

学位論文

口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における  
Human Double Minute 2 (HDM2) の機能解析

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

医歯薬学専攻

学位申請者 津島康司

平成 29 年

学位論文

口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における  
Human Double Minute 2 (HDM2) の機能解析

学位申請者 津島康司

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

医歯薬学専攻

(主任：岡本哲治教授)

平成 29 年

## 謝辞

本研究に際し、御懇篤なるご指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科分子口腔医学・顎顔面外科学 岡本哲治教授に深厚なる謝辞を表します。また、本論文作成上、御指導を賜りました本学歯周病態学 栗原英見教授ならびに細胞分子薬理学 兼松隆教授に深謝いたします。また、本論文の御審査を賜りました国際歯科医学・分子腫瘍学 藤井万紀子教授、歯科放射線学 柿本直也教授ならびに分子口腔医学・顎顔面外科学 虎谷茂昭准教授に深謝いたします。

尚、本研究を進めるに際し、終始御懇切なる御指導と御配慮を賜りました、広島大学病院 顎・口腔外科 講師 林堂安貴博士に心から感謝の意を表します。さらに、多大なる御支援、御協力を頂きました分子口腔医学・顎顔面外科学准教授 虎谷茂昭博士をはじめ教室員各位に感謝致します。

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 材料および方法	2
第1節 細胞培養法	2
1) 細胞培養液	
2) 細胞株と培養方法	
第2節 HDM2 が口腔扁平上皮癌細胞の浸潤増殖に与える影響	3
1) 細胞からの total RNA の抽出	
2) HDM2 高発現口腔扁平上皮癌細胞株の作製	
(1) HDM2 発現ベクターの構築	
(2) 口腔扁平上皮癌細胞株 SCCKN への HDM2 遺伝子導入	
3) Western Blot 法による HDM2 蛋白発現の検討	
4) 口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖能の判定	
5) 口腔扁平上皮癌細胞の運動能の検討	
6) ザイモグラフィー	
7) コラーゲンゲル内培養法	
第3節 HDM2 が口腔扁平上皮癌細胞の EMT 関連分子発現に与える影響についての検討	7
1) 口腔扁平上皮癌細胞における EMT 関連分子蛋白発現の検討	
2) 口腔扁平上皮癌細胞における EMT 関連分子遺伝子発現の検討	
3) E-cadherin 蛋白発現に対するプロテアソーム阻害剤の影響についての検討	



4) 共免疫沈降法による HDM2 と E-cadherin の複合体形成についての検討

5)  $\beta$ -catenin 蛋白の細胞内での局在の検討

第4節 口腔扁平上皮癌組織における HDM2 発現と臨床病理学的因子との相関

9

1) 対象患者

2) 免疫組織染色

3) 統計学的解析

第3章 結果 12

第4章 考察 16

第5章 総括 19

参考文献 20

図表 26

## 略語表

HDM2: human double minute 2

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

SCC: squamous cell carcinoma

CS: calf serum

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

CMF-PBS: Dulbecco's Calcium Magnesium free phosphate buffer saline

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

E.coli: Escherichia coli

LB 培地: Lysogeny Broth medium

SDS: sodium dodecyl sulfate

BPB: bromophenol blue

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis

PVDF: polyvinylidene fluoride

HRP: horse radish peroxidase

IgG: immunoglobulin G

BSA: bovine serum albumin

EMT: epithelial-mesenchymal transition

ddPCR: droplet digital polymerase chain reaction

## 第1章 緒言

Human Double Minute-2 (HDM2) は、491 のアミノ酸から成る分子量約 90,000 のタンパク質で、がん抑制遺伝子である p53 のユビキチンリガーゼ (E3) として、p53 の N 末端側にある転写活性ドメインと結合し、p53 をユビキチン化しプロテアソームでの分解を調節していることが明らかにされている<sup>1-3)</sup>。そのため HDM2 は、p53 によって誘導されるがん細胞のアポトーシスを抑制することで、がん細胞の生存や増殖を促進することが知られている<sup>4,5)</sup>。また、免疫組織学的検討によって、HDM2 が種々の悪性腫瘍において高発現し、予後不良因子であることも報告されている<sup>6,7)</sup>。

HDM2 は p53 以外にも数多くのタンパク質と結合し、基質となることも知られており<sup>8-10)</sup>、p53 を介したアポトーシス機構の抑制以外にも、細胞の癌化や悪性腫瘍の増殖や進展に対しても、何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されている<sup>11-13)</sup>。著者の所属する研究室での先行研究において、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能にインテグリン $\beta 8$  が深く関与し、さらにインテグリン $\beta 8$  は HDM2 と複合体を形成することを明らかにしている<sup>14)</sup>。したがって、口腔扁平上皮癌での HDM2 発現や、増殖、浸潤および予後における HDM2 の役割について明らかにすることは、口腔扁平上皮癌の新しい診断・治療法の開発において重要である。

本研究では、口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における HDM2 の機能を明らかにするため、遺伝子導入による HDM2 発現亢進が、口腔扁平上皮癌細胞の増殖能、運動能および蛋白分解活性に与える影響について検討した。さらに、広島大学病院顎・口腔外科にて外科的治療を中心に加療した口腔扁平上皮癌の未治療試験切除組織における HDM2 の発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理的因子、TNM 分類、Stage 分類および生存率との関連性について解析した。

## 第2章 材料および方法

### 第1節 細胞培養法

#### 1) 細胞培養液

RPMI1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)<sup>15)</sup> と Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich)<sup>16)</sup> を 1:1 に混合した培地を Milli-Q 水 (Direct-Q® 3 UV; Millipore, Billerica, MA, USA) に溶解し, 90mg/L ペニシリン G ナトリウム (明治製菓, 京都), 90mg/L カナマイシン (明治製菓), 110mg/L ビルビン酸ナトリウム (和光純薬, 大阪), 15mM N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES; 同仁化学, 熊本) および 2.0g/L 重炭酸ナトリウム (和光純薬) を添加後 pH7.4 に調整し, メンブレンフィルター (孔径 0.2 $\mu$ m, Acrocap; Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA) で濾過滅菌し, RD 基礎栄養培地とした<sup>17)</sup>.

#### 2) 細胞株と培養方法

口腔扁平上皮癌細胞株 SCCKN<sup>18-22)</sup>を用いた. SCCKN 細胞は 5% 仔牛血清 (CS ; HyClone, Logan, UT, USA) を含む RD 基礎栄養培地を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 気相下で培養した. 継代培養は細胞が増殖飽和状態になった時点で行った. すなわち, 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich) と 0.04% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA ; 同仁化学) を含む Dulbecco's Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>-free phosphate-buffer saline (CMF-PBS) で細胞分散後, 5% CS を含む RD 基礎栄養培地にて洗浄し, 5% CS を含む RD 基礎栄養培地に浮遊させたものを 60mm 径培養皿 (Corning, NY, USA) に加え継代培養を行った.

## 第2節 HDM2 が口腔扁平上皮癌細胞の浸潤増殖に与える影響

### 1) 細胞からの total RNA の抽出

各細胞の total RNA は TRIzol® Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) を用いて抽出した. 各細胞を TRIzol® Reagent にて溶解し, TRIzol® Reagent の 1/5 量のクロロホルム (和光純薬) を加え混和した. 室温にて 3 分静置後, 4°C で 12,000×g, 15 分間遠心した. 回収した上層に TRIzol® Reagent と等量のイソプロパノール (和光純薬) を加え, 室温にて 10 分静置後, 4°C で 12,000×g, 10 分間遠心することにより RNA を沈殿させた. 沈殿した RNA を 75% エタノールで洗浄後, nuclease-free water (Sigma-Aldrich) に溶解し, 分光光度計 (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, エル・エム・エス, 東京) にて total RNA 量を定量した.

### 2) HDM2 発現口腔扁平上皮癌細胞株の作製

#### (1) HDM2 発現ベクターの構築

HDM2 遺伝子の cDNA の open reading frame 内に設計した以下のプライマー対を用いて RT-PCR 法を行った. すなわち, SCCKN の total RNA から合成された cDNA を鋳型として, 制限酵素 *EcoR* I 認識配列 (一重下線) および Kozac 配列 (二重下線) を付加したセンスプライマー: 5' - GGAATTCGCCACCATGTGCAATACCAACATGTCT GTACC -3' と *Not* I 認識配列 (一重下線) を付加したアンチセンスプライマー: 5' - ATAAGAATGCGGCCGCCTAGGGGAAATAAGTTAGCACAATC -3' を用い, 94°C, 2 分処理後, 変性反応 98°C, 10 秒, アニーリング 57°C, 30 秒, 伸長反応 68°C, 1 分 30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクルの反応を行った. 続いて, PCR 増幅産物と哺乳動物発現ベクター pCI-neo (Promega, Madison, WI, USA) を制限酵素 *EcoR* I と *Not* I (以上, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) で処理後, DNA

Ligation Kit Ver.2 Solution (タカラバイオ, 滋賀) で 16°C, 8 時間リガーゼ反応を行った. これを E. coli JM109 株に形質転換した後, 100µg/ml アンピシリン (和光純薬) 添加 LB 培地 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) でアンピシリン耐性の形質転換株を選択し, プラスミドを調節した. pCI-neo に組み込まれた HDM2 遺伝子の塩基配列を CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて確認し, HDM2 遺伝子が組み込まれたプラスミドを pCI-neo/HDM2 として実験に用いた (図 1).

## (2) pCI-neo/HDM2 の口腔扁平上皮癌細胞株 SCCN への遺伝子導入

SCCN にリポフェクション法<sup>23, 24)</sup>にて遺伝子導入を行った. すなわち  $1 \times 10^6$  個の SCCN を 60mm 径培養皿 (Corning) で 24 時間培養後, 培養液を除去し, 5µg の pCI-neo/HDM2 と 15µl の TransFast™ Regent (Promega) を添加した RD 基礎栄養培地 2ml を加え, 37°C, 1 時間反応した. その後, 10% CS を含む RD 基礎栄養培地 4ml を加え 48 時間培養後, 継代し, 5% CS および最終濃度 600µg/ml の G418 (GENETICIN; GIBCO BRL) を含む RD 基礎栄養培地で培養し, G418 耐性細胞を分離した. SCCN に pCI-neo/HDM2 が導入された細胞を, それぞれ HDM2 発現口腔扁平上皮癌細胞株 KN-HDM2-1 および KN-HDM2-2 として実験に用いた.

