

氏 名 野井 将大

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲博士第 838 号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

学 位 授 与 年 月 日 平成 3 1 年 3 月 8 日

学 位 論 文 題 目 ERK phosphorylation functions in invadopodia formation  
in tongue cancer cells in a novel silicate fibre-based  
3D cell culture system

(シリカファイバーを基礎とした 3 次元培養システムにより  
検討したリン酸化 ERK の癌細胞浸潤突起形成への影響)

審 査 委 員 主査 教授 九嶋 亮治

副査 教授 松浦 博

副査 教授 中野 恭幸

## 論文内容要旨

※整理番号	845	(ふりがな) 氏名	の い まさはる 野井 将大
学位論文題目	ERK phosphorylation functions in invadopodia formation in tongue cancer cells in a novel silicate fibre-based 3D cell culture system (シリカファイバーを基礎とした 3次元培養システムにより検討したリン酸化 ERK の癌細胞浸潤突起形成への影響)		
<p>【研究の目的】</p> <p>口腔癌では、Ezrin や ERK の過剰発現が癌の浸潤に関係していると報告されている。当科でもこれまでに、Ezrin が舌癌の進展に関与していることを報告してきた。本研究ではまずはじめに、舌癌パラフィンブロックを用いて舌浸潤癌(Squamous cell carcinoma)および舌上皮内癌組織(Carcinoma in situ)において Ezrin、ERK、AKT の免疫組織学的染色を行い、舌上皮内癌と比較し舌癌の進展に関与する因子を組織学的に検討した。その結果、Ezrin と ERK が舌上皮内癌から舌浸潤癌への進展に関与していることが分かった。</p> <p>癌細胞の浸潤突起は細胞外基質を分解し周囲組織への浸潤する役割を果たしている F-actin ベースの膜突起である。この浸潤突起と ERK の関係は過去にも報告されているが、3次元培養した癌細胞を用いての報告は少ない。本研究では、新しい3次元培養担体である高純度シリカファイバー不織布シート (Cellbed) を用いて舌癌細胞株を培養し、Ezrin 及び ERK の発現を抑制することにより、癌細胞の機能や浸潤突起の変化を評価した。本研究の目的は、Ezrin と ERK の腫瘍進展における役割や、新たな分子標的となりうるか否かについて模索することである。</p> <p>【方法】</p> <p>当院歯科口腔外科にて舌癌手術で切除した舌のパラフィンブロックを用いて Ezrin、ERK、AKT の免疫組織学的染色を行った。次に、Cellbed を使用し舌癌細胞株(HSC-4)を長期間(4週間)培養し、HE 染色、トルイジンブルー染色、電子顕微鏡による観察を行った。その後、ERK 活性化の阻害もしくは si-RNA により Ezrin をノックダウンした 3次元培養舌癌細胞株(HSC-3、HSC-4)を用いて、細胞の形態変化を免疫蛍光染色で観察した。ERK 阻害剤投与による形態変化は浸潤突起のマーカーである F-actin と Cortactin の共局在部位を中心に評価した。また、細胞の形態変化の原因として p-Cortactin の関連を疑い、ウエスタンブロット法で p-Cortactin の発現を調べた。</p> <p>【結果】</p> <p>ヒト舌癌組織の免疫組織学的染色の結果、Ezrin と ERK の発現程度はそれぞれ舌上皮内癌と舌進行癌の間に有意差を認めた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

また、Cellbed を用いて HSC-4 を培養した結果、HE 染色では扁平上皮癌の特徴である異常角化、トルイジンブルー染色では扁平上皮の特徴である表層へ分化した層構造が認められ、電子顕微鏡ではデスモソームが観察できた。次に、Ezrin ノックダウン細胞では細胞の形態に変化は認めなかったが、ERK 活性化を阻害した細胞は、浸潤突起の形成が阻害され丸い玉石のような形態へ変化していた。この形態変化に関与している因子を同定するため、浸潤突起の形成に関与していると報告されている Cortactin の発現程度をウエスタンブロット法で評価した結果、ERK 活性化を阻害した細胞では p-Cortactin が抑制されていることが確認できた。次に、この形態変化を認めた細胞の F-actin と Cortactin の共局在部位を評価した。通常、従来 of 2 次元培養条件下では、F-actin と Cortactin の共局在部は細胞の中に点状で認めるとされている。しかし 3 次元培養を行った細胞では、とくに細胞の辺縁に共局在部を認めた。また、ERK 阻害剤投与時より細胞突起は減少し共局在部は細胞骨格に丸く認められた。

