ヒト口腔扁平上皮がん細胞株および組織における HMGI ファミリーの発現

宮澤 淳・白川正順
今井一志*・真田一男*

HMGI family expression in human oral squamous carcinoma cell lines and tissues

MIYAZAWA Jun・SHIRAKAWA Masayori
IMAI Kazushi*・SANADA Kazuo*

Abstract: Expression of mesenchymal marker genes in carcinoma cells contributes to the progression of neoplasms. The HMGI family, consisting of HMGIC, HMGI, and HMGY, binds to transcription factors in enhanceosomes and regulates mesenchymal cell growth. Although aberrant expression of HMGIC initiates mesenchymal tumor formation, the expression of this marker gene in squamous cell carcinomas of the oral cavity has not been investigated previously. The present study was conducted to analyze expression patterns of the HMGI family in oral carcinomas. Elevated expression of HMGIC on conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was observed only in carcinoma cell lines and tissues but not in their normal counterparts. Quantitative analysis of expression levels by real-time RT-PCR demonstrated that HMGIC is up-regulated in E-cadherin-expressing cell lines. Immunohistochemical studies of carcinoma tissue sections found that HMGIC was localized in E-cadherin-positive carcinoma cells, whereas at the invasion front HMGIC was present in PCNA-positive carcinoma cells located at periphery of carcinoma cell nests and in surrounding fibroblast-like cells. The percentage of HMGIC-positive carcinoma cells decreased in poorly differentiated tumor tissue. The percentage of HMGIC-positive cases at the invasive front significantly increased in patients with cervical lymph node metastasis. These results suggest that HMGIC may have a role in the phenotypic alteration of carcinoma cells and the progression of oral carcinomas.

Key words: high mobility group I (HMGI), high mobility group I-C (HMGIC), squamous cell carcinoma (扁平上皮がん)

緒 言

口腔扁平上皮がんは、口腔に発生する最も頻度の高い悪

日本歯科大学大学院歯学研究科口腔外科学 I
(主任：白川正順教授)

*日本歯科大学歯学部生化学講座
(主任：真田一男教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery I,
Graduate School of Dentistry, Nippon Dental Uni-
versity at Tokyo (Chief: Prof. SHIRAKAWA
Masayori)

*Department of Biochemistry, School of Dentistry,
Nippon Dental University at Tokyo (Chief: Prof.
SANADA Kazuo)

受付日：2002年6月28日

採択日：2003年3月18日

性腫瘍である。口腔がん治療には著しい進歩がみられるが、5年生存率は必ずしも満足のいく結果が得られていない¹⁾。扁平上皮がん細胞は悪性度が増すにつれて上皮細胞としての特徴を失い、その過程で転移能を獲得すると考えられている²⁾。しかし、がん増悪を招く分子機構は未だ不明な点が多く残っている。

High mobility group I (以下 HMGI と略) 遺伝子ファミリーには HMGI (Y) と HMGIC が属し、前者は選択的スプライシングにより HMGI と HMGY に分類される。それらは転写因子の一種であり、DNA を屈曲して他の転写因子とともに転写複合体を形成することで標的遺伝子の転写を制御すると考えられている³⁾。HMGI ファミリーは胎児期特異的に発現するが、HMGI (Y) (6 q21) あるいは

HMGIC (12q13-15) の転座によりこれらが過剰発現すると、間質系腫瘍の形成を招くことが報告されている^{3~7)}。高浸潤性ヒト乳がん組織において HMGIC 発現が亢進することや⁸⁾、HMGIC アンチセンス RNA が *ras*-mos および *ras*-ki によるラット甲状腺細胞のがん化を阻害することが報告されている⁹⁾。これらの報告から、HMGIC はがんの発生や増悪に関与すると推測されるが、その解明に向けた詳細な研究はされていない。また、HMGI ファミリーの上皮系腫瘍における発現については大腸がん、乳がん、前立腺がん、甲状腺がんなどが知られているが^{8~12)}、口腔扁平上皮がんにおける発現と機能については全く知られていない。本研究では、ヒト口腔扁平上皮がんにおける HMGI ファミリーの発現と局在について定量的リアルタイム RT-PCR 法および免疫組織化学的染色法で検討を加えた。