## 3) Western Blot 法による HDM2 蛋白発現の検討

増殖飽和状態の各細胞を CMF-PBS にて 3 回洗浄後, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) を添加した cell lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% TritonX-100) を加え, 超音波発生機 (株式会社トミー精工, 東京) を用いて超音波破碎処理を行った後, 4°C,  $15,000 \times g$ , 15 分間遠心し, 得られた上清を細胞溶解液として用いた. 細胞溶解液を  $5 \times$

sample buffer (625mM Tris-HCl, pH6.8, 10mM EDTA, 15% SDS, 50% Glycerin, 0.1% BPB) で調整し、還元下で 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に Electrotransfer 法にて転写した。転写メンブレンを 5% スキムミルクおよび 0.1% Tween20 を含む 0.1M Tris-HCl (pH7.4) で室温下 1 時間ブロッキング後、500 倍希釈マウス抗 HDM2 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と室温下で 1 時間反応させた。なお、対照として、1000 倍希釈ウサギ抗ヒト  $\beta$ -actin ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いた。続いて、メンブレンを 0.1% Tween20 を含む 0.1M Tris-HCl (pH7.4) で洗浄後、HDM2 発現の検出には、1000 倍希釈 HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用い、 $\beta$ -actin の検出には 1000 倍希釈 HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いて、それぞれ 1 時間反応させた。検出には、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories) を用いた。

#### 4) 口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖能の検討

$5 \times 10^3$  個の各細胞を 16mm 径培養皿 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に加え、5% CS を含む RD 基礎栄養培地で 5 日間培養し、細胞数をコールターカウンター Z (Beckman Coulter) を用いて計測することにより、各細胞の増殖数を比較検討した。

#### 5) 口腔扁平上皮癌細胞の運動能の検討

ポアサイズ  $8\mu\text{m}$  のケモタキセル (倉敷紡績, 大阪) を用いた Boyden Chamber の変法にて運動能を検討した<sup>25)</sup>。メンブレン両面を  $100\mu\text{g/ml}$  のゼラチンで  $37^\circ\text{C}$ ,

8 時間反応させコートしたケモタキセルを 24 穴マルチプレート (Becton Dickinson and Company) の各ウェルに設置し、 $5 \times 10^5$  個の各細胞を浮遊させた 400 $\mu$ l の 0.1% BSA を含む RD 基礎栄養培地をケモタキセルの上室に加え、下室には 1ml の 0.1% BSA を含む RD 基礎栄養培地を加えた。37°C, 24 時間培養後、メンブレンをディフクイック (シスメックス, 神戸) で固定・染色した。1つのケモタキセルあたり無作為に 5 視野 (1 視野=0.42mm<sup>2</sup>) を選び、メンブレン下面の細胞数を顕微鏡下 (倍率: 200 倍) で算定し、1mm<sup>2</sup> あたりの遊走細胞数を算出した。

#### 6) ザイモグラフィー

SCCKN のプラスミノージェンアクチベーター産生能を Roche らの方法<sup>26)</sup>に準じたカゼインを基質とするザイモグラフィーにて検索した。増殖飽和状態の各細胞を 0.1% BSA を含む RD 基礎栄養培地で 12 時間培養して得られた上清を、2.5% SDS および 10% Glycerin を含む 0.0625M Tris-HCl (pH6.8) になるように調整し、2% カゼイン (Merck, Datmstadt, Germany) および 10 $\mu$ g/ml のプラスミノージェン (Sigma-Aldrich) を含む 10% SDS-poly acrylamide gel を支持体とし、室温で 30mA の条件で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを 2.5% TritonX-100 溶液で洗浄した。さらに 0.1M NaCl を含む Tris 緩衝液で洗浄し、同緩衝液で 37°C, 6 時間反応させた後、0.25% クマシーブルー R250 (Fluka, Buchs, Switzerland) で染色し、10% 酢酸/30% メタノール溶液で脱色した。

#### 7) コラーゲンゲル内培養法

0.3% I 型希塩酸コラーゲン溶液 (高研, 東京), 5 倍濃度 RD 基礎栄養培地と再構成用緩衝液 (0.05M NaOH, 22mg/ml NaHCO<sub>3</sub>, 0.2M HEPES) を冷却しながらそ



それぞれ 7 : 2 : 1 の比率で混合し、コラーゲン混合液を作製した。16mm 径培養皿 (Becton Dickinson and Company) に 500 $\mu$ l のコラーゲン混合液を加え、37°C でゲル化させ base layer とした。base layer 上に  $2.5 \times 10^4$  個の細胞を浮遊させた 500 $\mu$ l のコラーゲン混合液を加え、37°C でゲル化させ top layer とした。ゲル上に 5% CS を含む RD 基礎栄養培地を 1ml 加え、12 日間培養した<sup>27)</sup>。

### 第 3 節 HDM2 が口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal Transition: EMT) 関連分子発現に与える影響についての検討

#### 1) 口腔扁平上皮癌細胞の EMT 関連分子の蛋白発現の検討

第 2 節, 3) の方法に準じて Western Blot を行い、各細胞における E-cadherin, N-cadherin, vimentin, claudin-1,  $\beta$ -catenin および TCF8/ZEB1 発現を検討した。EMT 関連分子に対する 1 次抗体は、いずれも Cell Signaling Technology 社のものを使用した。

#### 2) Droplet Digital PCR (ddPCR) 法による EMT 関連分子の遺伝子発現の検討

各細胞より抽出した total RNA (2 $\mu$ g) を、High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) を用い、サーマルサイクラー (PTC-0220 DNA Engine Dyad<sup>®</sup>; Bio Rad Laboratories) を使用し、25°C, 10 分間 42°C, 60 分間 85°C, 5 分間で逆転写反応を行い、各細胞の cDNA を合成した。続いて、ddPCRsupermix<sup>®</sup> (Bio Rad Laboratories) を用いて各 EMT 関連分子である *E-cadherin*, *N-cadherin*, *claudin-1*, *vimentin* および *GAPDH* に対応するプライマー対 (いずれも Roche Diagnostics, 東京) およびプローブ (Roche Diagnostics) と合成した cDNA を混和させ ddPCR 反応液を作製した後、Droplet Generator オイルと反応させ QX1000<sup>™</sup> Droplet Generator (Bio Rad

Laboratories) を使用し、2 万個の droplet を作製した。その後、サーマルサイクラーを使用し、変性反応 94°C, 30 秒, アニーリング 52°C, 1 分の一連の反応を 1 サイクルとして 40 サイクル行い、PCR 反応を行なった。反応後、QX100 droplet reader (Bio Rad Laboratories) にてポジティブ droplet とネガティブ droplet 数を計測することで、各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。対照として *GAPDH* mRNA 発現量を測定し、*GAPDH* mRNA の発現量に対する、各遺伝子の相対的な mRNA 発現量を求めた。

### 3) E-cadherin 蛋白発現に及ぼすプロテアソーム阻害剤の影響についての検討

KN-HMM2 細胞を各濃度のプロテアソーム阻害剤 MG132 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) を添加した RD 基礎栄養培地で 16 時間培養し、細胞蛋白中の E-cadherin 蛋白の発現を、第 2 節, 3) の方法に準じて Western Blot 法で解析した。

### 4) 共免疫沈降法による HDM2 と E-cadherin の複合体形成についての検討

SCCKN を、10 $\mu$ M MG132 を添加した 5% CS を含む RD 基礎栄養培地を用いて 12 時間培養した後、CMF-PBS にて 3 回洗浄後、Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) を添加した cell lysis buffer を加え、超音波発生機 (株式会社トミー精工) を用いて超音波破碎処理後、4°C, 15,000 $\times$ g, 15 分間遠心し、得られた上清を細胞溶解液として用いた。あらかじめ 4 $\mu$ g の非免疫マウス IgG, 非免疫ウサギ IgG, マウス抗ヒト HDM2 モノクローナル抗体またはウサギ抗ヒト E-cadherin ポリクローナル抗体 (以上, Santa Cruz Biotechnology) を吸着させた Dynabeads® Protein G (Life Technologies Corporation) と SCCKN の細胞溶解液を、室温下で 10 分間振盪しながら反応させた。CMF-PBS にて 3 回洗浄し、

50mM Glycine (pH2.8) を加えて室温下で 2 分間振盪させた後、磁気分離することと Dynabeads® Protein G より溶出した結合蛋白を回収し、1M Tris-HCl にて pH7.5 に調整し標品とした。同標品に対し、ウサギ抗 E-cadherin 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた Western Blot 法を用いて、標品中の HDM2 蛋白の検出を行った。

#### 5) $\beta$ -catenin 蛋白の細胞内での局在の検討

各細胞の細胞画分を、Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて分画した。すなわち、trypsin/EDTA 処理で細胞を分散・回収後、Cytoplasmic Extraction Buffer で 4 °C, 10 分間攪拌、遠心 (500×g) し、上清を細胞質画分として回収した。沈渣に Membrane Extraction Buffer を加え、4 °C, 10 分間攪拌後遠心し (3,000×g), 上清を膜画分として回収した。得られた沈渣に Nuclear Extraction Buffer を加え、4 °C, 30 分間攪拌後遠心し (5,000×g), 上清を可溶性核画分として回収した。さらに沈渣に chromatin-bound extraction buffer を加え、室温下, 15 分反応後、遠心し (16,000×g), 上清をクロマチン結合画分とした。得られた沈渣にさらに Pellet Extraction Buffer を加えて、室温で 10 分間反応後に遠心し、上清を細胞骨格画分とした。上記の方法で得られた各細胞画分中の  $\beta$ -catenin 蛋白を、第 2 節, 3) の方法に準じて Western Blot 法で検討した。

### 第 4 節 口腔扁平上皮癌組織における HDM2 発現と臨床病理学的因子との関連の検討

#### 1) 対象患者

2001 年 1 月から 2013 年 9 月までの間に、本院 顎・口腔外科にて外科的治療を中心に加療した口腔扁平上皮癌 210 例の未治療試験切除標本のうち、免疫組織学的検討が可能であった 86 例を対象とした。男性 52 名、女性 34 名で平均年齢は 66 才であった。部位別では、口底癌 9 例、上顎歯肉癌 13 例、下顎歯肉癌 34 例、頬粘膜癌 3 例、舌癌 27 例で、TNM 分類では、T1 9 例、T2 35 例、T3 15 例、T4 27 例であった。頸部リンパ節転移は、86 例中 39 例にみられた。組織学的分類では、高分化型 45 例、中等度分化型 35 例、低分化型 6 例であった。また、18 例に原病死が認められた。なお遠隔転移症例はなかった(表 1)。

## 2) 免疫組織染色

10% ホルマリン固定パラフィン包埋標本より 5 $\mu$ m の切片を作製し、キシレンおよびエタノールにて脱パラフィンを行った後、抗原の賦活化のため、pH4.0 の 10mM クエン酸液を用いて、99℃で 15 分間処理後、内因性ペルオキシダーゼのブロックを、0.3% 過酸化水素添加メタノールを用いて室温下、遮光下で 10 分間行った。CMF-PBS で洗浄後、10% BSA でブロッキングし、マウス抗 HDM2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) で室温下、60 分間反応させた。二次抗体として、HRP 標識デキストラン結合抗ウサギ IgG 抗体 (EnVision kit, Dako, Glostrup, DK) を用いて室温下、30 分間反応させた。その後、diaminobenzidine (DAB) にて発色を行ない、ヘマトキシリンにて核染色後、脱水、透徹および封入し、検鏡した。染色強度により、①全く染色されなかったもの、②弱染色、③強染色の 3 群にわけ、全く染色されなかったものを陰性、弱染色と強染色を陽性と判定した(図 1 3)。

### 3) 統計学的解析

HDM2 発現と、各臨床病理学的因子との相関は  $\chi^2$  検定で解析した。生存曲線の算出は Kaplan-Meier 法で行い、HDM2 の陰性群と陽性群間の疾患特異的生存率の有意差は、Log-rank 検定で行ない、いずれも危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。すべての統計解析には、R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアである EZR を使用した。

### 第3章 結果

#### 1) SCCKN, KN-mock および KN-HDM2 の HDM2 蛋白発現

HDM2 遺伝子導入口腔扁平上皮癌細胞 KN-HDM2 における HDM2 蛋白の発現を Western Blot 法にて解析した. KN-HDM2 では, SCCKN や KN-mock と比較して HDM2 蛋白発現が亢進していた (図2).

#### 2) HDM2 の発現亢進が口腔扁平上皮癌の細胞増殖に与える影響

$5 \times 10^3$  個の各細胞を 16mm 径培養皿に播種し, 5% CS を含む RD 基礎栄養培地で 6 日間培養した. 培養 6 日後の KN-HDM2 の細胞数は, SCCKN および KN-mock のその約  $1/2 \sim 1/3$  に低下していた (図3).

#### 3) HDM2 の発現亢進が口腔扁平上皮癌細胞の遊走能に与える影響

HDM2 の口腔扁平上皮癌細胞の遊走能に与える影響を, Boyden Chamber の変法にて検討した. KN-HDM2 は, SCCKN や KN-mock に比べ, 細胞遊走能が約 5~8 倍に亢進していた (図4).

#### 4) HDM2 の発現亢進が口腔扁平上皮癌細胞の蛋白分解活性に与える影響

0.1% BSA を含む RD 基礎栄養培地で各細胞を 24 時間培養後の培養上清中のプラスミノゲンアクチベーター活性を, プラスミノゲンを含むカゼインザイモグラフィーで解析した. KN-HDM2 の培養上清は SCCKN や KN-mock のそれと比較して, 約 55kDa のプラスミノゲン依存性カゼイン分解活性, すなわちウロキナーゼ活性が亢進していた (図5).

