

ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-3におけるHsp47の発現

奥山典子 遊佐淳子 伊東博司

Expression of Hsp47 in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line, HSC-3

Noriko OKUYAMA, Junko YUSA and Hiroshi ITO

Heat shock protein 47 (Hsp47) participates in the synthesis of various types of collagen as a collagen-specific molecular chaperone. Hsp47 is expressed not only in the collagen-producing cells but also in normal and neoplastic keratinocytes, but the role of Hsp47 in keratinocytes is not clear. To resolve this problem, we examined the expression pattern of Hsp47 in human oral squamous cell carcinoma cell line, HSC-3, by Western blot and RT-PCR analyses at three culture stages, i.e., proliferating stage, confluent stage, and post-confluent stage. The mRNA levels of type IV collagen and laminin 5, major components of basement membrane, were analyzed at the same culture stages. To examine the intracellular spatial relationship of Hsp47 and type IV collagen expression, a double-immunofluorescence was performed at the proliferating stage. We also examined the expression pattern of other types of collagen by RT-PCR.

The Hsp47 expression increased in terms of protein and mRNA levels with the proliferation of cells and decreased after the confluence. The mRNA of type IV collagen showed almost the same expression pattern as that of Hsp47, implying a direct relationship between the two types of molecules. Unlike Hsp47 and type IV collagen, the mRNA level of laminin 5 at the proliferating stage was as high as at the confluent stage and decreased at the post-confluent stage. The decrease of these molecules may indicate the decreased production of basement membrane. The intensity of immunofluorescence staining of type IV collagen was detected in filopodia of the cells located at the periphery of the colonies, suggesting the production of basement membrane for cell migration. The co-expression of Hsp47 and type IV collagen visualized by the double-immunofluorescence was found in the perinuclear region, implying the bind of both molecules in endoplasmic reticulum.

The present results provide more definite evidence for the hypothesis that the expression of Hsp47 in the keratinocytes participates in the synthesis of type IV collagen which is used to produce basement membrane which enables cell migration. The decreased expression of Hsp47 and type IV collagen in HSC-3 cells at the post-confluent stage may facilitate the motility of neoplastic cells through the attenuation of cell-matrix contact.

Key words : Hsp47, type IV collagen, basement membrane, migration

緒言

熱ショックタンパク質 (Hsps) は細胞が高温にさらされた際に、発現が増加するタンパク質として1974年に同定された¹⁾。その後、熱だけでなく活性酸素や重金属、紫外線、低酸素、細菌感染などのストレスにも応答し、細胞を保護することから広くストレスタンパク質と称されるようになった。しかし1980年代半ばには、さらにストレス下の細胞だけでなく、正常の細胞にも発現し、タンパク質の折りたたみや会合を助ける分子シャペロンとして機能することが明らかにされた²⁾。Hsps は分子シャペロンとして分子量の違いからいくつかのファミリーに分類されており、ストレスによって変性したタンパク質や折りたたみに異常があり機能できないタンパク質に結合して修復する、修復が不可能な場合は分解へ導く、などタンパク質の「品質管理」を担っている³⁾。

Hsp47は1986年に Nagata らによって発見された47kDaのストレスタンパク質であり、コラーゲンにのみ結合する特異的な分子シャペロンであることが知られている⁴⁻⁶⁾。Hsp47は小胞体においてプロコラーゲンにあるプロリン-アルギニン-グリシン配列を認識して結合し⁷⁾、プロコラーゲンとともに小胞体からゴルジ装置シス面まで輸送される。この過程でHsp47はプロコラーゲン三重らせんの形成やプロコラーゲンの分子成熟・プロセッシングに参与している。その後Hsp47はゴルジ装置でプロコラーゲンから解離し、小胞体に戻り、再利用されると考えられている^{8,9)}。このようにHsp47はコラーゲン産生においてシャペロン機能、すなわちコラーゲン産生の介助を行っているため、近年ではHsp47の発現を抑制することで、尿細管間質線維化のような線維性疾患の治療や癒痕形成を改善する方法が研究されている^{10,11)}。Hsp47ノックアウトマウスの解析からHsp47が発現しないとコラーゲンが正常な三本鎖を作ることができず、従ってマウス胎児の組織中にはコラーゲン線維や基底膜が形成されないことが報告されている¹²⁻¹⁵⁾。また櫻井らはラット上皮組織におけるHsp47の発現を調べ、Hsp47がコラーゲン産生細胞である線維芽細胞以外の細胞、