材料と方法

1. 細胞株および組織

ヒト口腔扁平上皮がん由来細胞株 (Ca 9-22, HO-1-N-1, HSC-3, KOSC-2, OSC-19, SCC-KN, SCC-TF), 類表皮がん由来細胞株 (A431), 悪性黒色腫由来細胞株 (A375) あるいはヒト大腸がん由来細胞株 (DLD-1) は 大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター (仙台), ヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪), 理化学研究所 (筑波) あるいは American Tissue Culture Collection (Manassas, USA) より購入し、ヒト口腔扁平上皮がん由来細胞株 (HOC-313, TSU)¹³⁾ は 大学医学部歯科口腔外科より供与された。これらの細胞株を D-MEN あるいは RPMI1640 培地 (10% ウシ胎児血清, 50 μ g/ml ペニシリン・ストレプトマイシン含有) (Gibco BRL, Gaithersburg, Germany) で 37℃, 5% CO₂ 存在下で培養した。また, 市民病院あるいは 大学歯学部附属病院口腔外科で切除したヒト口腔扁平上皮がん組織 6 例 (高分化型 4 例, 中分化型 2 例) を試料とした。さらに、歯科的手術の際に採取したヒト正常歯肉組織 2 例を 25 μ g/ml ディスパーゼ (Gibco BRL) および 0.05% トリプシン処理後、正常歯肉ケラチノサイトを 50 μ g/ml ウシ下垂体抽出物含有 Keratinocyte-SFM (Gibco BRL) 中で単離培養 (37℃, 5% CO₂ 存在下) した¹³⁾。継代 3 代目の正常歯肉ケラチノサイトを試料として用いた。組織試料は患者同意および倫理委員会の承諾のもとに採取を行った。

免疫組織化学的検討を行った試料は、 大学医学部附属病院歯科口腔外科を受診した口腔扁平上皮がん患者 33 症例のがん組織を患者同意のもと、生検あるいは手術切除時に採取した (舌 15 例, 頬粘膜 2 例, 歯肉 10 例, 口底部 4 例, 口唇部 2 例)。それらを 10% ホルマリン固定後、パラフィン

包埋ブロックを作製した。病理組織学的分化度は、高分化型 18 例, 中分化型 10 例, 低分化型 5 例であった。リンパ節転移は 33 例中 11 例に認められた。正常口腔組織は頭頸部がん既往歴のない患者の同意を得て手術時に採取した。

2. 逆転写 (reverse-transcription, RT) -PCR

細胞密度が 70~80% の培養細胞あるいはがん組織から TRIzol reagent (Gibco BRL) を用いて全 RNA を抽出した。Super Script II (Gibco BRL) を用いて RT 反応を行い cDNA を作製した。その後、HMGIC エクソン 2 プライマー、HMGIC エクソン 5 プライマー (0.5 μ M) (表 1) および Taq DNA ポリメラーゼ (Gibco BRL) を用いて、35 サイクルの PCR 反応 (94℃ 30 秒, 65℃ 30 秒, 72℃ 1 分) を行い、HMGIC 遺伝子断片を増幅した。組織から抽出した全 RNA については同様にエクソン 2 およびエクソン 5 プライマー (0.5 μ M) を用いて PCR 反応 (94℃ 30 秒, 65℃ 30 秒, 72℃ 1 分) を 20 サイクル行った。その後、反応溶液 (1 μ l) を鋳型としてエクソン 3 プライマー (0.5 μ M) とエクソン 5 プライマー (0.5 μ M) を用いたネステッド PCR (94℃ 30 秒, 65℃ 30 秒, 72℃ 1 分) を 35 サイクル行った。E-カドヘリン (E-Cadherin 以下 CDH1 と略) とグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (以下 GAPDH と略) についてはランダムヘキサマー (Gibco BRL) を用いた RT 反応後、Taq DNA ポリメラーゼ存在下で 30 サイクルの PCR 反応 (94℃ 30 秒, アニーリング温度 30 秒, 72℃ 1 分) を行った。アニーリング温度は CDH1 では 56℃ とし、GAPDH に対しては 52℃ とした。得られた遺伝子増幅断片は 2% 寒天ゲル電気泳動後に観察した。