#### 5) HDM2 の発現亢進が口腔扁平上皮癌の浸潤増殖に与える影響

KN-HDM2 は、高い細胞遊走能と蛋白分解活性を示したことから、HDM の口腔扁平上皮癌細胞の増殖様式に与える影響を、I 型コラーゲンゲルを用いた 3 次元培養法で検討した。SCCKN と KN-mock は球形の小さなコロニーを形成したのに対し、KN-HDM2 は辺縁不正な拡大したコロニーを形成し、一部では周囲のゲルに侵入するような所見を示した (図 6)。

#### 6) 口腔扁平上皮癌細胞の HDM2 発現亢進と EMT 関連分子発現との関連

KN-HDM2, SCCKN および KN-mock における EMT 関連分子の蛋白発現を Western Blot 法で検討した。KN-HDM2 では、E-cadherin 発現の低下と N-cadherin, vimentin および claudin-1 発現の上昇を認めたが、 $\beta$ -catenin および TCF/ZEB1 の蛋白発現には差は認められなかった (図 7)。

さらに、蛋白発現に変化を認めた E-cadherin, N-cadherin, vimentin および claudin-1 の mRNA 発現を ddPCR 法で解析した結果、KN-HDM2 における *N-cadherin*, *vimentin* および *claudin-1* の mRNA 発現は、蛋白発現と同様に、SCCKN および KN-mock に比べ上昇していた。一方、蛋白発現が低下していた E-cadherin では、その mRNA 発現には変化を認めなかった (図 8)。

#### 7) E-cadherin のプロテアソームでの分解との複合体形成

*E-cadherin* の mRNA 発現には変化がなかったものの、HDM2 発現誘導に伴い E-cadherin 蛋白発現が低下したことから、ユビキチンリガーゼである HDM2 が、E-cadherin 蛋白のプロテアソームでの分解に関与している可能性が考えられた。そこで、扁平上皮癌細胞での E-cadherin 蛋白分解におけるユビキチン/プロテアソーム系の関与について明らかにするため、各濃度のプロテアソーム阻害剤

MG132 で 12 時間処理した SCCKN における E-cadherin 蛋白の発現を，Western Blot 法にて解析した．その結果，MG132 は，濃度依存性に SCCKN の E-cadherin 蛋白発現を上昇させることが明らかとなった（図 9）．

#### 8) 共免疫沈降法による E-cadherin と HDM2 の複合体形成についての検討

E-cadherin と HDM2 の複合体形成について検討するため，5 $\mu$ M の MG132 で処理した SCCKN の細胞溶解液を，抗 E-cadherin 抗体または抗 HDM2 抗体で免疫沈降した標品に対し，抗 E-cadherin 抗体を用いて Western Blot を行った．その結果，抗 HDM2 抗体で免疫沈降した標品中に E-cadherin が検出され，E-cadherin と HDM2 が複合体形成していることが示された（図 10）．

#### 9) 細胞内での $\beta$ -catenin の局在

E-cadherin の細胞膜上での裏打ち蛋白である $\beta$ -catenin の細胞内での局在を検討するため，各細胞から細胞質画分，膜画分，核画分，クロマチン結合蛋白画分および細胞骨格蛋白画分を分画し，各画分中における $\beta$ -catenin 蛋白の発現を，Western Blot 法で検討した結果，KN-HDM2 では，SCCKN および KN-mock に比べ，核画分中の $\beta$ -catenin 発現の上昇が認められた（図 11，12）．

#### 10) 口腔扁平上皮癌組織における HDM2 発現と臨床病理学的因子との相関

HDM2 の発現は，86 症例中 43 症例に認められた．HDM2 陰性群 43 例と陽性群 43 例の疾患特異的生存率を Kaplan-Meier 法で解析した結果，陰性群と陽性群の 5 年生存率は，それぞれ 95.3% と 62.8% で，p 値は 0.000308 と HDM2 陽性群の疾患特異的生存率は陰性群に比べて有意に低下していた（図 15）．なお HDM2 発現と T 分類，N 分類，Stage 分類のいずれの間にも関連は認められなかった（図



14). また, 性別, 年齢, 発症部位および組織学的分化度とも関連は認められなかった (表2).

## 第4章 考察

本研究では、口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における HDM2 の役割を明らかにするため、遺伝子導入による HDM2 の発現亢進が、口腔扁平上皮癌細胞の増殖や浸潤に与える影響を検討した。さらに口腔扁平上皮癌組織における HDM2 の発現を免疫組織学的に検討し、HDM2 発現と臨床病理的学因子との関連性について統計学的に解析した。

HDM2 遺伝子を導入した KN-HDM2 における細胞増殖能は低下していたが、細胞遊走能や蛋白分解活性は亢進していた。そこで、HDM2 が口腔扁平癌細胞の増殖様式に与える影響を明らかにするために、I 型コラーゲングル内 3 次元培養法を用いて KN-HDM2 の増殖様式を検討した。I 型コラーゲングル内 3 次元培養法は、細胞を生体に近い培養環境で維持でき、またその増殖様式を 3 次元的に観察することが可能であるため、器官発生や組織分化だけではなく、がん浸潤の研究にも広く用いられている<sup>28)</sup>。HDM2 発現亢進により、口腔扁平上皮癌細胞の I 型コラーゲングルへの浸潤・増殖が促進されたことから、HDM2 の発現亢進は、がん細胞の間質基質への浸潤に深く関与していることが考えられた。

がん細胞が浸潤・転移するにはがん細胞間の細胞間接着を減弱させ、高い遊走能を獲得する必要がある<sup>29-31)</sup>。この際、上皮細胞が間葉系細胞様に形質を転換する、いわゆる上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) が生じていることが報告され<sup>32)</sup>、EMT に伴い E-cadherin 発現や細胞極性の低下と、N-cadherin や vimentin の発現が亢進することが知られている<sup>33-36)</sup>。本研究の結果、HDM2 発現亢進により、口腔扁平上皮癌細胞の運動能や蛋白分解活性が亢進し、コラーゲングルへの浸潤が促進されたことから、HDM2 が口腔扁平上皮癌細胞の EMT に関与している可能性が考えられた。そこで、各細胞の EMT 関連分子

の発現を検討したところ、KN-HDM2 では、他の細胞と比較して E-cadherin 蛋白発現の低下と、N-cadherin, vimentin および claudin-1 蛋白発現の上昇を認めたが、 $\beta$ -catenin および TCF/ZEB1 の発現には変化はみられなかった。蛋白発現が上昇した N-cadherin, vimentin および claudin-1 は、その mRNA 発現も上昇していた。一方、蛋白発現が低下した E-cadherin の mRNA 発現には変化がなかった。これらの結果から、ユビキチンリガーゼである HDM2 が、E-cadherin 蛋白のプロテアソームでの分解に関与している可能性が考えられた。そこで、プロテアソーム阻害剤である MG132 が、KN-HDM2 の E-cadherin 蛋白発現に与える影響について検討したところ、MG132 処理により、KN-HDM2 の E-cadherin 蛋白発現が上昇することが明らかとなった。この結果から、口腔扁平上皮癌細胞においては、E-cadherin はプロテアソーム分解を受けていることが示唆された。さらに、共免疫沈降法による検討で、HDM2 と E-cadherin の複合体生成が認められたことから、HDM2 は E-cadherin のユビキチン化を調節し、プロテアソームでの分解に関与している可能性が考えられた。

HDM2 発現亢進に伴い E-cadherin 蛋白発現は低下したが、E-cadherin の細胞膜上での裏打ち蛋白である  $\beta$ -catenin 蛋白の発現には変化がみられなかった。 $\beta$ -catenin は、E-cadherin の細胞膜上での裏打ち蛋白であると同時に、細胞質から核内移行することによって Wnt シグナル系を調節していることが知られている<sup>37-39)</sup>。そこで、 $\beta$ -catenin の細胞内局在を明らかにするために、各細胞から細胞質画分、膜画分、可溶性核画分、クロマチン結合画分および細胞骨格画分を分画し、各画分中の  $\beta$ -catenin 蛋白の発現を、Western Blot 法で検討した。KN-HDM2 では、SCCKN および KN-mock に比べ、核画分中の  $\beta$ -catenin の発現上昇を認めた。HDM2 発現亢進に伴い  $\beta$ -catenin の核内移行が促進されていることが示さ

れたことから、HDM2 は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル系ともクロストークしていることが強く考えられた。

口腔扁平上皮癌細胞株を用いた研究結果より、HDM2 は細胞運動能と蛋白分解活性を促進し、コラーゲンゲルへの浸潤能を亢進させることを明らかにした。そこで、口腔扁平上皮癌組織における HDM2 の役割を明らかにするために、広島大学病院 顎・口腔外科にて加療した口腔扁平上皮癌の治療開始前の試験切除組織における HDM2 発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理的因子、TNM 分類、Stage 分類および生存率との関連性について病理組織学的および統計学的に検討した。

口腔扁平上皮癌における HDM2 発現と、T 分類、N 分類、Stage 分類、および組織学的分化度との間にはいずれも相関性は認められなかった。しかし、HDM2 陰性群の 5 年生存率は 95.3% と非常に高い値を示したが、HDM2 陽性群の生存率は 62.8% と著しく低下していた。このように、HDM2 陽性群の生存率が有意に低下していたことから、HDM2 は口腔扁平上皮癌の有用な予後予測因子であることが明らかとなった。

以上の結果から、HDM2 は扁平上皮癌細胞の運動能と蛋白分解活性を促進し、浸潤を亢進させていることが示された。また、HDM2 の発現亢進に伴い  $\beta$ -catenin の核移行の亢進を示唆する所見が認められたことから、HDM2 は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル系ともクロストークすることで、EMT 関連分子の発現を調節し、扁平上皮癌細胞の運動・浸潤に深く関与していることが考えられた。また、口腔扁平上皮癌組織での HDM2 発現は、口腔癌患者の生存率と大きく関わっていることが明らかとなったことから、口腔扁平上皮癌の予後予測因子、さらには新たな診断・治療の分子標的としての有用性が考えられた。

## 第5章 総括

口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における HDM2 の機能を明らかにするため、遺伝子導入による HDM2 発現亢進が、口腔扁平上皮癌細胞の増殖能、運動能および蛋白分解活性に与える影響について検討した。さらに、広島大学病院 顎・口腔外科にて外科的治療を中心に加療した口腔扁平上皮癌の未治療試験切除組織における HDM2 の発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理的因子、TNM 分類、Stage 分類および生存率との関連性について解析し、以下の結果を得た。

1. HDM2 は扁平上皮癌細胞の運動能と蛋白分解活性を促進し、I 型コラーゲンゲルへの浸潤を亢進させた。
2. HDM2 発現亢進に伴い、E-cadherin 蛋白の発現は低下したが、mRNA 発現に変化は認めなかった。N-cadherin と vimentin 蛋白の発現および mRNA 発現は上昇した。
3. E-cadherin はプロテアソームでの分解を受け、HDM2 と複合体を形成していた。
4. HDM2 発現亢進に伴い、 $\beta$ -catenin の核移行が亢進していた。
5. 口腔扁平上皮癌組織での HDM2 発現は、TNM 分類や stage 分類との関連性は認められなかったが、HDM2 陽性群の疾患特異的生存率は、陰性群のそれと比較して有意に低下していた。

## 参考文献

1. Cahilly-Snyder, L., Yang-Feng, T., Francke, U., George, D. L. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 13: 235-244, 1987.
2. Fakharzadeh, S. S., Rosenblum-Vos, L., Murphy, M., Hoffman, E. K., George, D. L. Structure and organization of amplified DNA on double minutes containing the mdm2 oncogene. *Genomics* 15: 283-290, 1993.
3. Mendoza, M., Mandani, G., Momand, J. The MDM2 gene family. *Biomol Concepts* 5: 9-19, 2014.
4. Daujat, S., Neel H., Piette, J. MDM2: life without p53. *Trends Genet* 17: 459-464, 2001.
5. Meek, D. W., Knippschild, U. Posttranslation modification of MDM2. *Mol Cancer Res* 1: 1017-1026, 2003.
6. Ye, Y., Li, X., Yang, J., Miao, S., Wang, S., Chen, Y., Xia, X., Wu, X., Zhang, J., Zhou, Y., He, S., Tan, Y., Qiang, F., Li, G., Roe, O, D., Zhou, J. MDM2 is a useful prognostic biomarker for resectable gastric cancer. *Cancer Sci* 104: 590-598, 2013.
7. Inomistova, M, V., Svergun, N, M., Khranovska, N, M., Skachova, O, V., Gorbach, O, I., Klymnyuk, G, I. Prognostic significance of MDM2 gene expression in childhood neuroblastoma. *Exp Oncol* 37: 111-115, 2015.
8. Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., Vousden, K. H. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3: 577-587, 2003.

