

## 研 究

## Galectin-1 はヒト口腔扁平上皮癌細胞のアノイクスを抑制する

鎌田 仁, 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 : 2007年10月25日)

(受理 : 2007年11月27日)

**Abstract** : In order to determine the factors that relate to anoikis of the human oral squamous cell carcinoma (hOSCC) cells, we tried to search the proteins using the HSC-3 cell with metastaticity and the HSC-2 cells without metastaticity. The HSC cells were cultured in a dish coated with poly-HEMA to prevent cell adhesion, and then the degree of cell death was examined. The ratio of cell death for HSC-2 cells was significantly higher than that for HSC-3 cells, and the result of TUNEL staining showed that the cell death was apoptosis. The level of anoikis in HSC-2 cells was notably higher than that in HSC-3 cells. The expression level of TrkB, caveolin-1, and galectin-3 genes that are known as factors related to anoikis was investigated by RT-PCR. There was no significant difference in the gene expression between HSC-2 and HSC-3 cells. Galectin-1 was found by the proteome analysis and the protein was expressed more strongly in the HSC-3 cells as compared with the HSC-2 cells. A similar result was obtained in the amount of the mRNA expression. The anoikis of HSC-3 cells was caused strongly by the addition of lactose that inhibits the binding of galectin-1 to the cell membrane. When recombinant-galectin-1 was added to the medium, the level of anoikis in HSC-2 cells was decreased significantly.

From these results, it was suggested that galectin-1 is the factor that suppresses anoikis in hOSCC cells.

**Key words** : Oral squamous cell carcinoma, anoikis, galectin-1, HSC cells

## 緒 言

上皮細胞は, おもにインテグリンを介する細胞外マトリックス (ECM) からのシグナルによって, 増殖または分化などの制御を受けてい

る<sup>1)</sup>。しかし, ECM との接触が失われると通常の上皮細胞はそのシグナルを断たれることにより, アポトーシスを起こす。この上皮細胞に特有な足場依存性のアポトーシスのことをアノイクスという<sup>2,3)</sup>。一方, 上皮由来の腫瘍細胞が転

Galectin-1 in human oral squamous cell carcinoma cells mediates suppression of anoikis  
Hitoshi KAMADA, Masaharu KAMO, Seiko KYAKUMOTO  
Department of Biochemistry, School of Dentistry, Iwate Medical University (Chief : Prof. Nobuko SATO)  
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

移を起こすには、足場を離れて他の臓器に移動しても生存、増殖する能力が必要である。すなわち、腫瘍細胞は何らかの方法によってアノイクスを回避する必要がある<sup>4,5)</sup>。口腔扁平上皮癌 (OSCC) の転移においても、アノイクスは重要な因子である。しかしながら OSCC において、これまでアノイクスの研究はあまり進んでいない。

OSCC では、その細胞株の HSC-2 と HSC-3 細胞が、転移や浸潤などの研究に用いられている<sup>6,7,8)</sup>。これらの細胞の特徴として、HSC-3 細胞は転移能を有するが、HSC-2 細胞は転移能を持たないことが報告されている<sup>6)</sup>。一方、浸潤能に関しては HSC-2 細胞が HSC-3 細胞と比較してより高い浸潤能を示すことが報告されている<sup>7)</sup>。したがって、HSC-2 細胞と HSC-3 細胞の比較を行うことにより、アノイクスに関連する因子を検出できる可能性がある。

大腸がんや前立腺がんにおいて、これまでにアノイクスに関係するタンパク質として TrkB, caveolin-1, galectin-3 が重要な働きをしていることが知られている<sup>9,10,11,12,13)</sup>。このうち、TrkB はアンチアノイクス因子としての性質を持ち、大腸がんの転移に関係することが報告されている<sup>9)</sup>。Caveolin-1 は甲状腺がんの腫瘍抑制因子であり<sup>10)</sup>、galectin-3 は前立腺がんにおいて発現が認められており、腫瘍細胞のアポトーシス抑制因子として知られている<sup>12)</sup>。しかし、OSCC においてはアノイクスの研究は未だ進んでおらず、関係するタンパク質についてはインテグリン  $\alpha v$  以外には研究が少ない<sup>14,15)</sup>。

Galectin-1 は、ガレクチンファミリーの一員で、腫瘍の形質転換、細胞周期の制御、アポトーシス、細胞接着、転位、炎症などに関連するタンパク質である<sup>16,17)</sup>。また galectin-1 は糖鎖の  $\beta$ -ガラクトシド構造に特異的に結合するレクチンで、様々な正常細胞および腫瘍細胞で産生される<sup>18,19)</sup>。また、細胞と細胞外マトリックス間の接着に寄与することが知られている<sup>20)</sup>。しかしながら、OSCC における galectin-1 の機能についての報告はない。

本研究の目的は、OSCC 由来の HSC-2 および HSC-3 細胞におけるアノイクス関連因子の検出と、その因子の機能を明らかにすることにある。

## 材料および方法

### 1. 材料

実験に用いた細胞株 (HSC-2, HSC-3 および MDA-MB-231) は (財) ヒューマンサイエンス振興財団 (大阪) の研究資源バンクより購入した。Poly-2-hydroxyethylmethacrylate (Poly-HEMA), Protease inhibitor cocktails for mammalian および Phosphatase inhibitor I & II は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO U. S. A.) より購入した。抗 galectin-1 と抗 galectin-3 抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (La Jolla, CA, U.S.A.) より購入した。Recombinant galectin-1 は R&D Systems (Minneapolis, MN, U.S.A.) より購入した。

### 2. 細胞培養

ヒト口腔扁平上皮癌由来の HSC-2 と HSC-3 細胞は、90mm 培養ディッシュ (Nunc, Denmark) で 10% ウシ胎仔血清 (FBS) (Gibco, CA, U. S. A.), 1% Antibiotic-Antimycotic (AB-AM) (Gibco) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (Sigma) 中で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下にて静置培養した。ヒト乳癌組織由来の MDA-MB231 細胞は 90mm 培養ディッシュで 10% FBS, 1% AB-AM を含む D-MEM : HAM F-12 (Gibco) (1:1) 中で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。各々の細胞は 2 日に 1 回培地交換を行った。