3. ウエスタンブロット法

TSU, HOC-313, KOSC-2, OSC-19 細胞株の粗核抽出画分を Dignam ら¹⁷⁾ の方法に従い抽出した。核抽出画分 (35 μ g) を還元下で SDS-PAGE (14% アクリルアミド) 後、ニトロセルロース膜に転写した。その後、抗 HMGIC 抗体 ($\times 600$ 希釈) およびビオチン化抗ウサギ IgG ($\times 2000$ 希釈) でインキュベートし、avidin-biotin-immunocomplex (DAKO) および DAB と反応させた。

4. 定量的リアルタイム RT-PCR

HMGIC, HMGI, HMGY, CDH1 あるいは GAPDH 遺伝子の発現レベルを ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用い、Pfaffle¹⁴⁾ の方法に従い mRNA の定量分析を行った。各プライマーは Computer-assisted Program (Primer Express version 1.5a, Applied Biosystems) を使用して設計した (表 1)。PCR 反応時 (94℃ 15 秒, 58℃ 1 分) の目的遺伝子増幅断片量が 50% となるサイクル数を Ct とした。内部標準である GAPDH の Ct (Δ Ct) に基

表1 PCR 用プライマー配列

RT-PCR		
プライマー名		塩基配列
HMGIC	エクソン 5	5' -CTTCAAAAGATCCAAGTCTGCTGAGG-3'
	エクソン 3	5' -CAAAAACAAGAGTCCCTCAAAGCAGC-3'
	エクソン 2	5' -CCGGTGAGCCCTCTCCTAAGAGACCC-3'
CDH 1	Forward	5' -AGCCATGGGCCCCTTG-3'
	Reverse	5' -CCAGAGGCTCTGTACCTTC-3'
GAPDH	Forward	5' -GTCAGTGGTGGACCAGACCT-3'
	Reverse	5' -AGGGGAGATTCACTGTGGTG-3'

定量的リアルタイム RT-PCR		
プライマー名		塩基配列
HMGIC	Forward	5' -CAGCAGCAAGAACCAACCG-3'
	Reverse	5' -TGTTGTGGCCATTCCTAGGT-3'
HMGI	Forward	5' -CAGCGCTGGTAGGGAGTCA-3'
	Reverse	5' -TTCCTTCCTGGAGTTGTGGTG-3'
HMGY	Forward	5' -CAAGCAGCCTCCGAAGGA-3'
	Reverse	5' -CCGGGTCTTGGCAGCAC-3'
CDH 1	Forward	5' -AAGGAGGCGGAGAAGAGGAC-3'
	Reverse	5' -CGTCGTTACGAGTCACCTCAGG-3'
GAPDH	Forward	5' -AAGCCCATCACCATCTTCCAG-3'
	Reverse	5' -CCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

づいて検体間の全 RNA 量の誤差を標準化し, A431細胞の Ct に対する相対比で算出した ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

5. 免疫組織化学的検討

口腔扁平上皮がんおよび正常口腔組織のパラフィン包埋切片 (4 μ m) を脱パラフィン後, 0.01M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ (500W) 処理, 0.1%トリプシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) あるいは 200 μ g/ml proteinase K (DAKO, Glostrup, Denmark) 処理を行った. ウサギ抗 HMGIC 抗体 ($\times 600$ 希釈)¹⁵⁾, マウス抗 PCNA 抗体 (PC10, 0.4 μ g/ml, Sigma-Aldrich) あるいはヤギ抗 CDH 1 抗体 (HECD-1, 20 μ g/ml, R&D System, Minneapolis, USA) を 4℃で16時間反応させた. 抗 HMGIC 抗体は, HMGIC に特異的で HMGI (Y) には交差反応を示さないものを用いた¹⁵⁾. 二次抗体として Alexa Fluor 488ヤギ抗マウス IgG あるいは Alexa Fluor 546ヤギ抗ウサギ IgG (Molecular Probes, Eugene, USA) を用い, 蛍光顕微鏡下で観察した. 陰性コントロールとして一次抗体の代わりに非免疫 IgG を用いた. また, 抗 HMGIC 抗体反応後にビオチン化二次抗体 (DAKO) をインキュベートし, avidin-biotin-immunocomplex (DAKO) および 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (以

下 DAB と略) (Sigma-Aldrich) を使用して発色反応を行った. その後, 顕微鏡下40倍で無作為に選んだ3000個以上のがん細胞に対する HMGIC 陽性がん細胞率を各検体について, 細胞核のみに明らかな染色性を認めたもののみを陽性細胞とし算定した. また, 転移リンパ節における HMGIC 陽性がん細胞率も同様に算定した.

