

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域 顎口腔腫瘍病態学教育研究分野 氏名 古舘 健
<p>(論文題目)</p> <p>CLOCK GENE EXPRESSIONS ARE ALTERED BY CO-CULTURE OF GINGIVAL FIBROBLASTS AND ORAL CANCER CELLS</p> <p>(時計遺伝子の発現は歯肉線維芽細胞と口腔癌細胞の共培養によって変化する)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>時計遺伝子は、概日リズムを制御している。</p> <p>地球上のほとんどの生物は概日リズムの影響を受けている。哺乳類における概日リズムの中核は、視床下部の視交叉上核に存在する。時計遺伝子は末梢組織に発現し、転写翻訳のフィードバックループにより 24 時間周期で振幅発現している。時計遺伝子は、生体に必須の時間管理機能を制御し、細胞周期、細胞増殖、アポトーシスに関連するさまざまな細胞の機能を調整している。そのため、この機能の破綻は、がん発生を引き起こすと考えられている。</p> <p>癌微小環境は、腫瘍の進行に重要な役割を果たしているという報告が数多くある。</p> <p>癌微小環境において、癌間質の線維芽細胞は、重要な役割を担っており、癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts; CAF)に変化する。癌関連線維芽細胞はさまざまな癌で報告されている。その起源は諸説あり、正常線維芽細胞から生じる説、上皮間葉変換の説、間葉細胞から生じる説がある。</p> <p>癌関連線維芽細胞は、癌の生物学において、重要な役割を担っている。</p> <p>癌関連線維芽細胞は、前癌シグナルを促進する上皮成長因子 (EGF) や形質転換因子 β (TGF-β) などのサイトカインを放出する。さらに癌関連線維芽細胞は細胞外基質を分解することで、腫瘍細胞の浸潤や転移を促すことが示唆された。</p> <p>癌微小環境において、癌関連線維芽細胞と癌細胞の相互作用は時計遺伝子発現に重要な役割を担っているにも関わらず、未だほとんど明らかにされていない。今回、私は時計遺伝子の発現を線維芽細胞と癌細胞を共培養の影響を評価した。</p> <p>線維芽細胞と口腔癌細胞を培養した。</p> <p>健康な歯肉組織をもつ患者からヒト歯肉線維芽細胞 (Fibroblasts) は採取された。またヒト口腔扁平上皮癌 (Ca9-22) は JCRB 細胞バンクから入手した。Fibroblasts と Ca9-22 の共培養は、半透膜のフィルターで細胞間の物質伝達が可能なディッシュを用いた。</p> <p>血清ショックで概日リズムを同期させた。</p> <p>血清ショックは、50%馬血清で行った。5%ダルベッコ改良イーグル培地に変え、その時点から 4 時間毎に 48 時間まで細胞を採取した。RNA を抽出し、定量リアルタイム PCR で時計遺伝子を解析した。</p> <p>共培養されたヒト口腔癌細胞 (Ca9-22) は、ヒト線維芽細胞 (Fibroblasts) の時計遺伝子の発現を変化させた。</p> <p>Ca9-22 の非存在下で、Fibroblasts の時計遺伝子はリズムカルな振幅を認めた。</p>	

Fibroblasts の時計遺伝子 Clock と Rev-Erba のリズムカルな振幅は、Ca9-22 存在下で 20 時間毎から 12 時間毎と 14 時間毎にそれぞれ変化した。また、Fibroblasts の時計遺伝子 Dec1 の発現は、Ca9-22 の存在下において、時間依存的に増強された。一方、時計遺伝子 Cry1/2 のリズム発現は消失した。

ヒト線維芽細胞 (Fibroblasts) の共培養によって、ヒト口腔癌細胞 (Ca9-22) の時計遺伝子発現は、影響を受けた

Fibroblasts の非共培養下で、Ca9-22 の時計遺伝子 Clock、Cry1/2 のリズムカルな振幅は 8 時間毎であった。Ca9-22 の時計遺伝子 Cry2 と Per1 の振幅は弱く、Rev-Erba の振幅はほとんど観察されなかった。Fibroblasts の共培養下で、Ca9-22 の Rev-Erba 発現は約 12 時間間隔に延長された。さらに Ca9-22 の時計遺伝子 Per1 と Rev-Erba のリズム発現は、Fibroblasts の共培養下で増強された。対照的に、Ca9-22 の Cry1/2 の mRNA 発現は Fibroblasts の共培養下で低下し、リズム振幅は減弱された。

ヒト線維芽細胞 (Fibroblasts) とヒト口腔癌細胞 (Ca9-22) の共培養による影響は大きく次の 3 つに分類された。1 つ目は、リズムカルな振幅が、共培養によって変化する時計遺伝子群である。2 つ目は、共培養によって、リズムカルに振幅する時計遺伝子群である。3 つ目は、共培養によって、リズムカルな発現が消失する時計遺伝子群である。

1 つ目、リズムカルな振幅が、共培養によって変化する時計遺伝子群には、Clock、Rev-Erba、Dec1 が分類された。Fibroblasts と Ca9-22 は、相互に時計遺伝子 Clock のリズム発現に影響を与えた。また、Fibroblasts の共培養下で、Ca9-22 の Rev-Erba 発現は明らかに短縮した。これは、癌と癌間質の相互作用に時計遺伝子が重要な役割をもつことを示した。Fibroblasts の Dec1 のリズム発現は Ca9-22 の存在下で変化した。時計遺伝子 Dec-1 の過剰発現はさまざまな腫瘍でみつかっており、関連が示唆された。

2 つ目、共培養によって、リズムカルに振幅する時計遺伝子に Per と Rev-Erba は分類された。概日リズムの乱れは、癌発生に関与することが知られている。例えば、腫瘍抑制の性質をもつ Per2 の異常な発現は、直腸癌や肺癌を引き起こす。今回の結果では、Per1 および Rev-Erba の発現は、Ca9-22 において概日リズムを示さなかった。しかし、Fibroblasts と共培養すると、概日リズムを示すことが明らかになった。これは、癌細胞と癌間質細胞の間で、時計遺伝子の発現が制御されることを示唆した。

3 つ目、共培養によって、リズムカルな発現が消失する時計遺伝子に Cry1/2 は分類された。Fibroblasts と Ca9-22 を共培養すると、時計遺伝子 Cry1/2 のリズム発現は Fibroblasts と Ca9-22 のいずれも消失した。

留意すべきは、今回の研究で用いた共培養のシステムは Fibroblasts と Ca9-22 が直接接触していないということである。それゆえに、一方の細胞から分泌されたある液性因子が、もう一方の細胞の時計遺伝子の概日リズム発現に影響を与えている可能性がある。今回の研究ではその因子は明らかにできなかったが、次回の研究で明らかにする予定である。

結論として、Fibroblasts と Ca9-22 を共培養すると、個々の遺伝子特異的に時計遺伝子の概日リズム発現は変化するようになった。今回の結果は、口腔癌の時計遺伝子の概日リズム発現が癌微小環境の相互作用において重要な役割を果たすことを示した。