すなわちコラーゲン産生を本来の機能とはしない重層扁平上皮基底細胞や血管内皮細胞、平滑筋細胞においても発現していることを報告した¹⁶⁾。さらに上皮性腫瘍細胞においてもHsp47の発現がいくつか報告されている^{17,18)}。これらの細胞は自らが基底膜を形成する点で共通しているため、上皮細胞においては、Hsp47は基底膜の主な構成成分であるIV型コラーゲンの産生に関与する可能性が示唆されているが、それを立証した報告はほとんどない。また上皮性腫瘍細胞については、特に扁平上皮癌細胞を用いてHsp47と浸潤や転移との関係が臨床病理学的に研究されているが、見解に相違が多く、その詳細は明らかにされていない。

そこで本研究は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-3を用い、上皮細胞におけるHsp47の発現とIV型コラーゲン産生との関係、および扁平上皮癌細胞における浸潤、転移との関係を明らかにすることを目的とした。単層培養においては、播種された細胞は増殖に伴って拡散するために移動するが、この際、基底膜の産生を必要とする。そこでこの点に注目し、各増殖段階でのHsp47発現とIV型コラーゲン産生との関係を検討した。

材料と方法

1. 細胞培養

ヒト口腔扁平上皮癌細胞、HSC-3 (JCRB0623, HSRRB, Tokyo) に加え、比較検討のためにラット正常ケラチノサイト、FRSK (JCRB0005, HSRRB) を用いた。両細胞は10%ウシ胎児血清 (FBS), 100 units/ml ペニシリン, 100 mg/ml ストレプトマイシンを含むEagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地 (Invitrogen, USA) で培養した。すべての実験において細胞は2500 cells/cm²の密度で播種し、CO₂インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で培養した。培養初期は48時間ごと、confluent 近くは24時間ごと、confluent 後は12時間ごとに培地を交換した。

2. 成長曲線

HSC-3細胞を35mm ディッシュ (NUNC, USA) に播種し、1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13日目 (n=3) に0.25%トリプシン, 0.2mM EDTA, Dulbecco's リン酸バッファー (PBS) を用いて

ディッシュから細胞をはがして回収し、血球計算板を用いて計測した。同様の実験を3回繰り返した。

3. 試料採取

HSC-3細胞を60mm ディッシュ (NUNC) に播種、培養し、成長曲線を作製した (図1A)。それを元に活発な細胞増殖が行われている培養4日を増殖期、ほぼ confluent になる培養7日を confluent 期、細胞移動が停止したと考えられる培養9日を confluent 期以降とし、それらを検索対象として以下の検討を行った。また、FRSK 細胞については、成長曲線を元に HSC-3細胞と同様の細胞密度となる培養5日、8日、11日を選択した。

4. WST-8 アッセイによる細胞活性の測定

HSC-3細胞を96穴プレート (NUNC) に播種して各段階まで培養し、Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 同仁化学, 東京) を各ウェルに10 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ Cで発色させた。10 μ lの1% SDS を添加することで反応を停止させ、反応液を適宜希釈して、マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定した。細胞培養液中の濁りによるバックグラウンドを排除するために、650nmの吸光度を測定し、実測値から差し引いた。