9. Kurku, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T. M., Ojala, P. M., Meek, D., Laiho, M. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 5: 465-475, 2004.
10. Lau, L. M. S., Nugent, J. K., Zhao, X., Irwin, M. S. HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. *Oncogene* 27: 997-1003, 2008.
11. Forslund, A., Zeng, Z., Qin, L. X., Rosenberg, S., Ndubuisi, M., Pincas, H., Gerald, W., Notterman, D. A., Barany, F., Paty, P. B. MDM2 gene amplification is correlated to tumor progression but not to the presence of SNP309 or TP53 mutational status in primary colorectal cancers. *Mol Cancer Res* 6: 205-211, 2008.
12. Huang, C. Role of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr* 4: 10-18, 2010.
13. Araki, S., Eitel, J. A., Batuello, C. N., Bijangi-Vishehsaraei, K., Xie, X. J., Danielpour, D., Pollok, K. E., Boothman, D. A., Mayo, L. D. TGF-beta1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. *J Clin Invest* 120: 290-302, 2010.
14. 藤井 隆彦, 林堂 安貴, 坂上 泰士: インテグリン $\beta$ 8 におけるユビキチンリガーゼ human double minute 2 (hdm2) 結合部位の探索. 口腔組織培養学会誌 Vol.22 No.1, 36-37 頁, 2013.
15. Moore, G.E., Gerner, R. E., Franklin, H. A. Culture of normal human leukocytes. *JAMA* 199: 519-524, 1967.
16. Dulbecco, R. and Freeman, G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: 396-397, 1959.
17. Sato, J. D., Kawamoto, T., Okamoto, T. Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8. 653mouse myeloma cells for growth in vitro. *J Exp Med* 165: 1761-1766, 1987.

18. Urade, M., Ogura, T., Mima, T., Matsuya, T. Establishment of human squamous carcinoma cell lines highly and minimally sensitive to bleomycin and analysis of factors involved in the sensitivity. *Cancer* 69: 2589–2597, 1992.
19. Urade, M., Ogura, T., Uematsu, T., Takahashi, Y., Kishimoto, H., Yoshioka, W. Induction of bleomycin resistance in a human oral squamous carcinoma cell line and characterisation of bleomycin-resistant and -sensitive clones. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 30B: 409–414, 1994.
20. Hayashido, Y., Hamana, T., Ishida, Y., Shintani, T., Koizumi, K., Okamoto, T. Induction of alpha2-antiplasmin inhibits E-cadherin processing mediated by the plasminogen activator/plasmin system, leading to suppression of progression of oral squamous cell carcinoma via upregulation of cell-cell adhesion. *Oncol Rep* 17: 417–423, 2007.
21. Maemoto, S., Yumoto, M., Ibata, M., Torizuka, S., Ozawa, N., Tatsumi, M., Hashido, M., Morikawa, M., Maeda, G., Imai, K. Mutational analysis of HRAS and Kras genes in oral carcinoma cell lines. *Odontology* 100: 149–155, 2012.
22. Yazama, H., Kitatani, K., Fujiwara, K., Kato, M., Hashimoto-Nishimura, M., Kawamoto, K., Hasegawa, K., Kitano, H., Bielawska, A., Bielawski, J., Okazaki, T. Dietary glucosylceramides suppress tumor growth in a mouse xenograft model of head and neck squamous cell carcinoma by the inhibition of angiogenesis through an increase in ceramide. *Int J Clin Oncol* 20: 438–446, 2015.
23. Mars, T., Strazisar, M., Mis, K., Kotnik, N., Pegan, K., Logk, J., Grubic, Z., Pavlin, M. Electrotransfection and lipofection show comparable efficiency for in vitro gene delivery of primary human myoblasts. *J Membr Biol* 248: 273–283, 2014.
24. Zhang, X. S., Huang, J., Zhan, C. Q., Chen, J., Li, T., Kaya, A. D., Wu, S. X., Xiao, L. Different Influences of Lipofection and



Electrotransfection on Invitro Gene Delivery to Primary Cultured Cortex Neurons. *Pain Physician* 19: 189–196, 2016.

25. Hayashido, Y. Hamana, T., Yoshioka, Y., Kitano, H., Koizumi, K., Okamoto, T. Plasminogen activator/plasmin system suppresses cell-cell adhesion of oral squamous cell carcinoma cells via proteolysis of E-cadherin. *Int J Oncol* 27: 693–698, 2005.
26. Roche, P. C., Campeau, J. D., Shaw, S. T., Jr. Comparative electrophoretic analysis of human and porcine plasminogen activators in SDS-polyacrylamide gels containing plasminogen and casein. *Biochim Biophys Acta* 745: 82–89, 1983.
27. Myoken, Y., Okamoto, T., Osaki, T., Yabumoto, M., Sato, G. H., Takada, K., Sato, J. D. An alternative method for the isolation of NS-1 hybridomas Using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells. *In Vitro Cell Biol* 25: 477–480, 1989.
28. Hayashido, Y., Kitano, H., Sakaue, T., Fujii, T., Suematsu, M., Sakurai, S., Okamoto, T. Overexpression of integrin  $\alpha_v$  facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin  $\alpha_v\beta_8$  with type I collagen. *Int J Oncol* 45: 1875–1882, 2014.
29. Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M., Abe, O. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 49: 2128–2133, 1989.
30. Shiozaki, H., Tahara, H., Oka, H., Miyata, M., Kobayashi, K., Tamura, S., Iihara, K., Doki, Y., Hirano, S., Takeichi, M. and et al. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancer. *Am J Pathol* 139: 17–23, 1991.
31. Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, Y., Matsuyoshi, N., Hirano, S., Takeichi, M. and et al.

- Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53: 1969-1701, 1993.
32. Takeichi, M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75: 464-474, 1977.
  33. Nakajima, S., Doi, R., Toyoda, E., Tsuji, S., Wada, M., Koizumi, M., Tulaachan, S. S., Ito, D., Kami, K., Mori, T., Kawaguchi, Y., Fujimoto, K., Hosotani, R., Imamura, M. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 4125-4133, 2004.
  34. Chaw, S. Y., Majeed, A. A., Dalley, A. J., Chan, A., Stein, S., Farah, C. S. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers- E-cadherin, beta-catenin, APC and vimentin-in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol* 48: 997-1006, 2012.
  35. Zhang, X., Liu, G., Kang, Y., Dong, Z., Qian, Q., Ma, X. N-cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell line. *PLoS One* 8: e57692, 2013.
  36. Liu, C. Y., Lin, H. H., Tang, M. J., Wang Y. K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* 6: 15966-15983, 2015.
  37. Brabletz, T., Jung A., Kirchner, T. Beta-catenin and morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch* 441: 1-11, 2002.
  38. Ng, T. L., Gown, A. M., Barry, T. S., Cheang, M. C., Chan, A. K., Tubrin, D. A., Hsu, F. D., West, R. B., Nielsen, T. O. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol* 18: 68-74, 2005.
  39. Cheng, H., Liang, H., Qin, Y., Liu, Y. Nuclear beta-catenin overexpression in metastatic sentinel lymph node is associated with

synchronous liver metastasis in colorectal cancer. Diagn Pathol 6: 109, 2011.

表 1 对象症例 86 例

<b>Gender</b>	<b>Male</b>	<b>52</b>
	<b>Female</b>	<b>34</b>
<b>Age</b>		<b>32-90</b>
	<b>Average</b>	<b>66±13</b>
<b>Site</b>	<b>Floor of mouth</b>	<b>9</b>
	<b>Upper gum</b>	<b>13</b>
	<b>Lower gum</b>	<b>34</b>
	<b>Cheek mucosa</b>	<b>3</b>
	<b>Tongue</b>	<b>27</b>
<b>Histological differentiation</b>	<b>Well</b>	<b>45</b>
	<b>Moderate</b>	<b>35</b>
	<b>Poor</b>	<b>6</b>
<b>T</b>	<b>1</b>	<b>9</b>
	<b>2</b>	<b>27</b>
	<b>3</b>	<b>14</b>
	<b>4</b>	<b>36</b>
<b>N</b>	<b>-</b>	<b>47</b>
	<b>+</b>	<b>39</b>
<b>Stage</b>	<b>I</b>	<b>9</b>
	<b>II</b>	<b>27</b>
	<b>III</b>	<b>14</b>
	<b>IV</b>	<b>36</b>
<b>Survival status</b>	<b>Alive</b>	<b>68</b>
	<b>Deceased</b>	<b>18</b>

表 2 HDM2 発現と臨床病理学的因子

		HDM2		P value
		(-)	(+)	
Gender*	Male	24	28	0.508
	Female	19	15	
Age*	< 66	21	20	1
	≥ 66	22	23	
Site*	Floor of mouth	3	6	0.761
	Upper gum	7	6	
	Lower gum	16	18	
	Cheek mucosa	2	1	
	Tongue	15	12	
Histological differentiation*	Well	23	22	0.975
	Moderate	17	18	
	Poor	3	3	
T*	1	6	3	0.563
	2	18	17	
	3	8	7	
	4	11	16	
N*	-	26	21	0.386
	+	17	22	
Stage*	I	6	3	0.765
	II	13	14	
	III	7	7	
	IV	17	19	
Survival status**	Alive	41	27	0.000308
	Deceased	2	16	