### 3. 細胞死の測定

6 ウェルマルチディッシュ (Nunc, Denmark) に 95% エタノールに溶解した poly-HEMA, (10mg/ml) を Cellulose Acetate, (0.20 $\mu$ m) を用いて濾過滅菌したものを 1 ウェルあたり 670 $\mu$ l (4 ml/plate) 加え、クリーンベンチ内で 3 時間乾燥させた。単層培養した HSC 細胞を poly-HEMA でコートした 6 ウェルマルチディッシュに  $1 \times 10^6$  cells/well の密

度で播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下にて懸濁培養した。培養後、細胞数の計測は、細胞のトリパンブルー染色により行った。懸濁培養した細胞を2 mlチューブに回収し、遠心分離(8,000 rpm, 5 min)した後、上清を捨て、10% trypsin- EDTAを2 ml添加しピペティングを数回行い、その細胞懸濁液50 $\mu$ lに同じく50 $\mu$ lトリパンブルーを添加し、死細胞を染色した。測定は光学顕微鏡を用いて行い、血球計算盤上で染色された細胞を死細胞としてカウントした。測定を3回行い、その平均値から生存細胞との比率を算出した。アポトーシスの確認には、TUNEL染色をMEBSTAIN Apoptosis Kit Direct (MBL, 名古屋)を用いて行った。染色は、キットのプロトコールに準じて行った。

#### 4. RT-PCR

HSC細胞からIsogen (ニッポンジーン)を用いて全RNAを調製し、全RNA 1 $\mu$ gからSuper script III (Invitrogen, CA, U.S.A.)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。TrkB: 30サイクル, センスプライマー; 5'-TACTTGTACTAAAATACA-3', アンチセンスプライマー; 5'-CGCTTACTGTAGCCCTGTG-3', caveolin-1 (CAV-1): 30サイクル, センスプライマー; 5'-AACCTCCTCAAGTTTTTCATCC-3', アンチセンスプライマー; 5'-CTTGTTGTTGGGCTTGTAGATG-3', galectin-3 (GAL-3): 30サイクル, センスプライマー; 5'-CCAAACCCTCAAGGATG-3', アンチセンスプライマー; 5'-GCCACCTTGAAGTGGTC-3', galectin-1 (GAL-1): 30サイクル, センスプライマー; 5'-AACCTGGAGAGTGCCTTCGA-3' アンチセンスプライマー; 5'-GTAGTTGATGGCCT

CCAGGT-3'。増幅産物は2% E-gel (Invitrogen)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. 二次元電気泳動法

90mm ディッシュで単層培養したHSC細胞をPBS(-)でよく洗浄し、培養液を十分に除去した後、Lysis Buffer (7.8M Urea, 2M Thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer, 1% Protease Inhibitor Cocktail for Mammalian, 0.5% Phosphatase Inhibitor I & II, 1.54% DTT, 0.1% Bromophenol Blue)を350 $\mu$ l加えてよく振盪し、細胞を可溶化した。得られた細胞可溶化液を1.5mlチューブに回収して5分間超音波処理した。その後1時間37°Cでインキュベートし、15,000rpmで10分間遠心分離した。上清を回収し、Immobiline DryStrip (pH 4~7, 7 cm, GE Healthcare Ltd., UK)に添加し一晩膨潤させた。Ettan IPGphor II (GE Healthcare)を用いて等電点電気泳動を行い、続いて12.5%ポリアクリルアミドゲル(PAGミニ2D 10cm $\times$ 10cm, 第一化学薬品, 東京)を用いて二次元電気泳動を行った。泳動後、クーマシーブリリアントブルー(CBB)染色を行い、得られたタンパク質スポットのパターン解析を行った。

#### 6. LC-MS/MSによる解析

二次元電気泳動により得られたタンパク質スポットを切り出し、常法によりトリプシンを用いたゲル中消化処理を行いペプチドフラグメント化した<sup>21)</sup>。ペプチド混合物をZip-TipC18 (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.)で脱塩後、10%アセトニトリルを含む1%ギ酸水溶液に溶解した。ついで、LC-MS/MS (HCT-ultra, Burkert Daltonics, Germany)を用いてMS/MSを分析し、得られたデータについて検索ソ

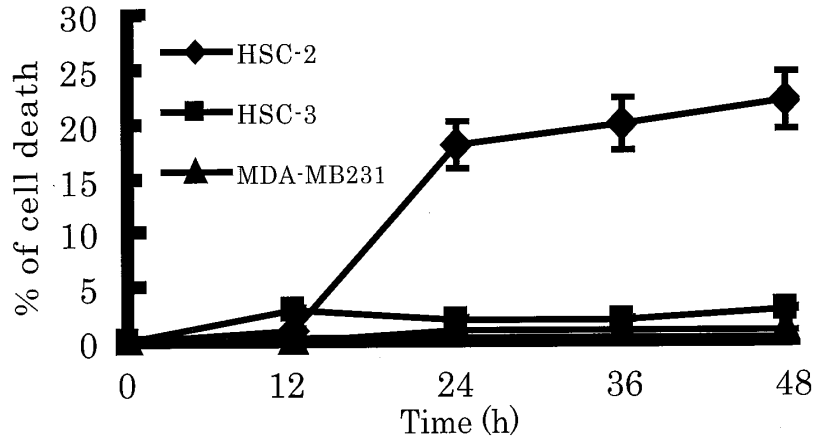


Fig. 1. Time course of cell death in the presence of a poly-HEMA coated dish. All cells were cultured on a poly-HEMA coated dish for 12, 24, 36 and 48 hours, respectively. The total proportion of dead cells was determined by trypan blue exclusion.

