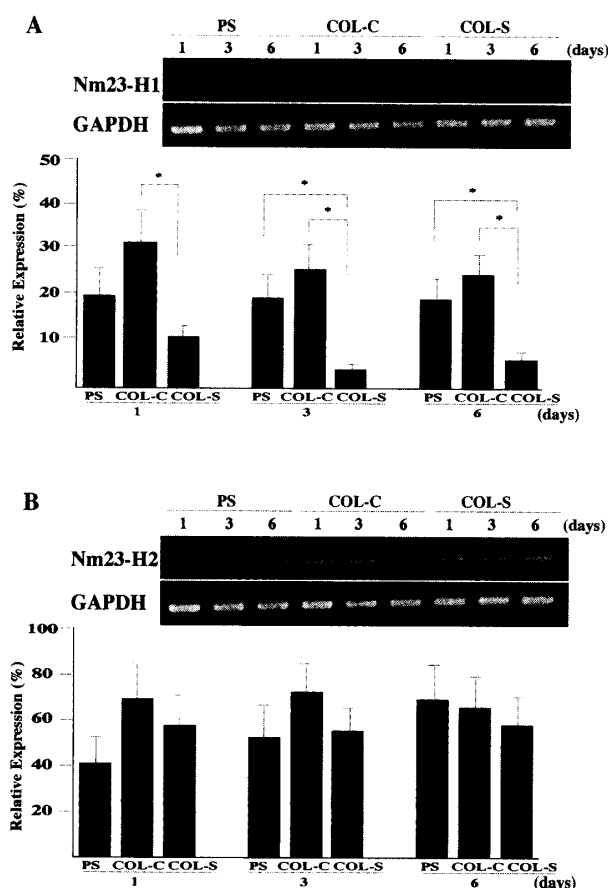


Fig. 5. Expression of Nm23 gene in HSG cells. HSG cells were cultured on polystyrene dish (PS), collagen coat dish (COL-C), collagen sponge (COL-S), respectively. After the indicated points of incubation, total RNA was isolated from HSG cells, and expression levels of Nm23-H1 and Nm23-H2 mRNA were analyzed by RT-PCR. Samples were resolved on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide. All bands were quantified by densitometry using NIH image. Values for Nm23 gene normalized to those obtained for the corresponding GAPDH. The relative expression level is shown as the percent of each band based on the GAPDH. Results shown are representative of data obtained from four additional experiments (data are means \pm SD, n = 5), *, P < 0.05, from *t*-test.

ブ・コントロールとして用いた結果、CK13が検出された (Fig. 4)。従ってCK13タンパク質の発現量は、検出限界以下の微量であるか、または発現していないことが示された。

5. RT-PCR 法による Nm23 の mRNA 発現解析

CK の発現の変化がどのような細胞内シグナル伝達系と関与するのか調べるために、癌転移抑制遺伝子の一つである Nm 23 について RT-PCR 法により mRNA の発現を調べた。Nm23 のうち Nm23-H 1 と Nm23-H 2 の 2 種類について発現を調べた (Fig. 5)。このうち Nm 23-H 1 は、COL-S 培養では単層培養と比較して発現量は低値を示し、3 日目と 6 日目では有意 ($P < 0.05$) に減少した (Fig. 5, A)。これに対して、Nm23-H 2 は、3 種類の培養系それぞれにおいて、6 日間を通じて発現量に変化が見られなかった (Fig. 5, B)。

考 察

本研究では再生基盤材料であるコラーゲンスポンジと、上皮細胞由来の HSG 細胞の分子レベルでの応答を調べるため、できるだけ単純なシステムである *in vitro* で実験を行った。

コラーゲンスポンジを用いて細胞培養を行うと三次元的にスペースが与えられるが、本実験で HSG 細胞を PS ならびに COL-C により単層培養を行った時と、COL-S により三次元培養を行った時では細胞の形態が異なった。COL-S で三次元培養された HSG 細胞は、単層培養されたものに比べ球形を呈し、一部は細胞塊を形成した。ここで細胞が球形を呈したのは COL-S 培養の際行っている振とう培養が原因であることが考えられた。しかしながら振とう操作の有無に関わらず球形を呈したため、形態の変化に振とう培養が関与しないことが示された。また COL-C による単層培養では細胞は球形を示さなかった。従って細胞の形態変化はコラーゲンの組成によるものではなく、スポンジという三次元的空間構造が関与したものと考えられる。