\* :  $\chi^2$  検定, \*\* : Log-rank 検定

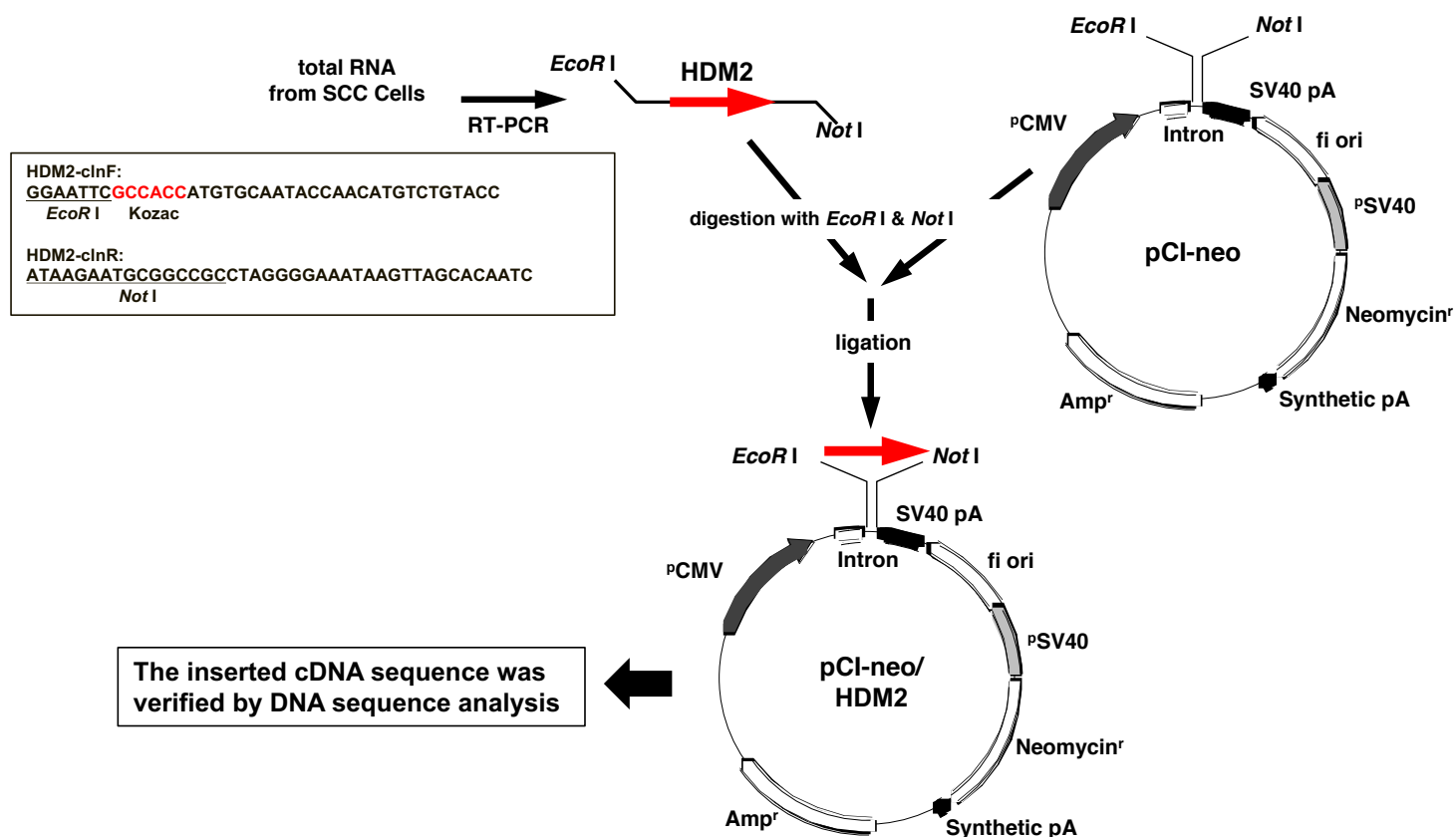


図1 HDM2 の発現ベクター構築の概略

SCCKN の total RNA を template に RT-PCR 法で増幅した HDM2 の open reading frame を哺乳動物ベクター pCI-neo に組み込み、pCI-neo/HDM2 を作成した。

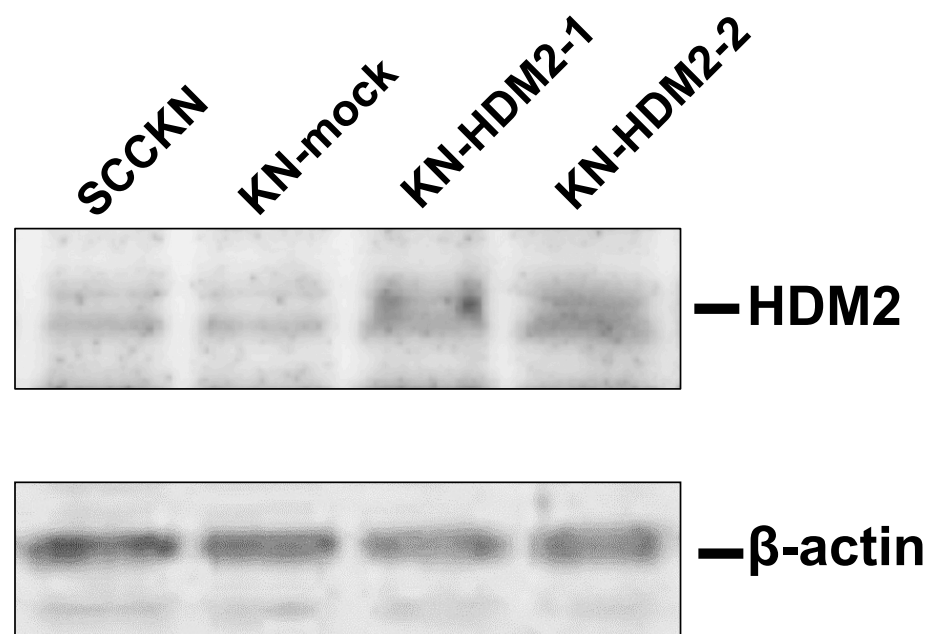


図 2 SCCKN, KN-mock および KN-HDM2 における HDM2 蛋白の発現

SCCKN, KN-mock および KN-HDM2 における KDM2 蛋白の発現を Western Blot 法にて解析した.

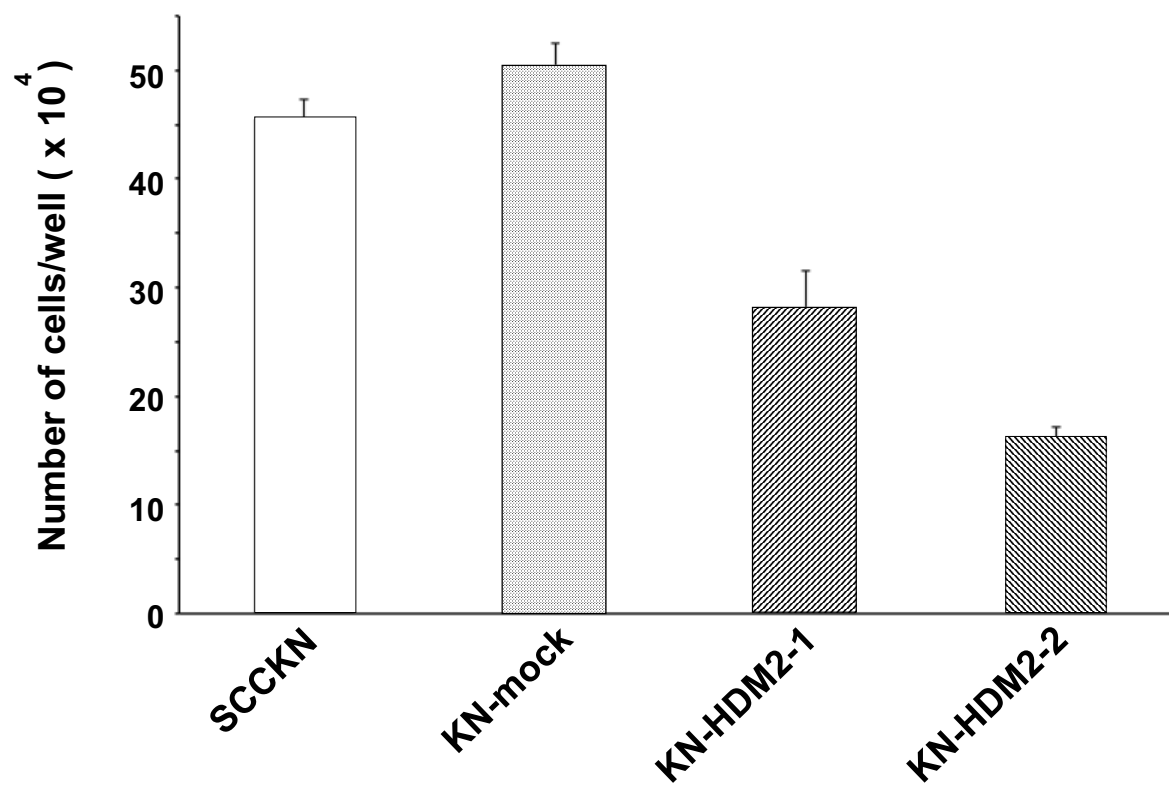


図3 HDM2 高発現細胞が増殖能に与える影響

SCCKN, KN-mock および KN-HDM2 を, 5% CS を含む RD 基礎栄養培地で培養し, 培養 6 日目の増殖細胞数を示します.



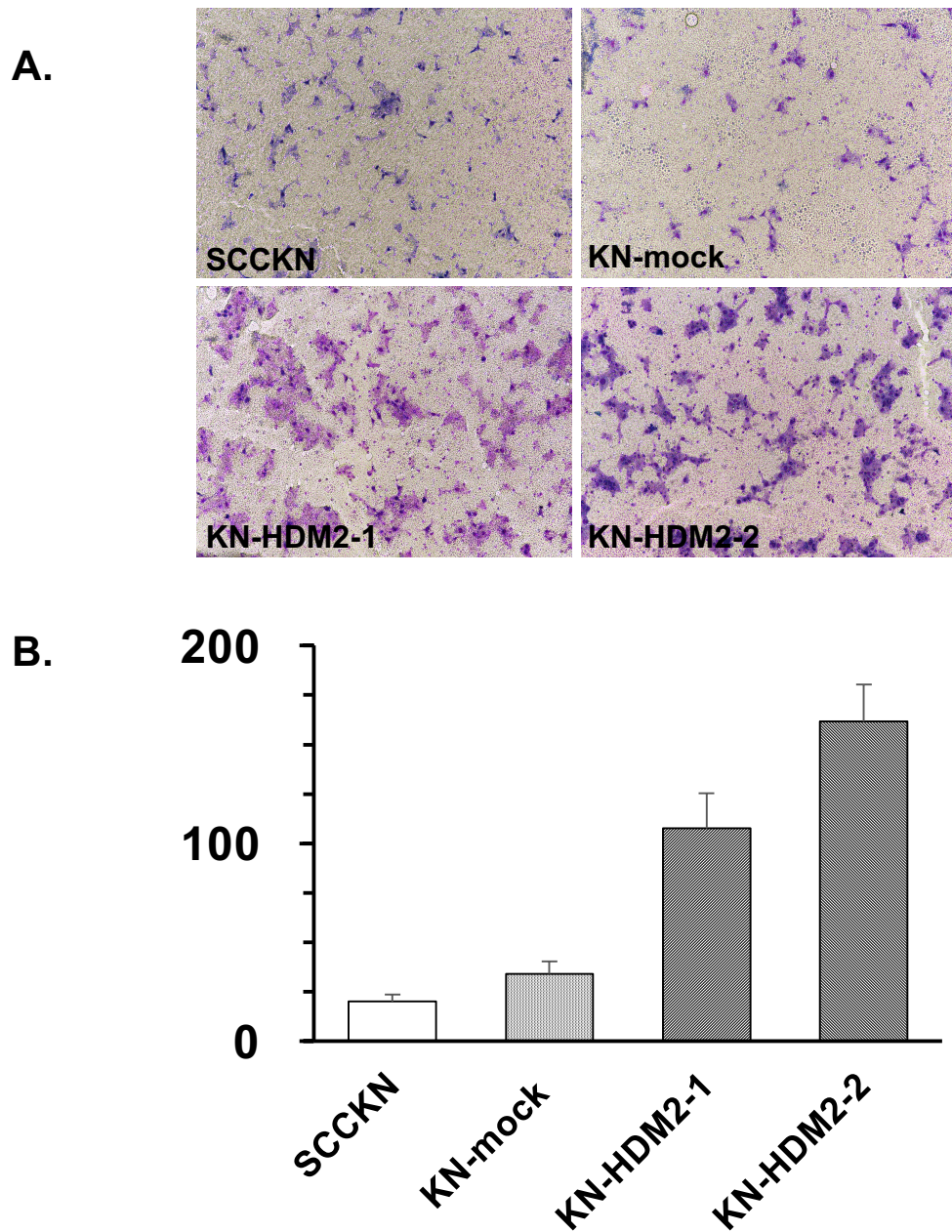


図4 HDM2 高発現細胞が運動能に与える影響

SCCKN, KN-mock および KN-HDM2 の細胞運動能を Boyden chamber の変法にて解析した. (A) ケモタキセル (倉敷紡績) のメンブラン下面に遊走した細胞のディフクイック染色所見を示す. (B) 各細胞の 1mm<sup>2</sup>あたりの細胞数を示す.