フト Mascot (Matrix Science, Boston, MA, U.S.A.) を用いてタンパク質の同定を行った。

#### 7. ラクトース添加実験によるアノイクスへの影響

HSC-3 細胞を, poly-HEMA でコートした 6 ウェルマルチディッシュに, 1 ウェルあたりの細胞数が  $1 \times 10^6$  個になるように播種した。50mM のラクトース溶液および 50mM のマルトース溶液を調整し, Cellulose Acetate, (0.20  $\mu$ M) を用いて濾過滅菌した後, それぞれの実験群の培養液に添加した。また, コントロール群

には PBS (-) を添加した。37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下にて懸濁培養を行い, トリパンブルー染色によって 48 時間後の死細胞の計測を行った。

#### 8. Galectin-1 添加によるアノイクスへの影響

1 ウェルあたりの細胞数が  $1 \times 10^6$  個になるように, HSC-2 細胞を poly-HEMA でコートした 6 ウェルマルチディッシュに播種した。Horiguchi ら<sup>20</sup>の方法に準じて, galectin-1 (R&D systems) を PBS (-) に溶解し, HSC-2 細胞の培養液に, 濃度を 0.3  $\mu$ M または 1  $\mu$ M になるように添加し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下に

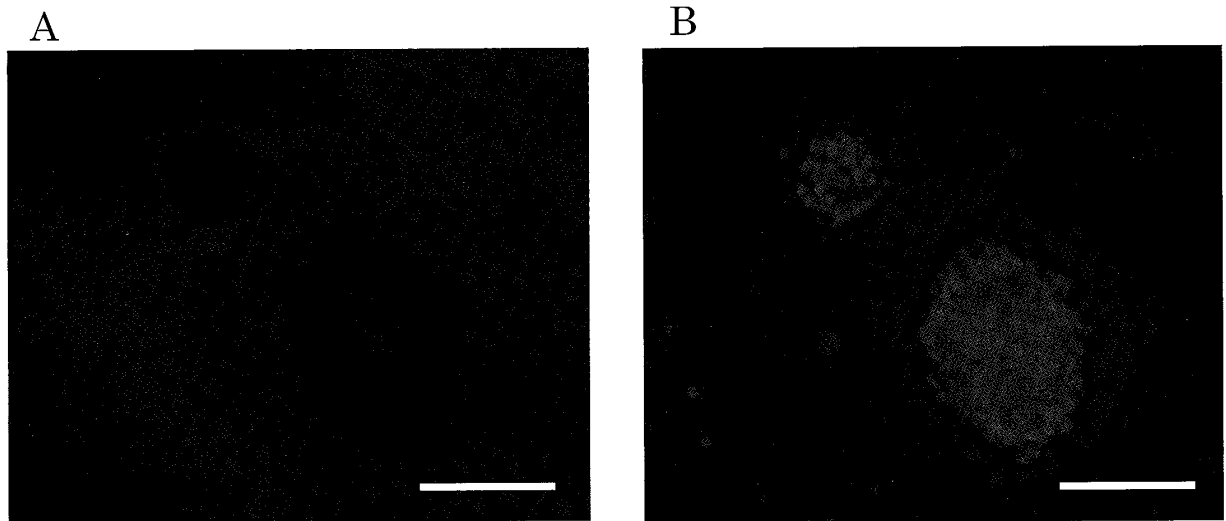


Fig. 2. TUNEL staining of HSC-2 cells. HSC-2 cells cultured on poly-HEMA for 48 hours. HSC-2 cells were stained positively by TUNEL method (A) or propidium iodide (B). Images were collected with a fluorescent microscope using a x20 objective. Size bar = 100  $\mu$ m.

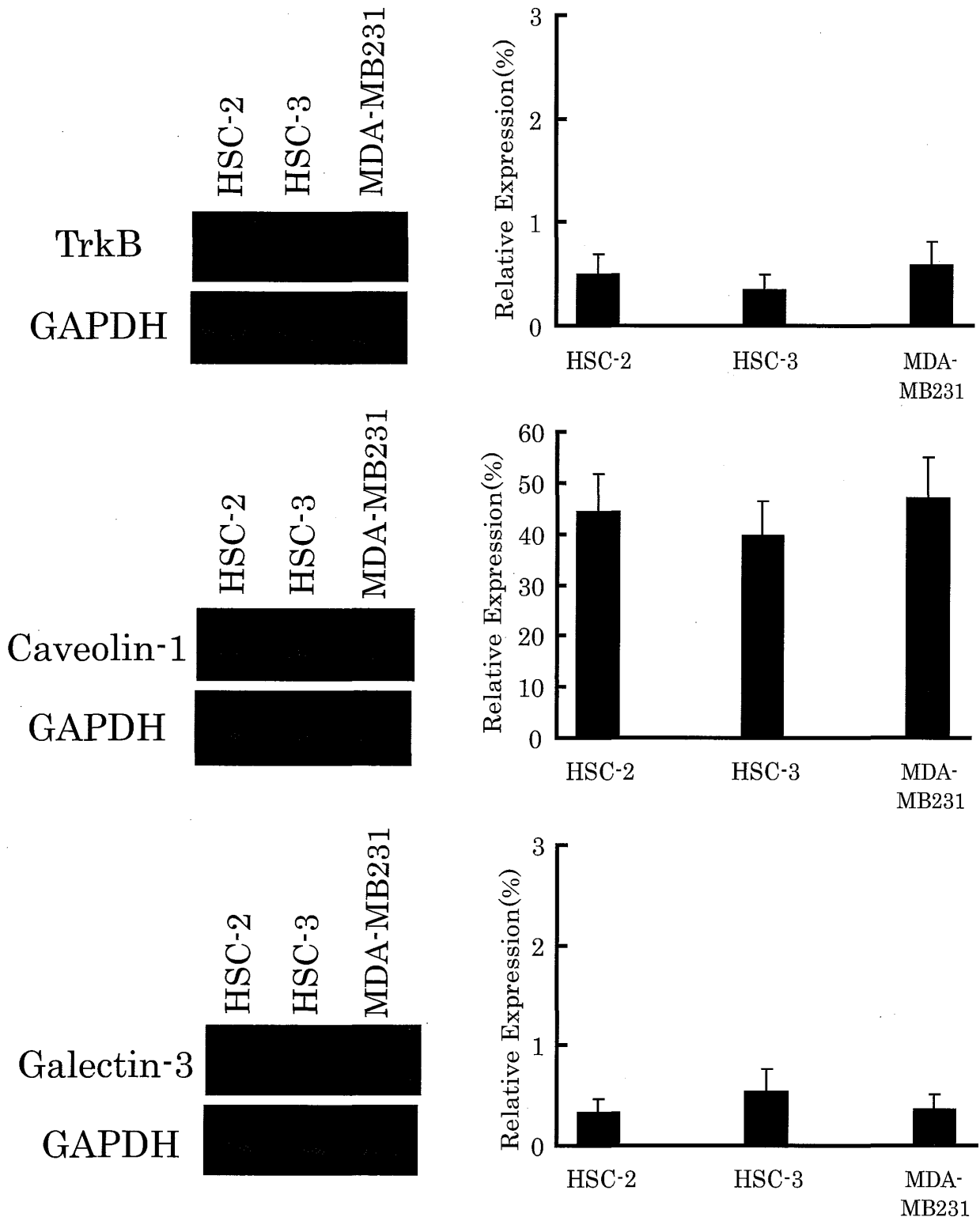


Fig. 3. Expression of anoikis related genes with RT-PCR.