6. 統計学的検討

定量的リアルタイム RT-PCR で得られた細胞株の遺伝子発現レベルと CDH 1 発現の有無を一元配置分散分析および Scheff の多重比較で検討した. また, ヒト口腔扁平上皮がんの組織切片における HMGIC 陽性がん細胞率と組織学的あるいは臨床的パラメーターの関連を Kruskal-Wallis あるいは Mann-Whitney U 検定法で解析した.

結 果

1. 口腔扁平上皮がん組織・細胞における HMGIC 発現

RT-PCR の結果, 正常歯肉組織では HMGIC の発現は認められなかった. しかし, 口腔がん組織 6 例中 3 例において 259bp の HMGIC 遺伝子断片が増幅された (写真 1A).

写真1 HMGICのRT-PCRによるmRNA発現およびウエスタンブロットによるタンパクレベル発現

口腔扁平上皮がん組織では、6例中3例に発現がみられたが、正常歯肉組織では認められなかった(A)。口腔扁平上皮がん細胞株では、CDH1陽性群でのみ発現が確認された(レーン3:TSU,レーン4:HOC-313,レーン5:HSC-3,レーン6:Ca9-22,レーン7:SCC-KN,レーン8:HO-1-N-1,レーン9:KOSC-2,レーン10:OSC-19,レーン11:SCC-TF)(B)。タンパクレベルでは、CDH1陽性群で19kDa付近に発現がみられた(CDH1弱・陰性群;レーン1:TSU,レーン2:HOC-313,CDH1陽性群;レーン3:KOSC-2,レーン4:OSC-19)(C)。

この遺伝子断片はネステッドPCRにより216bpに減少し、HMGIC遺伝子の特異的増幅が確認できた。次に、HMGIC発現とCDH1発現パターンと比較検討した。CDH1を発現する細胞株(HO-1-N-1, KOSC-2, OSC-19, SCC-TF)をCDH1陽性群とし、CDH1の発現が弱いあるいは陰性の細胞株(Ca9-22, HOC-313, HSC-3, SCC-KN, TSU)をCDH1弱・陰性群として分類した¹³⁾。CDH1陽性群にHMGIC発現が認められたのに対し、CDH1弱・陰性群では明らかな発現を認めなかった。正常歯肉ケラチノサイトはCDH1強陽性であったが、HMGICの発現は認めなかった(写真1B)。ウエスタンブロット法により、タンパクレベルにおいてもCDH1陽性群に特異的なHMGIC発現が確認された(写真1C)。

HMGIC, HMGIおよびHMGYとCDH1遺伝子の発現レベルを比較するため、定量的リアルタイムRT-PCR法を行った(図1)。CDH1の相対的発現レベルはCDH1陽性群では1.27から7.59(平均値±1S.D. 1.75±0.58)であったのに対し、CDH1弱・陰性群では0から1.13(0.44±0.52)と低い発現量であった($p<0.01$)。HMGICは正常歯肉ケラチノサイト(0.16±0.11)に比較してがん細胞

表2 口腔扁平上皮がん細胞株におけるCDH1, HMGICファミリーの定量的リアルタイムPCRの発現量

	Ct _{target} A431に対する相対比($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	
	CDH1陽性群 (n=4)	CDH1弱・陰性群 (n=5)
CDH1*	1.75±0.58	0.44±0.52
HMGIC**	5.33±3.06	1.96±0.91
HMGI	1.95±0.99	1.14±0.39
HMGY	1.25±0.39	1.14±0.40

* $P<0.01$, ** $P<0.05$

CDH1およびHMGICはCDH1陽性群とCDH1弱・陰性群の間で発現量に有意差が認められた。しかし、HMGI, HMGYでは発現量に差がみられなかった。

(3.09±2.64)で発現レベルが亢進していた($p<0.01$)。また、CDH1弱・陰性群では1.24から3.03で発現量が低かったが(1.96±0.91), CDH1陽性群では1.52から9.19(5.33±3.06)と高い発現量であった($p<0.05$)(表2)。HMGIとHMGYの発現レベルは正常歯肉ケラチノサイトとがん

図1 定量的リアルタイム RT-PCR プロットデータ

口腔扁平上皮がん細胞株 (n=9), CDH1 陽性コントロール (A431), CDH1 陰性コントロール (A375) について HMGIC 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR により定量的に解析した. HMGIC 陽性コントロールとして DLD-1 細胞を用いた.