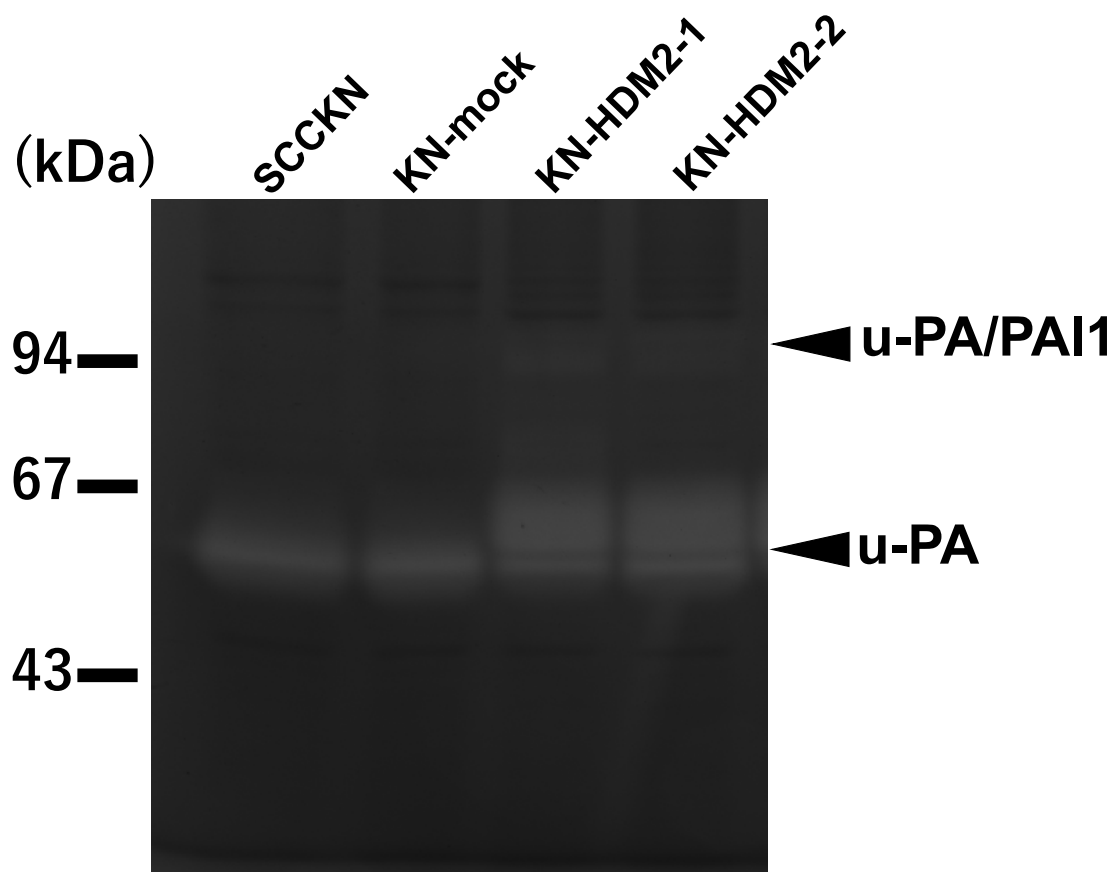


図5 HDM2 高発現細胞が蛋白分解活性に与える影響

0.1% BSA を含んだ RD 基礎栄養培地で各細胞を 24 時間培養した時の培養上清中のプラスミノゲンアクチベーター活性を，プラスミノゲンを含むカゼインザイモグラフィーにて解析した．

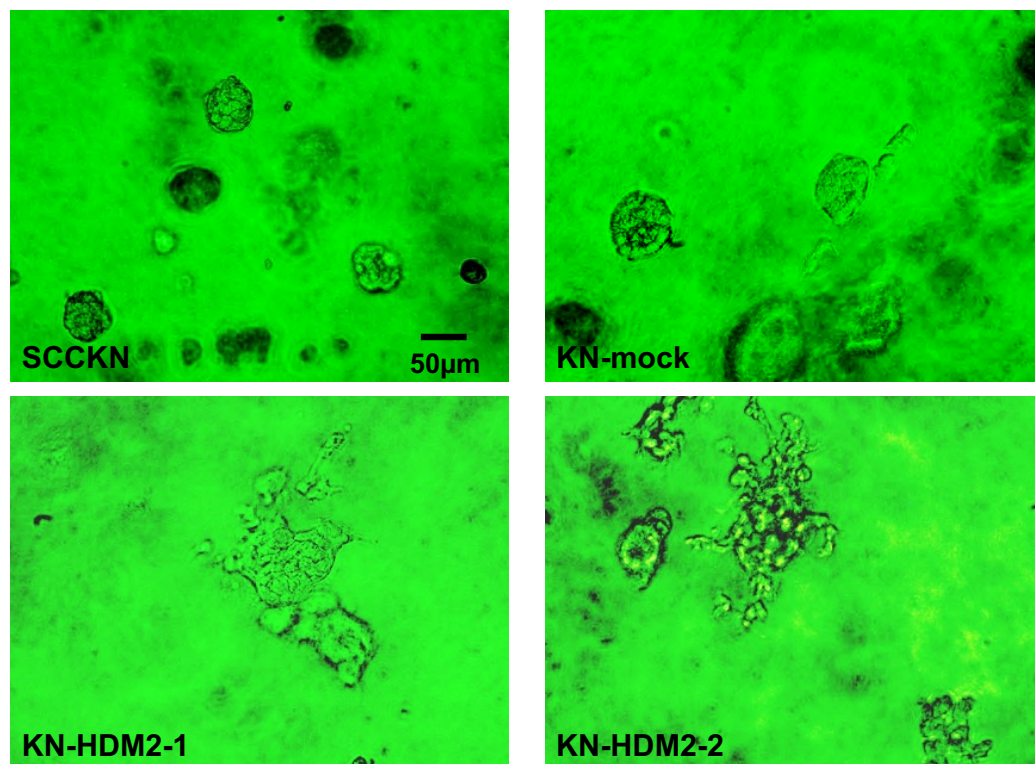


図6 I型コラーゲンゲル内における口腔扁平上皮癌細胞の増殖様態

I型コラーゲンゲル内で7日間培養した各細胞を,位相差顕微鏡で観察した.

Scale bar, 50μm

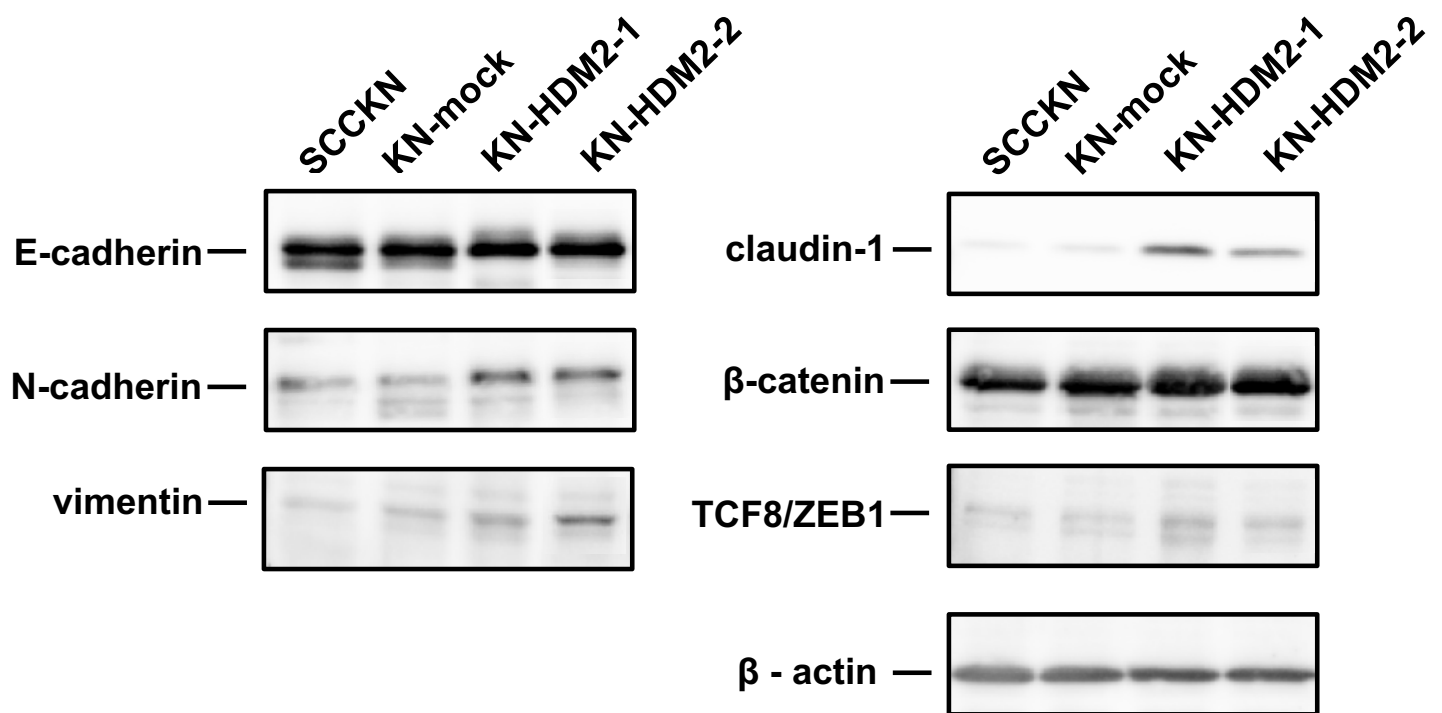


図7 口腔扁平上皮癌細胞における EMT 関連蛋白発現

SCCKN, KN-mock および KN-HDM2 における E-cadherin, N-cadherin, vimentin, claudin-1, β-catenin, および TCF/ZEB1 蛋白発現を Western Blot 法にて解析した。