Cells were cultured on a polystyrene dish. Total RNA was isolated from all cells, and expression levels of TrkB, caveolin-1 and galectin-3 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. The values for genes were normalized to those obtained for the corresponding glyceraldehyde 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.

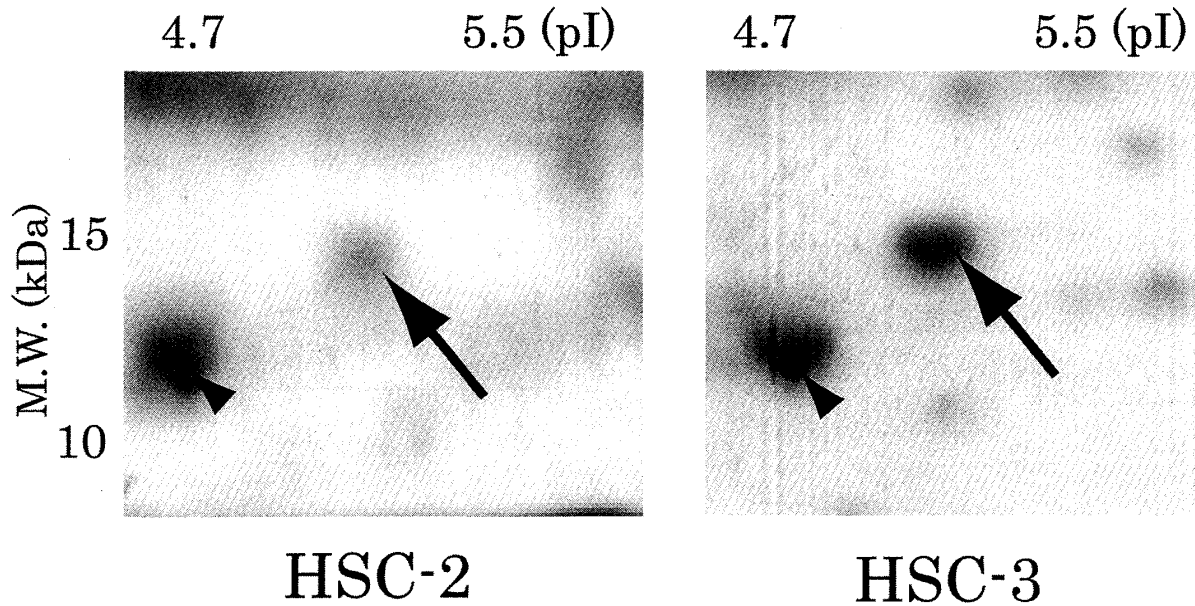


Fig. 4. Profiles of galectin-1 protein from HSC cells by two-dimensional electrophoresis. The comparison of expressed proteins by two-dimensional electrophoresis. Protein spots were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. A spot of galectin-1 was by arrow. Arrow head means thioredoxin as an internal standard.

て懸濁培養を行い, 48時間後の死細胞の計測をトリパンブルー染色によって行った。

## 結 果

### HSC細胞のアノイキス

Zhang ら<sup>22)</sup>の方法に準じて, poly-HEMA コートディッシュを用いて HSC-2 および HSC-3 細胞のアノイキスを検討した。その結果, 培養48時間後, 転移能を持たない HSC-2 細胞は, 転移能を持つ HSC-3 細胞および MDA-MB231細胞と比較して死細胞の割合が有意に高かった (Fig. 1)。また, HSC-3 細胞に関しては, この条件下でアポトーシスを起こしていることが示されている<sup>22)</sup>。そこで, HSC-2 細胞の細胞死がアポトーシスによるものであるかを確認するため, TUNEL 染色を行った (Fig. 2)。HSC-2 細胞は, 48時間後までに強く凝集塊を形成した。単独の細胞は TUNEL 染色で強く染まり, アポトーシスを起こしていた。塊状の細胞集団では, 外部の細胞はアポトーシスを起こしているが, 内部にある細胞は染色されていなかった (Fig. 2 A)。また, HSC-3 細胞

においても TUNEL 染色によりアポトーシスが確認された (データを示さず)。このことは, poly-HEMA コートにより足場を失った細胞がアノイキスを生じ, HSC-2 細胞は, HSC-3 細胞に対してアノイキス感受性が大きいことを示している。これに対して, HSC-3 細胞では細胞同士の凝集は少なく, また, アノイキスに対する感受性も小さいことがわかった。実験に用いた MDA-MB231細胞は乳がん由来の細胞で, 転移能が高いことが示されている<sup>23)</sup>。培養48時間後の死細胞の割合は5%以下であり, アノイキス感受性が小さいことが示された。

### アノイキス関連因子の検討

HSC 細胞における TrkB, caveolin-1, galectin-3 の発現を mRNA レベルで比較した。GAPDH を対象として, 3種類の細胞について半定量的 RT-PCR を行った (Fig. 3)。TrkB は両 HSC 細胞とも, ほとんど発現が見られなかった。さらに, MDA-MB231細胞においても発現は見られなかった。また, galectin-3 もほとんど発現されていなかった。