5. Western blot 法によるタンパクの定量

1) タンパク抽出

各段階のディッシュから培地を吸引し、PBSで洗浄後、500 μ lのSDSバッファー (58mM Tris/HCl, pH6.8, 1.7% SDS, 6%グリセロール, 0.8% 2-メルカプトエタノール, 0.002% BPB) を添加し、セルスクレーパー (IWAKI, Tokyo) で細胞と混和させた。それをさらに21Gの注射針 (TERUMO, Tokyo) に通した後、100 $^{\circ}$ Cで5分間加熱したものをタンパク抽出液とした。タンパク抽出液はBio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, USA) を用いて定量した。

2) Western blot

タンパクを10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、セミドライプロット法でpolyvinylidene difluoride membrane (ATTO, Tolyo) に転写させた。非特異的な結合を防ぐために膜を5%スキムミルクを含むPBS, 0.1%

表1 RT-PCR に用いたプライマーの塩基配列

		sequence 5' >3'	増幅断片長
Hsp47	sense	ACTACTACGACGACGAGAAG	361 bp
	antisense	TTGCCATCTGTGTCCAACCTC	
Type IV collagen	sense	AGTTCAGCACAAATGCCCTTC	405 bp
	antisense	AGCTGTAAGCGTTTGCCTAG	
Laminin 5	sense	GGTCTTGATGGGATACAGAG	334 bp
	antisense	CATCTCTGGCCTGTGTAATT	
Type I collagen	sense	CAGACAAGCAACCCAAACTG	241 bp
	antisense	ATGGGTCTTCAAGCAAGTGG	
Type III collagen	sense	TACGGCAATCTGAACTTCC	245 bp
	antisense	GTGTGTTTCGTGCAACCATC	
Type XVIII collagen	sense	ACGCATCTTCTCCTTTGACG	229 bp
	antisense	AATGCAGAGCACAGATGTAGG	
β -actin	sense	GCGAGAAGATGACCCAGATC	300 bp
	antisense	GCTTCTCCTTAATGTCACGC	

Tween-20 (PBS-T) で4 $^{\circ}$ C一晩ブロッキングしたあと、PBS-Tで洗浄した。一次抗体としてマウス抗ヒトHsp47モノクローナル抗体 (1:2000, Stressgen, USA), マウス抗ヒト β -actinモノクローナル抗体 (1:5000, SIGMA, USA) を室温で1時間反応させた後、PBS-Tで洗浄した。ビオチン化二次抗体 (CHEMICON, Germany) を反応させ、さらにHRPをconjugateさせたストレプトアビジン (VECTASTAIN ABC kit, フナコシ, 東京) を反応させ、化学発光 (ECL-plus, Amersham, UK) で検出した。検出されたバンドはImage Jを用いて解析し、それぞれのタンパクの測定値は β -actinの測定値で補正した。

6. RT-PCR

各段階のディッシュより細胞を回収し、acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform (AGPC) 法によりtotal RNAを抽出した。逆転写反応は反応液20 μ l中に0.5 μ g total RNA, 50 units MuLV Reverse Transcriptase, 50 nmol Random Hexamers (Applied Biosystems, USA) を添加して行った。PCR反応は逆転写反応液に15 pmolの特異的な上流, 下流プライマー (表1), 2.5 unitsのAmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems) を加えて、合計で100 μ lとして、step1: 94 $^{\circ}$ C 1分, step2: 57 $^{\circ}$ C 1分, step3: 72 $^{\circ}$ C 2分を1サイクルとしてGeneAmp

PCR system 9700 (Applied Biosystems) で、Hsp47は20サイクル、IV型コラーゲンは27サイクル、III型コラーゲンは23サイクル、XVIII型コラーゲンは23サイクル、ラミニン5は19サイクル、 β -actinは15サイクルのPCR反応を行った。10 μ lのPCR産物を0.5 μ l SYBR Gold (Invitrogen), 0.5 μ l Loading dyeとともに1.5%アガロースゲルで100V, 15分間泳動した。検出されたバンドはImage Jを用いて解析し、それぞれのmRNAの測定値は β -actinの測定値で補正した。