今回データを示さなかったが、まず二次元電気泳動法によりタンパク質の発現パターンの比較を行った。その結果、PS ならびに COL-C による単層培養と COL-S による三次元培養にお

いて HSG 細胞のタンパク質発現パターンにはほとんど差異は見られなかった。二次元電気泳動法は、タンパク質発現量の少ないものは発現量の多いものに隠れてしまい検出できなくなるという特徴を持つ。そのためこのタンパク質発現レベルでは差異がなかったと考えられる。従ってこの形態変化は、存在量の少ないタンパク質が関与していると考えられる。また個々のタンパク質のスポットについては、コラーゲン由来の分解ペプチドの混入が妨げとなり定量的な分析が困難であった。

細胞の形態の違いが認められたことに着目し、細胞骨格系に関係する CK について mRNA の発現を検索した。CK はすべての上皮細胞の骨格的なネットワークをつくる中間径フィラメントでありケラチンペアは組織の種類および細胞の分化段階に特異的に発現する。これまでに HSG 細胞は細胞学的に単層上皮の形質を示し、CK 7, 8, 17 および 18 を発現していることが明らかとなっている⁹⁾。また歯肉上皮では、基質の違いにより CK 7 と CK 13 のタンパク質レベルでの発現が変動することが報告されている¹⁷⁾。今回は CK 7, 8, 13, 17 および 18 について mRNA の発現を検討したところ、COL-S 培養により通常 HSG 細胞で発現している CK 8 と CK 18 の発現が減少し、発現がみられない CK 13 が認められた。CK 13 は粘膜上皮に特異的に発現し^{18), 19)}、表皮には発現しない^{20), 21)}。また扁平上皮化生において発現することが知られている²²⁾。他にも CK 13 の 1 A ドメインの mutation が白色海綿状母斑の原因であることが報告されている^{23), 24), 25)}。今回の結果は COL-S 培養された HSG 細胞は単層培養された HSG 細胞とは異なる CK 発現パターンを示し、これにより細胞形態の変化が生じる可能性を示唆している。

CK 7 は単層培養と三次元培養との比較において有意な差がなかったが、COL-C と COL-S で培養した細胞では、時間経過とともに発現量が減少する傾向が見られた。これに対して、PS で培養した細胞では発現量が増加する傾向が見

られた。COL-S と COL-C は両者とも基質中に I 型コラーゲンを含むのに対して、PS は含まないことから CK 7 の発現にはコラーゲンの存在が関与していることを示唆している。他の CK については CK 7 の様な関係は認められず、CK 7 だけの特徴であることは興味深い。

CK18 のウェスタンブロットにおいて、本来検出される分子量 (48kDa) よりも低分子域にバンドが観察された。このバンドは、COL-S で培養した細胞のみに観察され、他の培養法では検出されなかった。そこで、コラーゲンスポンジ由来の物質が関与しているのかを調べるためにコラーゲンスポンジのみをコラゲナーゼ処理した試料について CK18 のウェスタンブロットを行った。この結果、48kDa よりも低分子域にバンドは検出されず (データは示さない)、コラーゲンスポンジは関与していないことが示された。従ってこの低分子域のバンドが CK18 であることが確認された。分子量の変化は、CK18 のリン酸化などの修飾、あるいは使用したコラゲナーゼに混入した微量なプロテアーゼによる CK18 の分解が考えられる。

タンパク質レベルでの CK13 の発現をウェスタンブロット法により調べたが、発現を確認することはできなかった。これは CK13 が発現の確認ができないほど少量しかタンパク質として存在していないか、もしくは緊急ケラチンのように mRNA レベルでは発現していてもタンパク質レベルでは発現していないと考えられる。緊急ケラチンといわれる CK 6 と CK16 は正常表皮細胞では mRNA は発現されているが、ケラチンタンパク合成には至っていない。しかし、炎症、腫瘍化のようなケラチノサイトが過増殖状態にあるとただちにメッセージ量も増加しタンパクも発現される⁸⁾。