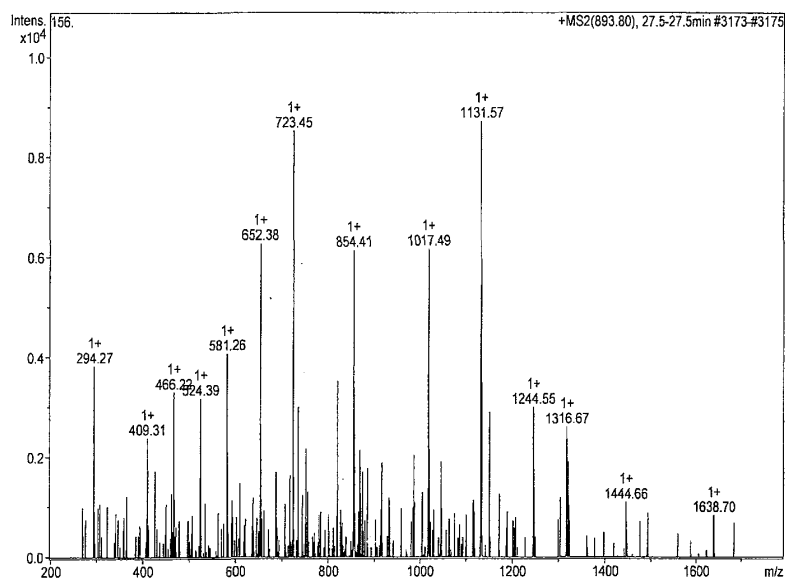


Fig. 5. MS/MS spectrum of a peptide from galectin-1.

Protein of the spot was in-gel digestion with trypsin and then analyzed with LC-MS/MS. The MS/MS data were analyzed by Mascot program using The Swiss-Prot database. MS/MS spectrum of LNLEAINYMAADGDFK peptide was shown with the difference of amino acid.

Caveolin-1 は全ての細胞で発現が認められたものの、各細胞間における有意差は認められなかった。

#### HSC細胞のプロテオーム解析

アノイキス関連因子を検索するため、HSC-2 と HSC-3 細胞の細胞タンパク質を抽出し、プロテオーム解析を行った。二次元電気泳動によりタンパク質を分離したところ、両細胞間で発現量の異なるいくつかのタンパク質スポットが確認された（データを示さず）。このうち、等電点 (pI) 5.0, 分子量15kDa 付近で HSC-2 細胞と比較して HSC-3 細胞で強く発現しているタンパク質を見出した (Fig. 4)。このスポットを切り出しゲル中で消化した。このサンプルを HPLC でペプチドと分離した後、イオントラップ型質量分析計で、各ペプチドのアミノ酸配列を分析した。その一部を Fig. 5 に示す。この分析結果を Mascot プログラム (<http://www.matrixscience.com/>) により解析した結果、このタンパク質は galectin-1 と同定さ

れた。一方、TrkB, caveolin-1 および galectin-3 については、二次元電気泳動上のスポットとしては同定できなかった。

#### Galectin-1 の mRNA レベルでの発現

Galectin-1 の発現量の相異を認めるため、HSC-2 細胞と HSC-3 細胞における mRNA レベルでの発現量を RT-PCR 法により調べた。その結果、二次元電気泳動におけるタンパク質の発現と同様に、HSC-3 細胞および MDA-MB 231 細胞と比べて HSC-2 細胞の発現量は有意に低いことが確認された (Fig. 6)。

また、このことから galectin-1 の発現量は遺伝子レベルで制御を受けていることが示された。

#### ラクトース添加による galectin-1 のアノイキスへの影響

アノイキスは細胞-基質間接着に関わる機構であるため、細胞外もしくは膜上に存在する galectin-1 がこれに関与するのではないかと

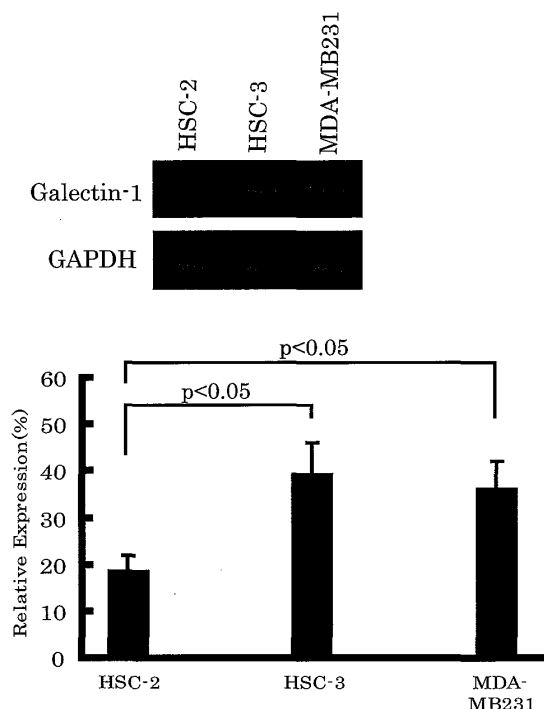


Fig. 6. Expression of galectin-1 genes with RT-PCR.

Cells were cultured on a polystyrene dish. Total RNA was isolated from all cells, and expression levels of galectin-1 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 galectin-1 were 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 two additional experiments (data are means  $\pm$ SD,  $n=3$ ), \*,  $P<0.05$ , from t-test.

考えた。Galectin-1は $\beta$ -ガラクトシド構造をもつラクトースと結合するが、 $\beta$ -ガラクトシド構造をもたないマルトースとは結合しないことが知られている<sup>19)</sup>。そこで、細胞膜上のgalectin-1がアノイキスに関与しているかを検討するために、多くのgalectin-1を発現しているHSC-3細胞を用いて、ラクトースの添加により膜上のgalectin-1を除去した場合での細胞死の割合の変化を調べた。その結果、懸濁培養48時間後の無添加の細胞では、死細胞の

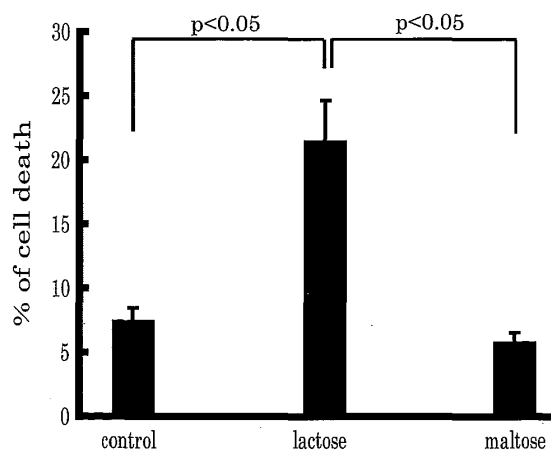


Fig. 7. Effect of lactose on the anoikis of HSC-3 cells.