7. 免疫蛍光組織化学的検索

35mm ディッシュの底にカバーガラスを置き、その上でHSC-3細胞を培養したのち、4%パラホルムアルデヒド/5%スクロースで室温10分間固定を行った。PBSで洗浄後、0.5% TritonX-100で室温5分間処理することによって細胞膜の透過性を高めた。次に非特異的反応を防止するため、10%ヤギ正常血清を室温で20分間作用させた。500倍希釈したマウス抗ヒトIV型コラーゲンモノクローナル抗体 (CHEMICON) を一次抗体として4°Cで一晩反応させた。Cy3ヤギ抗マウス二次抗体 (Jackson Immuno Research, USA) を暗所で室温1時間反応後、PBSで洗浄した。再度10%ヤギ正常血清を暗所で室温5分間処理し、Zenon Alexa Fluor 488 Labelling kit (Invitrogen) で標識した250倍希釈のHsp47抗体を暗所で室温1時間反応させた。PBSで洗浄後、再度4%パラホルムアルデヒドで固定を行い、封入して共焦点顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss, Germany) で観察を行った。

8. 統計解析

データは平均値 \pm 標準偏差で表記した。2群の検定はStudent's t-testを用いて検定した。p値が5%未満のとき統計的に有意差があるとみなした。

結 果

1. HSC-3細胞の増殖

増殖期(培養4日)では細胞は約60% confluentであった(図1B)。また confluent 後も細胞は増

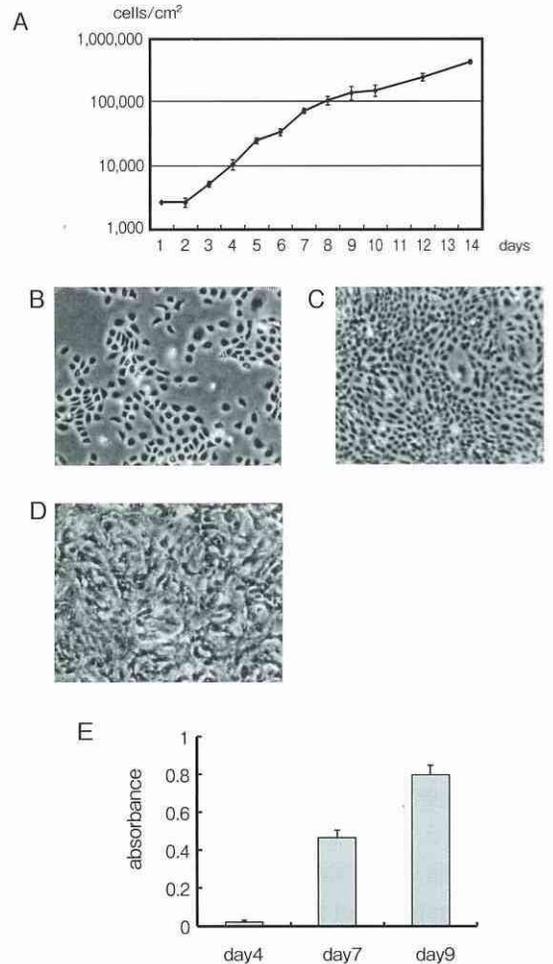


図1 HSC-3細胞の増殖

A: 成長曲線

B: 増殖期(day4, $\times 40$ 対物レンズにて撮影)

C: confluent期(day7, $\times 40$ 対物レンズにて撮影)

D: confluent期以降(day9, $\times 40$ 対物レンズにて撮影)

E: WST-8アッセイにより測定した細胞増殖活性

殖を続け(図1A), confluent期以降(培養9日)では細胞が数層重なり合っている様子が観察された(図1D)。さらに培養4, 7, 9日における細胞活性を測定するために、WST-8アッセイを行った。confluent期(培養7日)からconfluent期以降にかけて細胞数は1.4倍増加しているのに対し(図1A), WST-8アッセイでも細胞数増加に応じた吸光度の増加が見られた(図1E)。