写真2 HMGIC の組織内局在

同一症例における HMGIC 免疫組織化学染色を示す (A~D). 腫瘍中心部では, がん胞巣中央部 (Cp) と胞巣最辺縁部との間のがん細胞に陽性反応がみられた (A). 浸潤先端部においては, 胞巣最辺縁部のがん細胞 (矢印) と線維芽細胞様細胞 (矢尻) にも陽性反応を示している (B). がん組織に近接した上皮細胞においても, 多数の陽性反応が観察された (C). 腫瘍中心部での非免疫ウサギ IgG を用いた陰性コントロール (D).

Bar, 100 μ m.

表3 HMGIC 陽性率と臨床的パラメーター

分 化 度	高分化型	中分化型	低分化型		<i>P</i>	
	18.77±10.27	11.27±9.50	7.65±6.56		0.028	
ステージ分類	1	2	3	4	<i>P</i>	
	10.50±6.97	17.27±11.72	11.41±7.79	18.93±12.03	0.234	
浸 潤 様 式	1	2	3	4 C	4 D	<i>P</i>
	21.80±13.24	9.63±7.68	16.62±9.29	15.42±13.56	8.08±6.32	0.189
リンパ節転移	－		＋		<i>P</i>	
	13.86±10.74		17.68±9.78		0.242	

HMGIC 陽性率を分化度, ステージ分類, 浸潤様式, リンパ節転移で分類した結果, 各間の有意差はみられなかった。

細胞ともに CDH 1 発現レベルに関連がなく, 口腔扁平上皮がん細胞では HMGI (Y) 遺伝子の選択的発現を伴わないと考えられる。

2. 口腔扁平上皮がん組織における HMGIC 発現細胞の同定

(1) がん組織中心部における発現パターン

がん組織全体の最中心部あるいは, それに近接した部位をがん組織中心部とした。がん組織中心部において, HMGIC は免疫組織化学的にがん胞巣に陽性反応を認めた。しかし, がん胞巣中央部と最辺縁部では陰性であった (写真 2A)。がん細胞の HMGIC 陽性率はリンパ節転移の有無, 生存率, 腫瘍の大きさ, ステージ分類, 浸潤様式などと統計学的有意差は認められなかった。しかし, 分化度が低下するに従い HMGIC 陽性率は減少する傾向にあった (高分化型, 18.77±10.27; 中分化型, 11.27±9.50; 低分化型, 7.65±6.56) ($p<0.05$) (表 3)。がん組織中心部において, がん胞巣の間にある線維芽細胞様細胞には, ほとんど陰性であった。正常口腔組織 (歯肉, 舌, 頬粘膜) では, 上皮細胞・間質細胞ともに HMGIC 陽性反応を認めなかった。RT-PCR において HMGIC の発現は CDH 1 陽性群で上昇していたことから, 次にヒト口腔扁平上皮がんの組織切片における HMGIC と CDH 1 の局在を蛍光二重染色法で観察した。CDH 1 はがん胞巣に陽性であったが, 胞巣最辺縁部のがん細胞には染色されなかった。HMGIC は胞巣内の CDH 1 陽性がん細胞に局在し, 最辺縁部がん細胞には陰性であった (写真 3D)。また, 増殖細胞のマーカーの一種である PCNA との局在を比較した。PCNA は胞巣最辺縁部のがん細胞のみに局在し, HMGIC の局在とは一致しなかった。

(2) 浸潤先端部の発現パターン

がん組織の最も外側に位置し, 周囲結合組織中に浸潤していると考えられる部位, すなわち, がん組織浸潤先端部

においては, がん胞巣最辺縁部のがん細胞と周囲の線維芽細胞様細胞にも HMGIC 陽性反応を認めた (写真 2B)。リンパ節転移例においては, 浸潤先端部がん細胞に HMGIC 陽性となる症例の割合が増していた。すなわち, 転移を伴わない症例では 22 例中 11 例 (50.0%) が陽性であるに留まり, 転移例では 11 例中 10 例 (90.9%) が陽性であった ($p<0.05$)。浸潤先端部における線維芽細胞様細胞の HMGIC 染色性とリンパ節転移の有無について明らかな差は認められなかった。転移リンパ節中のがん細胞 HMGIC 陽性率は, 原発部位の陽性率とほぼ同一であった ($n=5$)。正常口腔組織では HMGIC は陰性であったが, がん組織に近接した上皮細胞ではしばしば陽性であった (写真 2C)。蛍光二重染色では HMGIC は胞巣最辺縁部がん細胞と線維芽細胞様細胞 (CDH 1 および PCNA 陽性) にも陽性反応を示した (写真 3E, および 3F, 表 4)。