本研究においてコラーゲンを基質とした三次元培養において CK13 が発現したという点で Baeza-Squiban らの結果²⁶⁾と一致したが、CK13 のタンパク質レベルでの発現が確認できなかった点では異なった。従って CK13 が細胞の形態変化に直接関与しているかは不明である。

しかし三次元培養により細胞の形質が変化して、形態の変化や CK をはじめとする生化学的マーカーの変化などがおこっているものと考えられる。また COL-C と COL-S での CK 遺伝子発現の違いからも、Ben-Ze'ev ら²⁷⁾が報告している細胞外マトリクスの物理的特徴はその組成成分より重要であり、細胞の形態と細胞構造の変化は分化に係る遺伝子発現を制御する上で非常に重要であるという考えを支持する。

CK の発現変化が生体材料に対するどのような細胞の応答によって起きるのかを調べるために、CK とシグナル伝達系の遺伝子について探索を行った。CK の発現変化と転移との関係がこれまでに報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。また転移能の大きさは癌転移抑制遺伝子の発現と関係がある¹²⁾。一方上皮細胞はまた足場依存性のアポトーシスである Anoikis を起こす²⁸⁾。この場合、細胞は生存するために転移して、新たな部位で生存増殖を行う。本研究で用いた HSG 細胞は腺癌細胞であるので、癌転移抑制遺伝子である Nm23 について遺伝子発現を調べた。Nm23 は、これまでに 8 種類が知られているが、主として転移との関係について研究が行われているのは Nm23-H 1 および Nm23-H 2 である²⁹⁾。この遺伝子の産物は元々 nucleoside diphosphate kinase として知られており、6 量体として酵素活性を示す。高い転移能を持つ癌細胞ではこの遺伝子の発現量が減少していることが分かっている³⁰⁾。

ヒト口腔粘膜上皮細胞ではこれまでに saquamous cell carcinoma (SCC) 細胞株で、転移能が高い細胞ほど Nm23 遺伝子の発現が低いことが知られている¹³⁾。興味深いことに、SCC 細胞株では Nm23-H 2 が減少しているが、Nm23-H 1 遺伝子は減少していなかった¹³⁾。本研究で用いた HSG 細胞では、COL-S で培養すると Nm23-H 1 の mRNA 発現量が減少したが、Nm23-H 2 は変化しなかった。Nm23-H 1 と Nm23-H 2 における機能の違いは示されているが³¹⁾、細胞中での局在には相違が見られず、まだ明確な役割分担は知られていない³⁰⁾。HSG

細胞では、Nm23-H 1 および Nm23-H 2 の両者ともタンパク質レベルで発現している⁹⁾。また癌転移抑制遺伝子ではないが、悪性腫瘍において高発現する遺伝子である folate receptor α ³²⁾については変化が見られなかった（データは示さない）。これらの結果は Nm23 ファミリー遺伝子の個々の機能の相違を考える上で興味深い結果であると思われる。

Nm23-H 1 は、ERK/MAPK シグナル伝達系の足場タンパク質である kinase suppressor of Ras 1 (KSR 1) と結合する¹⁴⁾。この KSR 1 は Ras のシグナル下流に作用することにより ERK/MAPK シグナル伝達系に参与することが知られている¹²⁾。ERK/MAPK シグナル伝達系は増殖や分化に関係する³³⁾。コラーゲン三次元培養という外部の刺激により Nm23-H 1 の発現量が変化し、これが ERK/MAPK シグナル伝達系を介して細胞の分化に参与することが考えられた。このことは上皮細胞マーカーである CK 分子の発現パターンの変化とも関連し、Nm23-H 1 が CK の発現に関与していると考えられる。

今後は、外部からの刺激がどのようにシグナル伝達系に働き、この細胞内のシグナルが細胞骨格系タンパク質の発現と細胞内の骨格タンパク質の再構成に関わっていくのかを解明することが重要であると考えられる。

結 論

本研究では HSG 細胞をコラーゲンスポンジにて三次元培養し、単層培養と比較検討した。

1. HSG 細胞は単層培養では接着後伸展するのに対しコラーゲンスポンジ培養では球形を呈し形態が変化した。
2. 細胞形態の変化を分子レベルで検討するために、細胞骨格タンパク質である CK の mRNA 発現を調べた。コラーゲンスポンジ培養では HSG 細胞で発現している CK 8, CK18 が減少し、通常 HSG 細胞では発現せず、粘膜上皮や扁平上皮化生に特異的な CK 13 の発現がみられた。