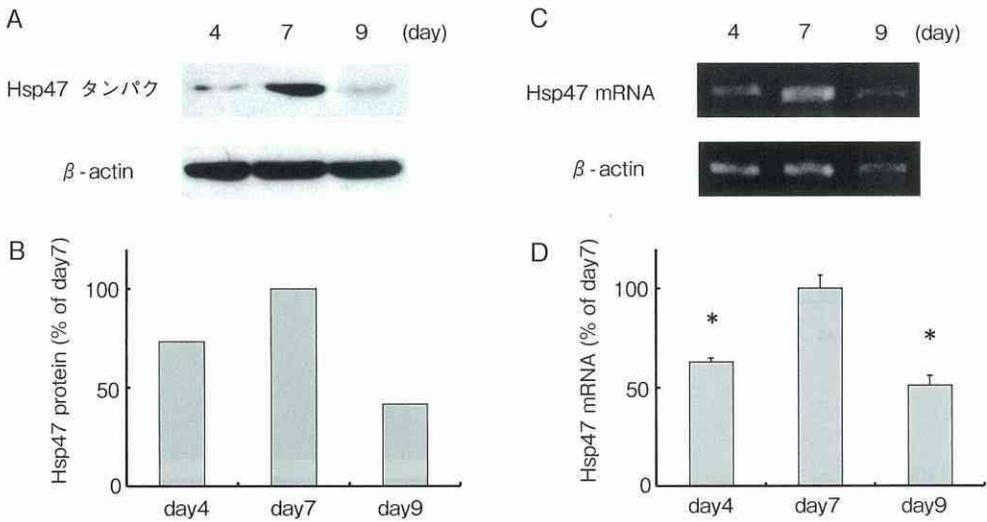


図2 Hsp47の発現

A ; Western blotで検出したHsp47タンパク

B ; Western blotで検出されたバンドを定量化し, confluent期(day7)を100としてグラフに示した。

C ; RT-PCRで検出したHsp47 mRNA

D ; RT-PCRで検出されたバンドを定量化し, confluent期(day7)を100としてグラフに示した。

* $p < 0.001$ はconfluent期(day7)との差が有意であることを示す。

2. Hsp47の発現

培養4, 7, 9日の細胞からタンパクを抽出してHsp47のWestern blotを行った。その結果, 増殖期(培養4日)からconfluent期(培養7日)にかけてHsp47タンパクの発現が増加していた。しかしその発現増加はconfluent期までであり, confluent期以降(培養9日)ではconfluent期に比べて大きく減少していた(図2A, B)。

培養4, 7, 9日の細胞からRNAを抽出してHsp47のRT-PCRを行ったところ, 増殖期からconfluent期にかけてHsp47 mRNAの発現が有意に増加していた。しかしその発現増加はconfluent期までであり, confluent期以降には有意な減少が見られ(図2C, D, $p < 0.001$), Hsp47タンパクと同様の発現パターンを示した。

3. 基底膜構成因子の発現

上皮細胞が産生するコラーゲンとして基底膜の構成成分であるIV型コラーゲンと同じく基底膜の構成成分であるラミニン5についてRT-PCRを

用いて検討を行った。IV型コラーゲン mRNAの発現は増殖期(培養4日)からconfluent期(培養7日)にかけて発現が有意に増加したが(図3A, $p < 0.05$), confluent期以降(培養9日)は有意に減少した(図3A, $p < 0.001$)。一方, ラミニン5では, 増殖期とconfluent期では同程度の発現が認められたが, confluent期以降はconfluent期に比べて有意な減少が観察された(図3B, $p < 0.001$)。

4. Hsp47とIV型コラーゲンの細胞内局在

次に, Hsp47とIV型コラーゲンの細胞内における局在を調べるために, 増殖期(培養4日)のHSC-3細胞においてこれらのモノクローナル抗体に対する蛍光二重染色を行った。Hsp47もIV型コラーゲンも培養したすべての細胞で検出されたが, Hsp47は核の周囲に限局していた(図4A, 矢印)。IV型コラーゲンは細胞全体に観察されたが, コロニー中央の細胞に比べて周辺の細胞が強陽性であった。特に先端のfilopodiaと呼ばれる