**【考察】**

本研究では、長期間 3 次元培養した HSC-4 にて層構造、表層への分化、異常角化やデスモソームが観察された。これらのことにより Cellbed を用いた 3 次元培養システムは、生体内での癌細胞の形態を忠実に模倣しているといえる。実際に生体内の結合組織には collagen fiber があり、これが足場ないし骨格となり癌細胞が増殖し浸潤すると考えられている。本研究ではこの Cellbed が足場となることで 3 次元培養した癌細胞が層構造や分化を示すことができたと考えられた。従来 of 3 次元培養システムは、使用方法が煩雑なことや長期間の培養ができないこと、また、タンパクの抽出が困難であるといった欠点があったが、Cellbed はそれらの欠点はなく優れた新しい 3 次元培養担体であると思われる。

免疫組織学的染色ではヒト舌腫瘍切除標本を用いた検討から、舌上皮内癌と比較して舌浸潤癌では Ezrin および ERK が有意に高発現し、それらが舌扁平上皮癌の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、Ezrin の発現を抑制した細胞の形態を観察したが著明な変化は認めなかった。しかし、ERK 阻害剤を投与した細胞では細胞突起が減少した。この細胞突起は F-actin と Cortactin の共局在部であったことから浸潤突起と考えられた。実際に、ERK 阻害剤と投与した細胞では p-Cortactin の発現が抑制されており、それにより浸潤突起の形成が抑制されたと考えられた。つまり、ERK の活性化は Cortactin の活性化に関与し浸潤突起の形成に機能していることが示唆された。

**【結語】**

Cellbed は長期間培養できる点をはじめ、各種実験系に使用できる優れた 3 次元培養担体である。3 次元培養での実験系によって、生体内の環境を模倣した状態で ERK のリン酸化により Cortactin が活性化して浸潤突起の形成や舌癌の進展に関与していることが示唆された。よって、Cellbed を用いた 3 次元培養下での実験系は、動物実験へ移行する前段階での *in vitro* の研究として簡便かつ有用であり、今後、癌研究の分野で広く用いることができると考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	845	氏名	野井 将大
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>舌扁平上皮癌の進展過程を免疫組織化学的に調べ、3D培養担体 (Cellbed) を用いてその浸潤メカニズムを明らかにしようとした。</p> <p>上皮内癌と浸潤性扁平上皮癌を対象として、ERK、ezrin と AKT の蛋白発現を免疫染色にて比較したところ、後者において ERK および ezrin の発現頻度が有意に高いことがわかった。</p> <p>シリカファイバー不織布シートからなる Cellbed の構造がヒトの疎性結合組織と類似していることを示し、培養細胞の免疫染色・蛍光染色と抽出蛋白の Western blot 解析が可能なこと、2D培養よりも長期間培養できることを証明した。</p> <p>舌癌細胞株である HSC-3、HSC-4 を、Cellbed で培養したところ、癌細胞が生体における扁平上皮癌と同様の層構造を形成することを示した。さらに、ERK 阻害剤によって p-Cortactin が抑制され、F-actin と Cortactin は細胞の辺縁部共局在することがわかり、浸潤突起の形成にリン酸化 ERK が関与していることを明らかにした。</p> <p>Cellbed を用いた 3D 培養による実験系は、動物実験に移行する前段階として有効なツールとなりうると報告した。</p> <p>本論文は舌扁平上皮癌の特性と三次元培養法を用いた研究法について新たな知見を提供するものであり、また、最終試験として論文内容に関連した試問にも合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 599字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 31 年 1 月 30 日)</p>			