3. コラーゲンコートディッシュ培養では形態や CK の発現変化が認められないことから、基質の物理的特性が細胞の形質の変化に関係する遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

4. CK の発現変化と細胞内のシグナル伝達の関連性を調べるために、癌転移抑制遺伝子 Nm23 の mRNA の発現を調べた。コラーゲンスポンジ培養では Nm23-H 1 の発現は減少し、ERK/MAPK シグナル伝達系がこの細胞応答に関与していることが示された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり御教示いただきました本学口腔解剖学第二講座石関清人講師に衷心より感謝の意を表します。また、御協力いただきました本学口腔生化学講座の皆様にも厚く感謝いたします。

本論文の一部は第45回歯科基礎医学会学術大会（平成15年9月18日、盛岡）、第46回同大会（平成16年9月24日、広島）および第41回口腔組織培養学会学術大会（平成16年10月20日、東京）において発表した。

なお、本研究の一部はオープンリサーチセンター補助金による研究助成金を受けて行われた。

文 献

- 1) 田畑泰彦：生体材料，生体組織工学を基盤とした再生医療の最前線，日本歯科評論，64(2)：167-181 (2004)
- 2) Shirasuna, K., Sato, M., and Miyazaki, T.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 48 : 745-752, 1981.
- 3) Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yanagawa, T., and Yura, Y.: 5-Azacytidine induction of stable myoepithelial and acinar cells from human salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Res.* 47 : 4453-4459, 1987.
- 4) Azuma, M., Kwamata, H., Kasai, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yanagawa, T., and Sato, M.: Effect of retinoic acid on morphological features and biological markers of a neoplastic human salivary intercalated duct cell line in culture. *Cancer Res.* 49 : 7219-7225, 1988.