考 察

1. 口腔扁平上皮がんにおける HMGIC の発現

がん発生のメカニズムを遺伝子レベルで解明する研究が近年活発に行われているが, がん増悪を招く分子機構, すなわち, より浸潤転移能を高めていくメカニズムは依然として不明な点が多い。がん組織中で活性化される遺伝子と胎児発生期に働く分子機構は類似していることが知られている¹⁶⁾。したがって, がんの発生と胎児期の発生に働く遺伝子の共通性と相違性を明らかにすることは, がん発生および増悪のメカニズムを解明する糸口になると推察される。本研究においてはこの点に注目し, 胎生期特異的遺伝子である HMGI ファミリーの発現と局在についてヒト口腔扁平上皮がん細胞株および組織を用いて, RT-PCR および免疫組織化学染色法で検討を加えた。HMGIC は胎生期特異的に主に間質系細胞に発現するとされている³⁻⁷⁾。し

写真3 HMGIC と CDH 1 あるいは PCNA との蛍光二重染色写真

同一症例の腫瘍中心部 (A) および浸潤先端部 (B, C) の H-E 染色写真を示す。それらの切片上で蛍光二重染色を行った (D~F)。腫瘍中心部における CDH 1 (緑) と HMGIC (赤) の二重染色 (D)。がん組織浸潤先端部における CDH 1 (緑) と HMGIC (赤) (E) あるいは、PCNA (緑) と HMGIC (赤) (F) の二重染色写真。PCNA (緑) と HMGIC (赤) を同時に発現する細胞が観察される (黄)；がん細胞 (矢尻) および線維芽細胞様細胞 (矢印) (F)。Bar, 50 μ m (A, B, D, E) and 25 μ m (C, F)

表4 口腔扁平上皮がん組織における HMGIC 免疫組織化学染色のまとめ

	腫瘍中心部			浸潤先端部		
	胞巣	最辺縁部	間質細胞	胞巣	最辺縁部	間質細胞
HMGIC	+	—	—	+	+	+
CDH 1	+	—	—	+	—	—
PCNA	—	+	+ / —	—	+	+

HMGIC 免疫組織染色の結果を腫瘍中心部と浸潤先端部について、がん胞巣の中央部と最辺縁部を除くがん細胞 (胞巣)、胞巣最辺縁部のがん細胞 (最辺縁部) および胞巣周囲の線維芽細胞様細胞 (間質細胞) について記載する。

かし、今回の実験により口腔扁平上皮がん細胞にも発現することが初めて明らかになった。

2. 浸潤先端部における HMGIC の発現

ヒト口腔扁平上皮がんの組織切片において、免疫組織化学的に HMGIC は腫瘍中心部と浸潤先端部で異なる局在を

示した。腫瘍中心部ではがん胞巣の中央部と最辺縁部以外のがん細胞に局在したが、浸潤先端部では胞巣最辺縁部がん細胞と周囲間質細胞にも明らかな陽性反応を示した。がん胞巣最辺縁部の CDH 1 陰性がん細胞に HMGIC 発現を認め、一部のがん細胞は細胞増殖マーカーである PCNA に

も陽性反応を示した。ヒト大腸がん組織の浸潤先端部のがん細胞は他の細胞増殖マーカーとなるサイクリン D1 や K i67 に陽性であるにも関わらず、サイクリン依存性キナーゼインヒビターの p16^{INK4A} が発現するため、細胞増殖活性が低く抑えられている¹⁸⁾。したがって、HMGIC 発現の意義を単純に細胞増殖性のみで帰結することは適切でないと思われる。