HSC-3 cells were seeded onto dishes coated with poly-HEMA in a medium containing 50 mM lactose or 50 mM maltose. PBS (-) was added in a control instead of sugar. HSC-3 cells were cultured on poly-HEMA coated dishes for 48 hours. The total proportion of dead cells was determined by trypan blue exclusion.

割合は7.2%であったのに対して、ラクトース添加細胞では21.8%であり、有意な死細胞数の増加を認めた。また、マルトース添加細胞では5.2%であり、無添加の細胞との変化は見られなかった (Fig. 7)。この結果、ラクトースを添加した細胞は、無添加の細胞やマルトース添加細胞と比較して有意に強くアノイキスを生じることがわかった。このことは、HSC-3細胞の細胞膜に結合していたgalectin-1が、添加したラクトースと結合し、細胞膜上から除かれたことにより、アノイキスを生じたものである。

#### Galectin-1のアノイキスへの影響

Galectin-1がHSC細胞のアノイキスに直接的な作用を及ぼすかどうかを調べるために、アノイキス感受性の高いHSC-2細胞に対してgalectin-1タンパク質を培養液中加入して細胞死の割合の変化を調べた。その結果、galectin-1無添加では死細胞の割合が42.3%だったのに対して、0.3 $\mu$ Mのgalectin-1添加では36.8%、1.0 $\mu$ Mのgalectin-1添加では23.4%



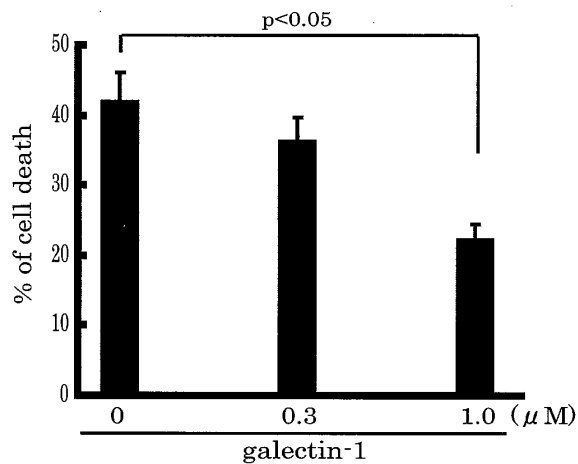


Fig. 8. The Effect of exogenously-added galectin-1 protein on the anoikis of HSC-2 cells.

HSC-2 cells were seeded onto dishes coated with poly-HEMA in a medium containing the indicated concentrations of human recombinant galectin-1. HSC-2 cells were cultured on poly-HEMA coated dishes for 48 hours. The total proportion of dead cells was determined by trypan blue exclusion.

と細胞死の割合は添加した galectin-1 の濃度依存的に有意に減少した (Fig. 8)。このことから, galectin-1 はヒト口腔扁平上皮癌細胞においてアノイクスを抑制する因子であることが示された。

## 考 察

アノイクスは, 上皮細胞に特有な足場依存性のアポトーシスであり, 正常細胞が細胞外マトリックスや細胞-細胞間との物理的な接着を喪失することによって生じる現象である<sup>2)</sup>。しかし, がん化した細胞は浮遊状態でも生存が可能であり, 足場を失い他の臓器に移っても増殖する能力を有する<sup>3)</sup>。そこで本研究では, ヒト口腔扁平上皮癌細胞のアノイクスを制御する因子の検索を目的とした。その結果, galectin-1 がアノイクスを抑制する因子であることが見出された。

懸濁培養下では, HSC-2 細胞は HSC-3 細胞と比較してアノイクスの割合が有意に高かった (Fig. 1)。HSC-3 細胞に関しては, すでにこの

懸濁培養による方法でアポトーシス誘導が検索されている<sup>22)</sup>。懸濁培養した HSC-2 細胞に関してはこれまで知られていないため, TUNEL 染色によりアポトーシスを確認した (Fig. 2)。この結果から HSC-2 細胞が転移能を持たない理由の一つとして, アノイクス感受性が高いことが示唆される。一方, 転移能を有する HSC-3 細胞は何らかの機構によってアノイクスを回避していることが示され, このことが HSC-3 の転移能に関与している可能性がある。また懸濁培養下では, 凝集した細胞塊が見られた。HSC-2 細胞は HSC-3 細胞よりも凝集の割合は多かった。また単独の細胞はほとんど死滅していたが, 凝集塊内部の細胞は生存していた (Fig. 2 A)。HSC-3 細胞において, 細胞-細胞間の相互作用によりアノイクスを回避することが知られている<sup>22)</sup>。HSC-2 細胞ではよりアノイクス感受性が高いため生存するためにより大きな凝集塊を生成したのではないかと考えられる。

これまでにアノイクス関連因子として知られている TrkB<sup>9,13)</sup>, caveolin-1<sup>10)</sup> および galectin-3<sup>11,12)</sup> について, HSC 細胞におけるそれらの m-RNA の発現を RT-PCR 法により調べた (Fig. 3)。今回の実験では, いずれも各細胞間における有意差は得られなかった。従って, HSC-2 および HSC-3 細胞間のアノイクス感受性の相異において, これらの因子のアノイクスへの関与は小さいものと考えられる。また MDA-MB231 細胞については TrkB の発現が認められないとする報告がある<sup>23)</sup>。したがって, galectin-1 の発現量からも, 乳がん由来の MDA-MB231 細胞は, 前立腺がん細胞よりも OSCC である HSC 細胞に類似した性質を持っていることが予想される。

HSC-2 細胞と HSC-3 細胞の細胞タンパク質の発現プロファイルはまだ行われていない。そこで我々は, HSC-2 細胞と HSC-3 細胞の細胞タンパク質を比較した。二次元電気泳動により等電点 (pI) 5.0, 分子量 15kDa 付近で HSC-2 細胞と比較して, HSC-3 細胞で強く発現し

ているタンパク質スポットを見出した (Fig. 4)。このスポットは galectin-1 と同定された (Fig. 5)。Galectin-1 は Swiss-Prot (<http://au.expasy.org>) のデータベースから等電点 (pI) 5.34, 分子量14.6kDa の計算値が得られるが, N末端がアセチル化されていることから実際の pI は酸性側にシフトしていると考えられる。従って, 計算値はほぼスポットの位置と一致した。また LC-MS/MS の解析からも N末端のアミノ酸がアセチル-Ala という結果が得られ, これまでの報告と一致した<sup>24)</sup>。