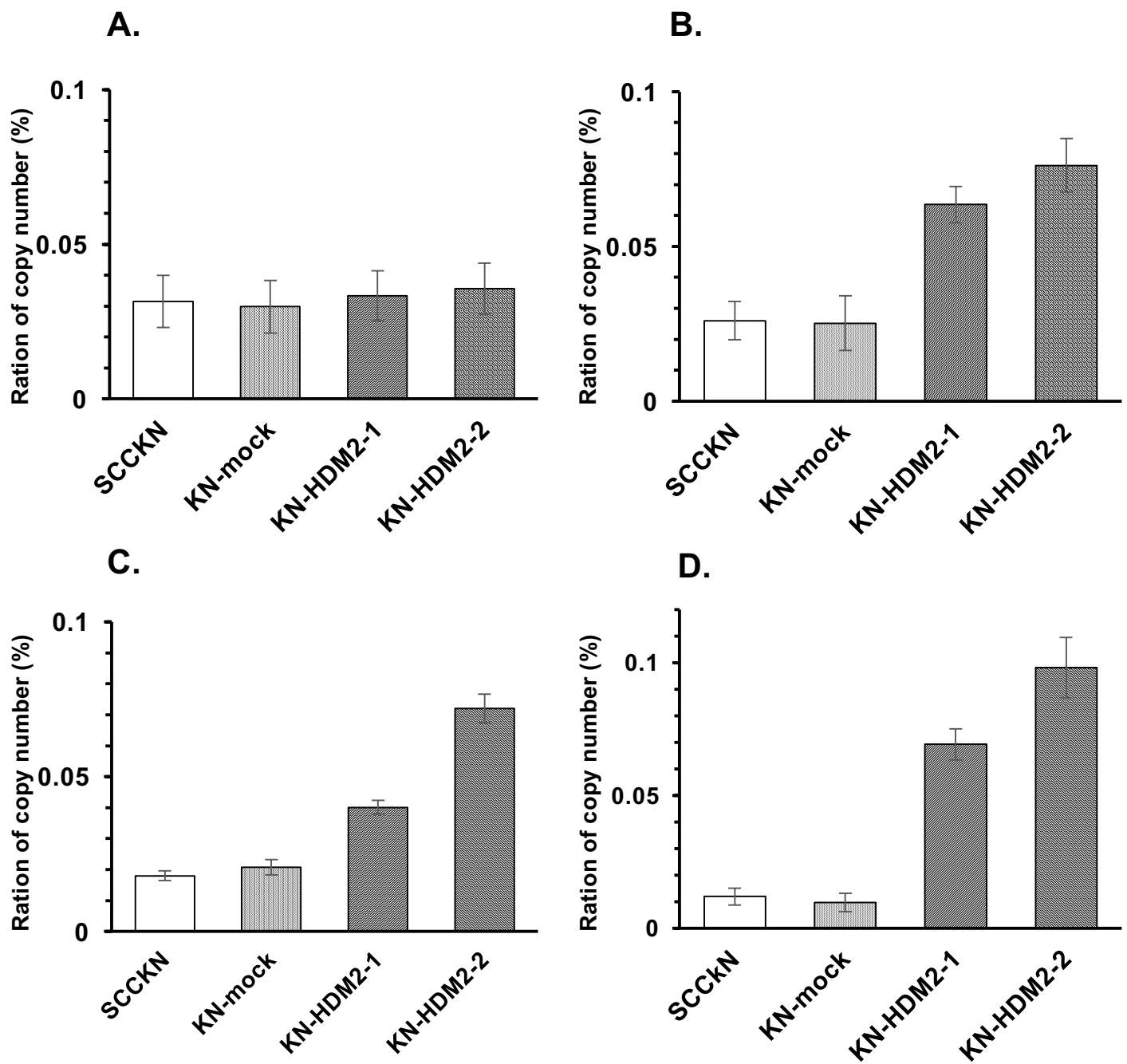


図8 口腔扁平上皮癌細胞における EMT 関連分子の mRNA 発現

SCCKN, KN-mock および KN-HDM2 における (A) *E-cadherin*, (B) *N-cadherin*, (C) *vimentin* および (D) *claudin-1* の mRNA 発現を Droplet Digital PCR 法にて解析した。

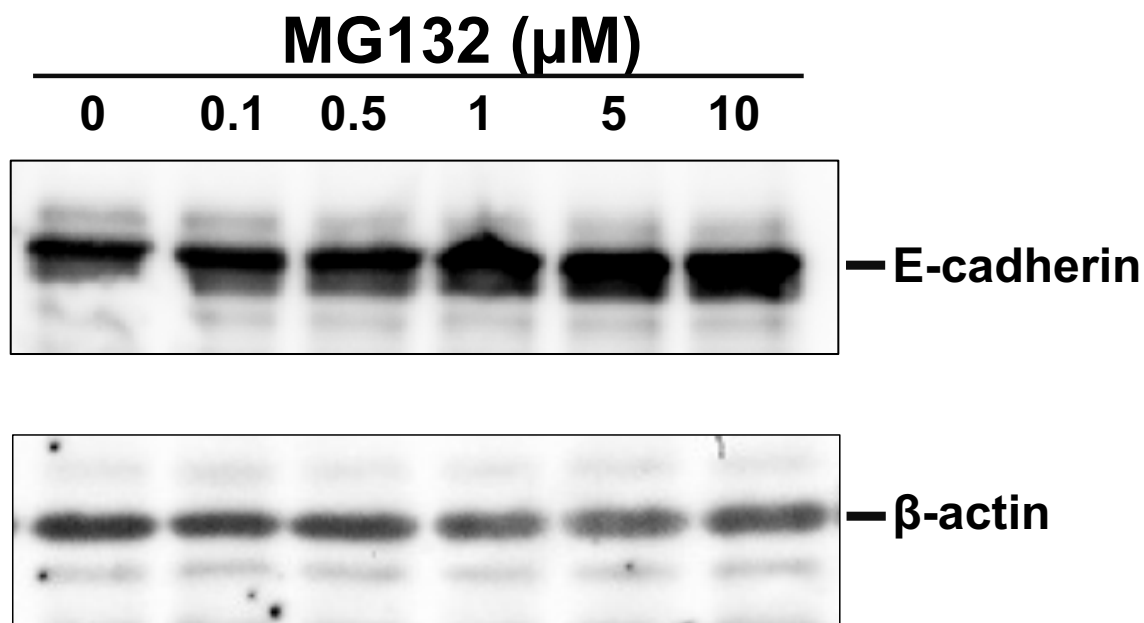


図9 口腔扁平上皮癌細胞の E-cadherin 蛋白発現に及ぼす蛋白分解活性阻害剤の影響

プロテアソーム阻害剤である各濃度の MG132 を 12 時間処理した KN-HDM2 の E-cadherin 蛋白の発現を Western Blot 法にて解析した.

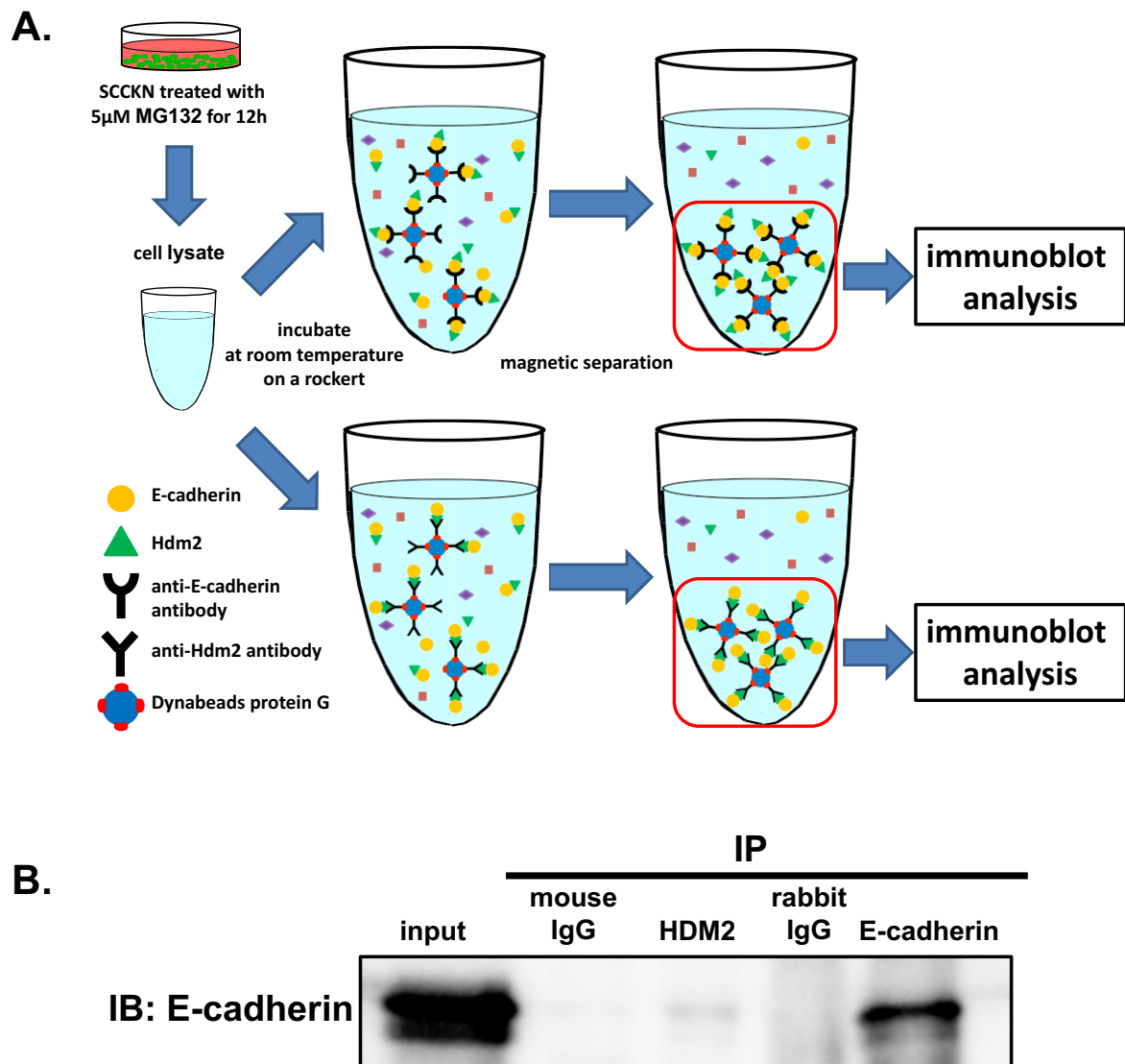


図 1 O 共免疫沈降法による HDM2 と E-cadherin の複合体形成についての検討

(A)  $5\mu\text{M}$  の MG132 で 12 時間処理した SCCKN に cell lysate を，抗 HDM2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) または抗 E-cadherin 抗体 (Cell Signaling Technology) で免疫沈降した標品に対し，抗 E-cadherin 抗体を用いて Western Blot を行なった．(B) 共免疫沈降法における HDM2 と E-cadherin 蛋白との複合体形成を解析した．