また、本研究において、がん組織浸潤先端部のがん細胞に HMGIC 陽性反応を示す症例の割合がリンパ節転移例で増加していた。浸潤先端部のがん細胞はしばしばビメンチンに陽性であり¹⁹⁾、より間質系細胞に近い形質を示すことが知られている⁸⁾。HMGIC は間質系細胞形質の獲得等のがん細胞増悪に作用した結果、口腔扁平上皮がん細胞のリンパ節転移に関与した可能性がある。

3. 腫瘍中心部における HMGIC の発現

RT-PCR および定量的リアルタイム RT-PCR で口腔扁平上皮がん由来培養細胞株における HMGIC 遺伝子の発現を検討したところ、CDH1 陽性群細胞株における HMGIC 発現レベルは CDH1 陰性群細胞株および正常歯肉ケラチノサイトに比較して有意に亢進していることが判明した。実際、ヒト口腔扁平上皮がんの組織切片における HMGIC 陽性がん細胞率も高分化型がん組織で有意に亢進していた。がん組織中心部では、HMGIC はがん胞巣の中央部と最辺縁部を除く CDH1 陽性および PCNA 陰性がん細胞に局在していた。正常口腔上皮組織の上皮細胞は CDH1 陽性であったが、HMGIC の発現は認められなかった。しかし、がん組織に隣接する口腔上皮組織では多数の CDH1 および HMGIC 陽性上皮細胞を認めた。がんに接する上皮細胞は軽度の異型性を示し、遺伝学的に何らかの異常を伴うため²⁰⁻²²⁾、切除手術後の再発の原因になると報告されている^{23, 24)}。また、染色体安定細胞株に HMGI 遺伝子を導入すると染色体転座を引き起こすことも知られている²⁴⁾。以上のことから、HMGIC は、口腔扁平上皮がん発生の初期段階に伴う遺伝子学的不安定性に関与している可能性が考えられた。

4. HMGIC 発現の意義と今後の課題

Reeves ら²⁵⁾ はヒト乳がん細胞に HMGI (Y) を導入して誘導される下流遺伝子を網羅的に解析した。その結果、ビメンチンやコラーゲンなどの間質系細胞に特徴的な遺伝子とともに、高分子量サイトケラチンやカドヘリンなどの分化型細胞に特徴的な分子も誘導することを報告した。過去の多くの研究から、HMGI ファミリーはがん増悪に促進的に働くことは明らかであるが^{8, 10-12, 25, 26)}、HMGIC の造腫瘍性・増殖性・(脱)分化等のがん細胞動態に対する作用は複雑であると考えられる。また、実際のがん組織中では細胞-間質相互作用等の影響も大きいと考えられること

から、細胞培養系で得られた結果と異なる分子機能を併せもつ可能性は十分に考えられる。HMGIC の標的遺伝子や相互作用する転写因子は明らかになっていないが、機能的に類似した分子活性をもつ HMGI/Y は NF- κ B, c-JUN, SPI などの転写因子と直接的に結合し、標的遺伝子の転写を促進的あるいは抑制的に制御することが知られている^{5, 9, 26)}。今後、口腔扁平上皮がんにおける HMGIC 標的遺伝子を検討し、HMGIC 発現の意義と病態への関与について明らかにすることが重要な課題と考えられる。

結 語

口腔扁平上皮がん細胞株および組織における HMGIC の発現および局在を検討した。

1. 口腔扁平上皮がん HMGIC が発現することを初めて明らかにした。

2. 培養がん細胞株において、HMGIC 発現レベルは CDH1 発現細胞株で亢進していた。

3. 免疫組織化学的検討では、HMGIC はヒト口腔扁平上皮がん組織の腫瘍中心部のがん胞巣に局在した。胞巣中央部および最辺縁部のがん細胞 (CDH1 陰性・PCNA 陽性) には発現を認めなかった。

4. がん組織の浸潤先端部においては、HMGIC は胞巣最辺縁部がん細胞および周囲の線維芽細胞様細胞にも陽性反応がみられた。

5. がん組織浸潤先端部における HMGIC 染色陽性症例の割合は、頸部リンパ節転移症例で有意に増加していた。以上の結果より、HMGIC は口腔がん細胞の細胞形質の変化やがん増悪に関与している可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるに臨み、検体試料を賜りました■■■■大学口腔外科学第2講座坂下英明教授、■■■■市民病院歯科口腔外科五百蔵一男部長に謹んで御礼申し上げます。また、病理標本の提供を賜りました■■■■大学歯科口腔外科学講座山本悦秀教授ならびに川尻秀一助手に厚く御礼申し上げます。また、本研究を行うにあたりご協力賜りました日本歯科大学歯学部生化学講座各位に心から感謝申し上げます。