- 5) Azuma, M., and Sato, M.: Morphogenesis of normal human salivary gland cells in vitro. *Histol. Histopath.* 9 : 781-790, 1994.
- 6) Lam, K., Zhang, L., Yamada, K. M., and Lafrenie, R. M.: Adhesion of epithelial cells to fibronectin or collagen 1 induces alterations in gene expression via a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 189 : 79-90, 2001
- 7) Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., and Krepler, R.: The catalog of human keratins. Pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31 : 11-24, 1982.
- 8) 北島康雄: 細胞骨格と細胞接着の構造・機能とその異常としての皮膚疾患, 月田承一郎編集: 分子医科学シリーズ2細胞: 構造と機能, 第1版, メディカルビュー社, 東京, 89-116ページ, 1996
- 9) 加茂政晴, 客本斉子, 帖佐直幸, 佐藤詔子: プロテオーム解析におけるヒト顎下腺由来腺癌細胞株とその派生細胞における発現タンパクの比較, 口腔組織培養学会, 9 : 31-42, 2000.
- 10) Ding, S.-J., Li, Y., Tan, Y.-X., Jiang, M.-R., Tian, B., Liu, Y.-K., Shao, X.-X., Ye, S.-L., Wu, J.-R., Zeng, R., Wang, H.-Y., Tang, Z.-Y., and Xia, Q.-C.: From proteomic analysis to clinical significance. *Mol. Cell. Proteomics* 3 : 73-81, 2003.
- 11) Jiang, J., Ubright, T. M., Younger, C., Sanchez, K., Bostwick, D. G., Koch, M. O., Ebe, J. N., Cheng, L.: Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125 : 921-923, 2001.
- 12) Steeg, P. S.: Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 3 : 55-63, 2003.
- 13) Miyazaki, H., Fukuda, M., Ishijima, Y., Takagi, Y., Iimura, T., Negishi, A., Horayama, R., Ishikawa, N., Amagasa, T., and Kimura, N.: Overexpression of nm23-H2/NDP kinase B in human oral squamous cell carcinoma cell line results in reduced metastasis, differentiated phenotype in the metastatic site, and growth factor-independent proliferative activity in culture. *Clin. Cancer Res.* 5 : 4301-4307, 1999.
- 14) Salerno, M., Palmieri, D., Bouadis, A., Halverson, D., and Steeg, P. S.: Nm23-H1 metastasis suppressor expression level influences the binding properties, stability, and function of the kinase Suppressor of Ras 1 (KSR1) Erk scaffold in breast carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 25 : 1379-1388, 2005.
- 15) Kim, B.-S., Putman, A. J., Kulik, T. J., and Mooney, D. J.: Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol. Bioeng.* 57 : 47-54, 2001.
- 16) Waseem, A., Alam, Y., Dogan, B., White, K. N., Leigh, I. M., and Waseem, N. H.: Isolation, sequence and expression of the gene encoding human keratin 13. *Gene* 215 : 269-279, 1998.
- 17) Lagneau, C., Frages, J.-C., Exbrayat, P., and Lissac, M.: Cytokeratin expression in human oral gingival cells: in vitro regulation by titanium-based implant materials. *Biomaterials* 19 : 1109-1115, 1998.
- 18) Fuchs, E., and Green, H.: Reguration of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vimentin A. *Cell* 25 : 617-625, 1981.
- 19) Mackenzie, I. C., Rittman, G., Gao, Z., Leigh, I., and Lane, E. B.: Patterns of cytokeratin expression in human gingival epithelia. *J. Periodont. Res.* 26 : 468-478, 1991.
- 20) Lane, E. B., Bartek, J., Purkis, P. E., and Leigh, I. M.: Keratin antigens in differentiating skin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 455 : 241-253, 1985.
- 21) Sun, T.-T., Tseng, S. C. G., Huang, A. J.-W., Cooper, D., Schermer, A., Lynch, M. H., Weiss, R., and Eichner, R.: Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 455 : 307-329, 1985.
- 22) Jetten, A. M., Jeorge, M. A., Smith, H. L., and Vollberg, T. M.: Keratin13 expression is linked to squamous differentiation in rabbit tracheal epithelial cells and down regulated by retinoic acid. *Exp. Cell Res.* 182 : 622-634, 1989.
- 23) Smith, F. J. D.: The Molecular Genetics of Keratin Disorders. *Am. J. Clin. Dermatol.* 4 : 347-364, 2003.
- 24) Terrinoni, A., Rugg, E. L., Lane, E. B., Melino, G., Felix, D. H., Munro, C. S., and McLean, W. H. I.: A novel mutation in keratin13 gene causing oral white sponge nevus. *J. Dent. Res.* 80 : 919-923, 2001.
- 25) Shibuya, Y., Jianming, Z., Yokoo, S., Umeda, M., and Komori, T.: Constitutional mutation of keratin13 gene in familial white sponge nevus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 96 : 561-5, 2003.
- 26) Baeza-Squiban, A., Boisvieux-Ulrich, E., Guilianelli, C., Houcine, O., Geraud, G., Guennou, C., and Marano, F.: Extracellular matrix-dependent differentiation of rabbit tracheal epithelial cells in primary culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30A : 56-67, 1994.
- 27) Ben-Ze'ev, A.: Animal cell shape changes and gene expression. *Bioassays* 13 : 207-212, 1991.
- 28) Dufour, G., Demers, M.-J., Gagne, D., Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Bouchard, V., Degongre, I., Beaulieu, J.-F., Cheng, J. Q., Fujita, N., Tsuruo, T., Vallee, K., and Vachon, P. H.: Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. *J. Biol. Chem.* 279 : 44113-44122, 2004.
- 29) Ma, D., McCorkle, J. R., and Kaetzel, D. M.: The

- metastasis suppressor NM23-H1 possesses 3'-5' exonuclease activity. *J. Biol. Chem.* 279 : 18073-18084, 2004.
- 30) Bosnar, M. H., de Gunzburg, J., Bago, R., Brecevic, L., Weber, I., and Pavelic, J.: Subcellular localization of A and B Nm23/NDPK subunits. *Exp. Cell Res.* 298 : 275-284, 2004.
- 31) Postel, E. H., Berberich, S. J., Rooney, J. W., and Kaetzel, D. M.: Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32 : 277-284, 2000.
- 32) Dachs, G. U., Dougherty, G. J., Stratford, I. J., and Chaplin, D. J.: Target gene therapy to cancer: a review. *Oncol. Res.* 9 : 313-25, 1997.
- 33) Lombardi, D., Lacombe, M.-L., and Paggi, M. G.: nm23: Unraveling its biological function in cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 182 : 144-149, 2000.