TrkB, caveolin-1 および galectin-3 については, 二次元電気泳動上で検出はできなかった。この理由として, 通常の二次元電気泳動ではレセプターなどの分子量100kDa 以上の膜タンパク質は, ほとんど検出されないことがあげられる。実際, SwissProt の二次元電気泳動データベースにおいて TrkB についての記載は現在までない。Caveolin-1 は翻訳後修飾を複数箇所受けていることから, 単一のスポットとして検出できなかった可能性が考えられる。Galectin-3 については, 存在量が少ないため, CBB 染色で検出できなかったためと考えられる。

Galectin-1 は, 細胞質と核に局在し, いくつかのシグナルタンパク質と相互作用していることが知られている<sup>17)</sup>。また細胞膜表面にも存在することが示されている<sup>16)</sup>。ここではデータを示さなかったが, HSC-3 細胞においても, 大部分は細胞質に存在していたが, 細胞をラクトースで処理し, galectin-1 を細胞膜から抽出することにより, 細胞膜表面にも存在することが確認された。興味深いことは, galectin-1 のアミノ酸配列において, シグナル配列が存在しないにも関わらず, 細胞外への分泌が見られる点である。この機構については小胞体-ゴルジ装置を介した輸送のシステムではないことが確認されている<sup>25)</sup>。現在のところ, エキソソームによる細胞外への移行の可能性が報告されている<sup>26)</sup>。

細胞膜上に存在する galectin-1 のアノイキ

スに対する作用を調べたところ, ラクトースを添加した細胞は強くアノイキスを生じた。これは, Horiguchi ら<sup>20)</sup>の実験による galectin-1 を発現させた Colo201細胞の細胞接着がラクトース添加により抑制された結果からも, 支持される。また galectin-1 タンパク質を添加した細胞の死細胞率は有意に減少したことから, galectin-1 が HSC 細胞のアノイキスに直接的な作用を及ぼすことが示された。以上の結果から, galectin-1 はヒト口腔扁平上皮癌細胞においてアノイキスを抑制する因子であることが本研究により初めて示された。

これまで galectin-1 は, 細胞のアポトーシス, 細胞接着, 腫瘍の形質転換, 細胞周期の制御, 移動, 炎症など幅広い生体反応現象に関連している因子であることが知られている<sup>16)</sup>。このうち活性型 T 細胞において galectin-1 は, 逆にアポトーシスの誘導に働くことが示されている<sup>27)</sup>。このことから, 同じ因子であっても HSC 細胞では作用機構が異なることが示された。T 細胞における機構については, galectin-1 が CD45 に結合することにより, アポトーシスを起こすことが示されている<sup>27)</sup>。CD45 は赤血球以外のすべての造血細胞で発現が認められており, T 細胞などの細胞の活性化に関与することが知られている<sup>28)</sup>。HSC 細胞においてはこれまでのところ CD45 の発現については調べられていない。CD45 は白血球のマーカータンパク質として用いられており<sup>29)</sup>, HSC 細胞では CD45 の発現量が低いいため, アポトーシスの誘導に至らないのではないかと考えられる。

本研究の, ラクトースおよびリコンビナント galectin-1 の添加実験 (Fig. 7,8) から, galectin-1 が細胞膜上に存在することが, アノイキスの抑制に重要であることが示された。前述したように galectin-1 は糖結合タンパク質であるため, HSC 細胞の細胞膜タンパク質の糖鎖と結合できる。現在までに, 細胞膜タンパク質で galectin-1 と結合するタンパク質としては, インテグリン  $\beta 1$  が知られており, その糖鎖と結合することが知られている<sup>30)</sup>。しかし

ながらインテグリン $\beta 1$ との結合からは、むしろ細胞の成長を抑制すると報告されている<sup>31)</sup>。HSC細胞がアノイクスを回避するためには、まだ未発見の細胞膜タンパク質と結合している可能性が考えられる。HSC細胞において考えられる可能性としては、他のインテグリンあるいは増殖因子などの糖鎖と強く結合しているのではないかと思われる。これらの分子とより強く結合することにより、生存シグナルであるPI3キナーゼ-Aktシグナルが活性化されてアポトーシスを抑制するのではないかと思われる。

一方、Galectin-1の大部分が存在する細胞内における機能については、現在のところシグナル伝達分子であるRasなどと相互作用することが知られているが<sup>32)</sup>、まだ全体の機能の解明には至っていないのが現状である。

## 結 論

本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の転移能を持つHSC-3細胞と、転移能を持たないHSC-2細胞を用いて、口腔扁平上皮癌細胞のアノイクスに関わる因子の探索を試みた。

1、転移能を持たないHSC-2細胞は、転移能を持つHSC-3細胞と比較して、アノイクスのレベルが有意に高いことがわかった。

2、アノイクス関連因子として、HSC-2細胞と比較してHSC-3細胞で強く発現しているタンパク質としてgalectin-1を見出した。

3、ラクトースによるgalectin-1の細胞膜結合阻害により、HSC-3細胞は強くアノイクスを生じた。

4、Galectin-1タンパク質をHSC-2細胞の培養液に添加したことにより、アノイクスのレベルは濃度依存的に減少した。

以上の結果から、galectin-1が口腔扁平上皮癌細胞において、アノイクスを抑制する因子であることが示された。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたりご教示いただきました本学口腔生化学講座の皆様へ感謝の意を表しま

す。

本論文の一部は第48回歯科基礎医学会学術大会（平成18年9月22日、横浜）および第43回口腔組織培養学会学術大会（平成18年11月11日、大阪）において発表した。

なお、本研究の一部は文部科学省ハイテク・リサーチ・センター事業（2005-2009）およびオープン・リサーチ・センター事業（2007-2011）補助金ならびに文部科学省科学研究費基盤研究（C）No.18592044による研究助成金を受けて行われた。

## 参 考 文 献

1) 玉田昌子：インテグリンシグナルとSrcファミリー蛋白質，蛋白質核酸酵素，51：616-622，2006。

2) Ishida, H., Wada, K., Masuda, T., Okura, M., Kohama, K., Sano, Y., Nakajima, A., Kogo, M., and Kamisaki, Y. : Critical role of estrogen receptor on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 98 : 636-643, 2007.