引 用 文 献

- 1) 本間 泉監修：国立がんセンター中央病院初回入院患者に係る5年生存率。国立がんセンター年報 16: 162-164 2001.
- 2) Arias, A.M.: Epithelial mesenchymal interaction in cancer and development. Cell 105: 425-431 2001.
- 3) Zhou, X., Benson, K.F., et al.: Genomic struc-

- ture and expression of the murine Hmgi-c gene. *Nucleic Acids Res* 24: 4071-4077 1996.
- 4) Hess, J.L.: Chromosomal translocation in benign tumors. The HMGI proteins. *Am J Clin Pathol* 109: 251-261 1998.
 - 5) Reeves, R. and Beckerbauer, L.: HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochem Biophys Acta* 1519: 13-29 2001.
 - 6) Arlotta, P., Tai, A.K.F., et al.: Transgenic mice expressing a truncated form of the high mobility group I-C protein develop adiposity and an abnormally high prevalence of lipomas. *J Biol Chem* 275: 14394-14400 2000.
 - 7) Battista, S., Fidanza, V., et al.: The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res* 59: 4793-4797 2000.
 - 8) Rogalla, P., Drechsler, K., et al.: Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade. *Mol Carcinog* 19: 153-159 1997.
 - 9) Scala, S., Portella, G., et al.: HMGI-C gene expression is not required for in vivo thyroid cell transformation. *Carcinogenesis* 22: 251-256 2001.
 - 10) Kim, D.H., Park, Y.S., et al.: Expression of the HMGI (Y) gene in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 84: 376-380 1999.
 - 11) Tamimi, Y., van der Poel, H.G., et al.: A retrospective study of high mobility group protein I (Y) as progression marker for prostate cancer determined by in situ hybridization. *Brit J Cancer* 74: 573-578 1996.
 - 12) Berlingieri, M.T., Manfioletti, G., et al.: Inhibition of HMGI-C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells. *Mol Cell Biol* 15: 1545-1553 1995.
 - 13) Yokoyama, K., Kamata, N., et al.: Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncology* 37: 65-71 2001.
 - 14) Pfaffle, M.W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007 2001.
 - 15) Zhou, X., Benson, K., et al.: Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376: 771-774 1995.
 - 16) Hay, E.D.: An overview of epithelo-mesenchymal transformation. *Acta Anat* 154: 8-20 1995.
 - 17) Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., et al.: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acid Res* 11: 1475-1489 1983.
 - 18) Jung, A., Schrauder, M., et al.: The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear β catenin, cyclin D 1, and p16^{INK4A} and is a region of low proliferation. *Am J Pathol* 159: 1613-1617 2001.
 - 19) Imai, K., Kumagai, S., et al.: Immunolocalization of desmoglein and intermediate filaments in human oral squamous cell carcinomas. *Head Neck* 17: 204-212 1995.
 - 20) Leong, P.P., Rezai, B., et al.: Distinguishing second primary tumors from lung metastasis in patients with head and neck squamous cell. *J Natl Cancer Inst* 90: 972-977 1998.
 - 21) Califano, J., Leong, P.L., et al.: Second esophageal tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma: an assessment of clonal relationships. *Clin Cancer Res* 5: 1862-1867 1999.
 - 22) Forastiere, A., Koch, W., et al.: Head and neck cancer. *N Engl J Med* 345: 1890-1900 2001.
 - 23) Deng, G., Lu, Y., et al.: Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* 274: 2057-2059 1996.
 - 24) Takaha, N., Hawkins, A.L., et al.: High mobility group protein I (Y): a candidate architectural protein for chromosomal rearrangements in prostate cancer cells. *Cancer Res* 62: 647-651 2002.
 - 25) Reeves, R., Edberg, D.D., et al.: Architectural transcription factor HMGI (Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Mol Cell Biol* 21: 575-594 2001.
 - 26) Zhou, X. and Chada, K.: HMGIC family proteins: architectural transcription factors in mammalian development and cancer. *Keio J Med* 47: 73-77 1998.