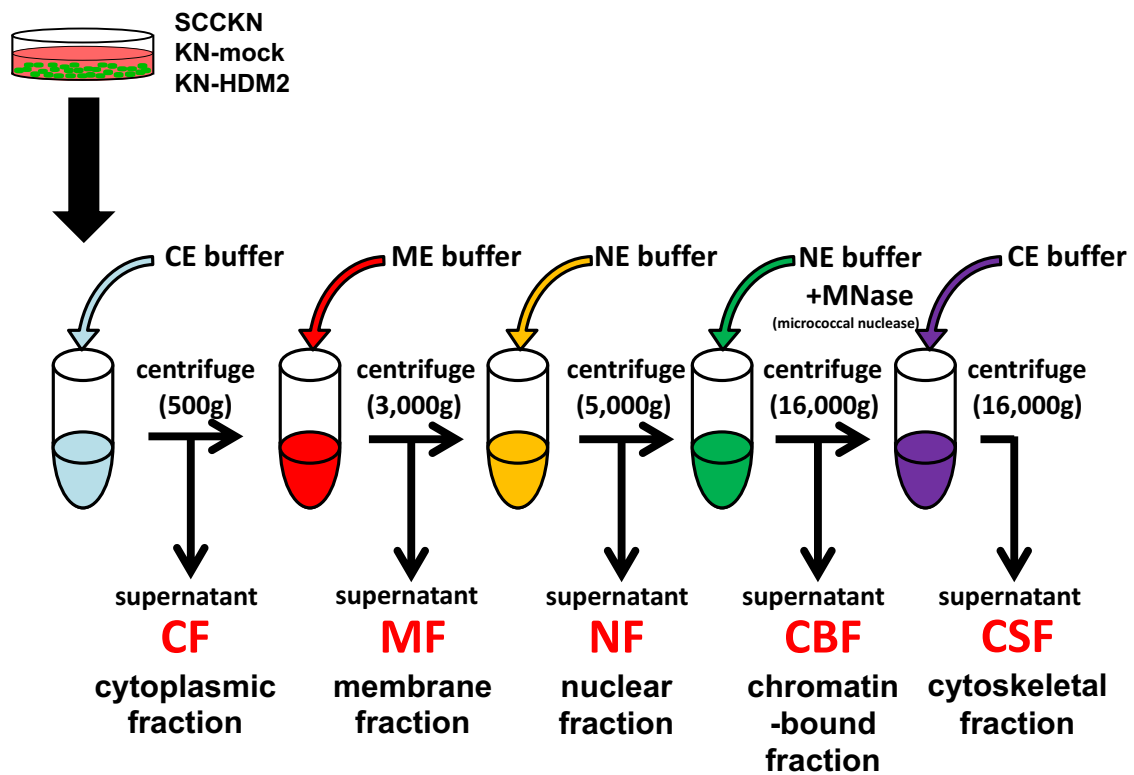
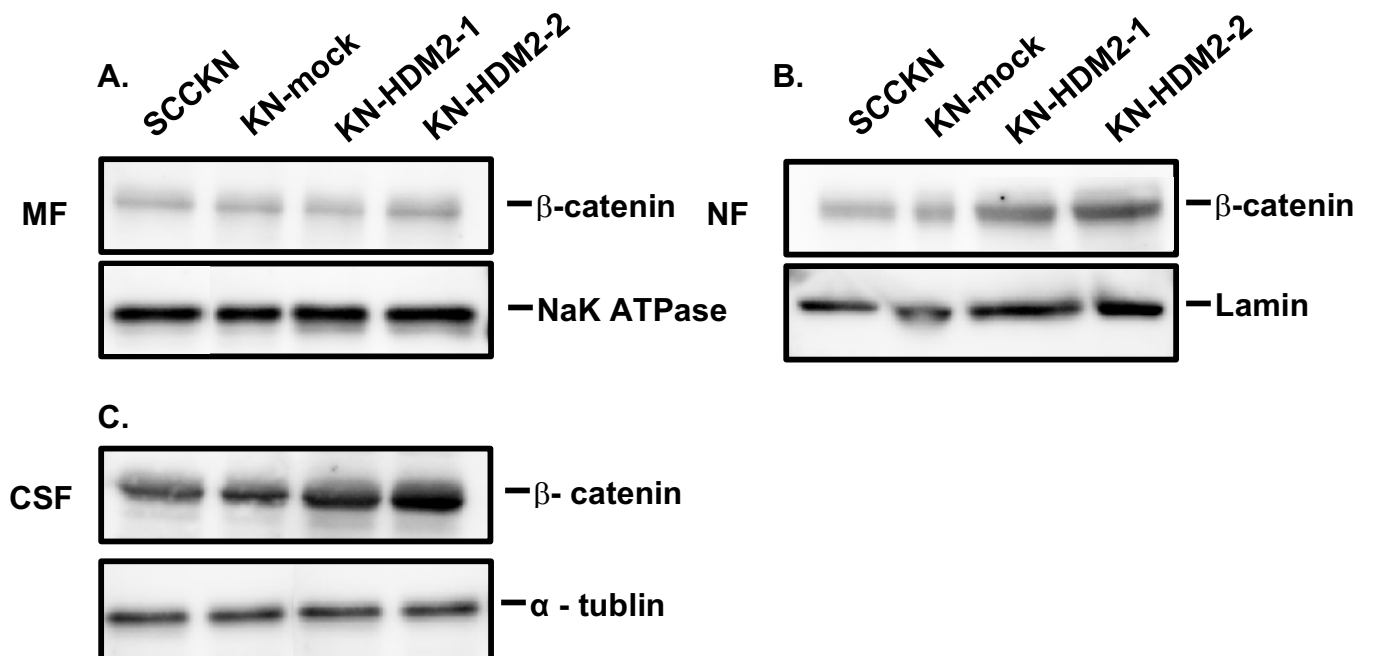


図 1 1 細胞画分の分離

各細胞の細胞画分を分離し，各細胞中の $\beta$ -catenin 蛋白を Western Blot 法で解析した．





MF : membrane fraction,    NF : nuclear fraction,    CSF : cytoskeletal fraction

図 1 2 SCCKN, KN-mock, KN-HDM2 の各細胞画分中における $\beta$ -catenin 蛋白発現

図 1 1 の手法で各細胞画分を分離し, (A) 細胞膜画分 (B) 細胞核画分 (C) 細胞骨格画分の $\beta$ -catenin 蛋白の発現を Western Blot 法にて解析した.

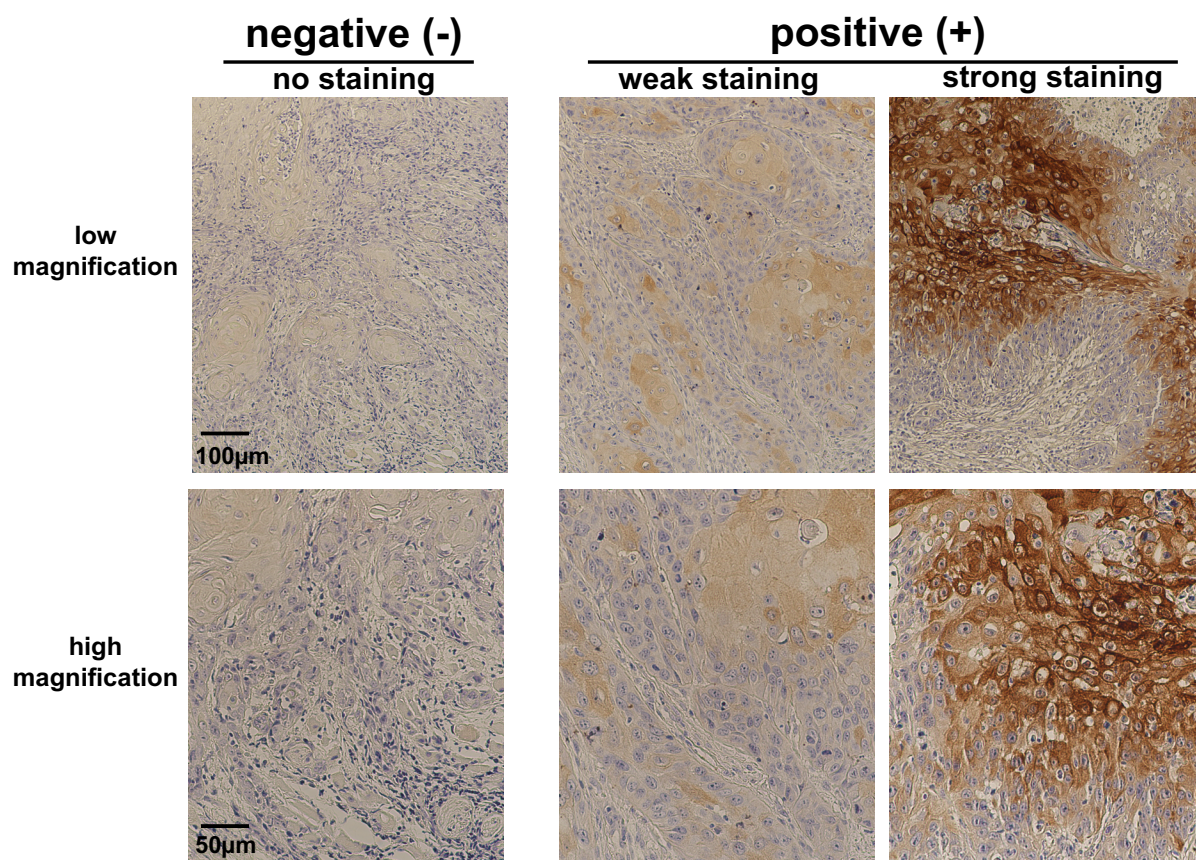


図 1 3 口腔扁平上皮癌組織での HDM2 発現

全く染色されなかったもの（左），弱染色（中），強染色（右）の三群に分け，  
全く染色されなかったものを陰性，弱染色および強染色を陽性と判定した。

A.			B.			C.		
	HDM2 (-)	HDM2 (+)		HDM2 (-)	HDM2 (+)		HDM2 (-)	HDM2 (+)
T1	6	3	N (~)	26	21	Stage I	6	3
T2	18	17	N (+)	17	22	Stage II	13	14
T3	8	7	$\chi^2$ test : p = 0.386			Stage III	7	7
T4	11	16				Stage IV	17	19
$\chi^2$ test : p = 0.563						$\chi^2$ test : p = 0.765		

図 1 4 HDM2 発現と T 分類, N 分類, stage 分類との相関

免疫組織染色法による HDM2 陽性群および陰性群と (A) T 分類, (B) N 分類および (C) stage 分類との相関を解析した. T 分類, N 分類および stage 分類は  $\chi^2$  検定でそれぞれ解析を行なった.

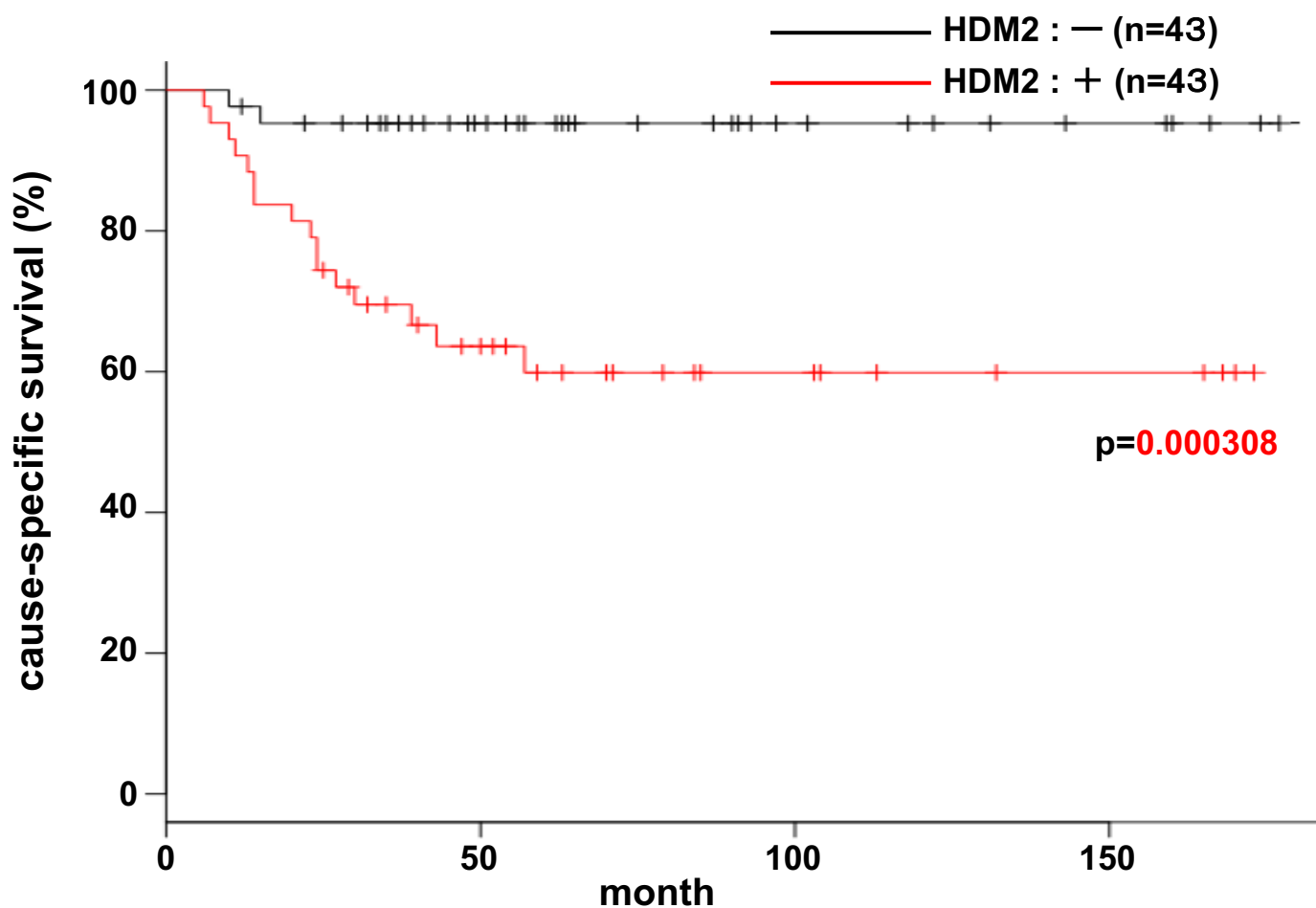


図 1 5 口腔扁平上皮癌患者の HDM2 発現別生存曲線

HDM2 発現陰性群 (-) 43 症例と陽性群 (+) 43 症例の二群に分類し、二群間の比較は Log-rank 検定にて検討した。