3) Geiger, T.R. and Peeper, D.S. : Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 67 : 6221-6229, 2007.

4) Birchall, M., Winterford, C., Tripconi, L., Gobe, G., and Harmon, B. : Apoptosis and mitosis in oral and oropharyngeal epithelia ; evidence for a topographical switch in pre-malignant lesions. *Cell Prolif.* 29 : 447-456, 1996.

5) Haake, A.R. and Polakowska, R.R. : Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J. Invest Dermatol* 101 : 107-112, 1993.

6) Momose, F., Araida, T., Negishi, A., Ichijo, H., Shioda, S., and Sasaki, S. : Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* 18: 391-395, 1989.

- 7) Kudo, Y., Kitajima, S., Sato, S., Miyauchi, M., Ogawa, I., and Takata, T. : Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line with high invasive and p27 degradation activities from a lymph node metastasis. *Oral Oncol.* 39: 515-520, 2003.
- 8) Koike, H., Uzawa, K., Nakashima, D., Shimada, K., Kato, Y., Higo, M., Kouzu, Y., Endo, Y., Kasamatsu, A., and Tanzawa, H. : Identification of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma using a global proteomic approach. *Int. J. Oncol.* 27 : 59-67, 2005.
- 9) Geiger, T.R. and Peeper, D.S. : The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis : a perspective. *Cancer Res.* 65 : 7033-7036, 2005.
- 10) Duxbury, M.S., Ito, H., Ashley, S.W., and Whanq, E.E., : CEACAM 6 cross-linking induces caveolin-1-dependent, Src-mediated focal adhesion kinase phosphorylation in BxPC 3 pancreatic adenocarcinoma cells. *J. Biol.Chem.* 279 : 23176-23182, 2004.
- 11) Plzak, J., Betka, J., Smetana, K. Jr., Chovanec, M., Kaltner, H., Andre, S., Kodet, R., and Gabius, H. J. : Galectin-3 an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur. J. Cancer* 40 : 2324-2330, 2004.
- 12) Piantelli, M., Iacobelli, S., Almadori, G., Iezzi, M., Tinari, N., Natoli, C., Cadoni, G., Lauriola, L., and Ranelletti, F.O. : Lack of expression of galectin-3 is associated with a poor outcome in node-negative patients with laryngeal squamous-cell carcinoma. *J. clin. Oncol.* 20 : 3850-3856, 2002.
- 13) Douma, S., Van, Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van, Garderen, E., and Peeper, D.S.: Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 430 : 1034-1039, 2004.
- 14) Janes, S. M. and Watt, F. M. : Switch from  $\alpha V\beta 5$  to  $\alpha V\beta 6$  integrin expression protects squamous cell carcinomas from anoikis. *J. Cell Biol.* 166 : 419-431, 2004.
- 15) Janes, S. M. and Watt, F.M. : New roles for integrins in squamous cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer* 6 : 175-183, 2006.
- 16) Camby, I., Mercier, M.L., Lefranc, F., and Kiss, R.: Galectin-1 : a small protein with major functions. *Glycobiology* 16 : 137R-157R, 2006.
- 17) Robinovich, G.A.: Galectin-1 as a potential cancer target. *Br. J. Cancer* 92 : 1188-1192, 2005.
- 18) Yang, R. Y., and Liu, F. T.: Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.* 60 : 267-276, 2003.
- 19) Goldstone, S.D. and Lavin, M. F.: Isolation of a cDNA clone, encoding a human  $\beta$ -galactoside-binding protein, overexpressed during Glucocorticoid-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 178 : 746-750, 1991.
- 20) Horiguchi, N., Arimoto, K., Mizutani, A., Endo-Ichikawa, Y., Nakada, H. and Taketani, S.: Galectin-1 induces cell adhesion to the extracellular matrix and apoptosis of non-adherent human colon cancer Colo201 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 134 : 869-874, 2003.
- 21) 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.
- 22) Zhang, Y., Lu, H., Dazin, P., and Kapila, Y. : Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53-mediated Anoikis. *J. Biol. Chem.* 279 : 48342-48349, 2004.
- 23) Descamps, S., Toillon, R.A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Le, Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J. P., and Hondermarck, H. : Nerve growth factor stim-

- ulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 276 : 17864-17870, 2001.
- 24) Gevaert, K., Goethals, M., Martens, L., Van Damme, J., Sraes, A., Thomas, G.R., and Vandekerckhove, J. : Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat. Biotechnol.* 21 : 566-569, 2003.
- 25) 中村隆範, 西 望 : ガレクチンの標的分子を捜せ, *生化学* 77 : 1509-1513, 2005.
- 26) van Niel G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., and Raposo, G. : Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem. (Tokyo)* 140 : 13-21, Review 2006.
- 27) Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., and Baum, L.G. : Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378 : 736-739, 1995.
- 28) Dahlke, M.H., Larsen, S.R., Rasko, J.E., and Schlitt, H.J. : The biology of CD45 and its use as a therapeutic target. *Leuk Lymph.* 45: 229-236, 2004.
- 29) Abdalla, S.I., Sanderson, I.R., and Fitzgerald, R.C. : Effect of inflammation on cyclooxygenase (COX) - 2 expression in benign and malignant oesophageal cells. *Carcinogenesis* 26 : 1627-1633, 2005.
- 30) Moiseeva, E.P., Williams, B., Goodall, A. H., and Samani, N.J. : Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 : 1010-1016, 2003.
- 31) Fischer, C., Sanchez-Ruderisch, H., Welzel, M., Wiedenmann, B., Sakai, T., Andre, S., Gabius, H.J., Khachiqian, L., Detjen, K. M., and Rosewicz, S. : Galectin-1 interacts with the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J.Biol.Chem.* 280 : 37266-37277, 2005.
- 32) Rotblat, B., Niv, H., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H.J., and Kloog, Y. : Galectin-1 (L11 A) predicted from a computed galectin-1 farnesyl-binding pocket selectively inhibits Ras-GTP. *Cancer Res.* 64 : 3112-3118, 2004.