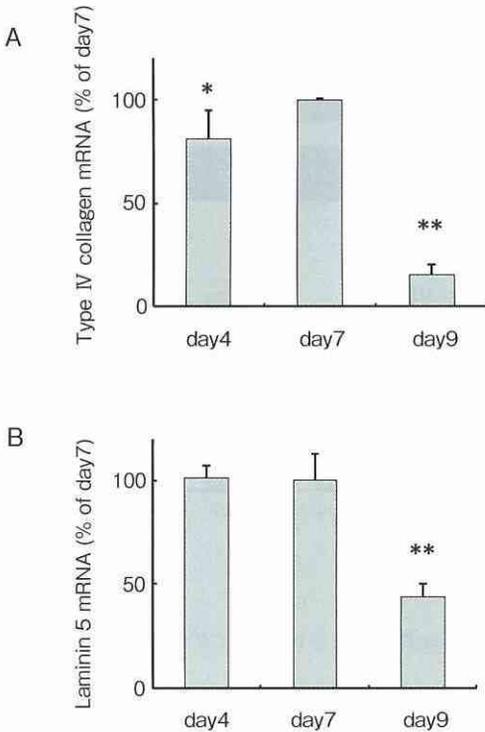


図3 基底膜構成因子の発現

A; IV型コラーゲンmRNA

B; ラミニン5 mRNA

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ はconfluent期(day7)との差が有意であることを示す。

指状仮足に強い陽性反応が認められた(図4, 矢頭)。また周辺部の細胞では核近傍の小胞体もしくはゴルジ装置と考えられる領域でHsp47とIV型コラーゲンが共発現し、重なり合った黄色の標識として観察された(図4B)。

5. 正常ケラチノサイトにおけるHsp47およびIV型コラーゲンの発現

RT-PCRを用いてHsp47とIV型コラーゲンのmRNA発現を検討したところ、Hsp47はHSC-3細胞と同様に増殖期(培養5日)からconfluent期(培養8日)にかけて有意に増加していた(図5A, $p < 0.005$)。しかしconfluent期以降(培養11日)ではconfluent期から細胞数が増加していないにもかかわらず、これらの発現はさらに増加していた(図5A, $p < 0.05$)。同様にIV型コラー

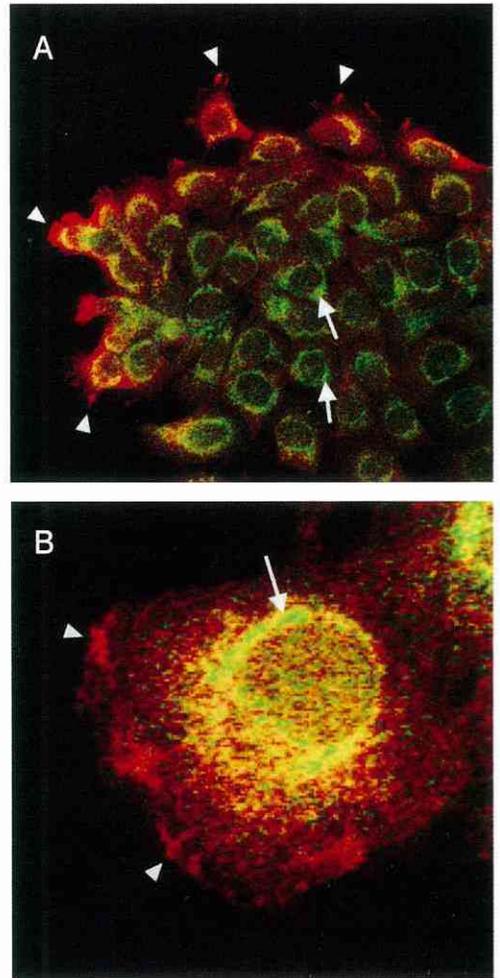


図4 Hsp47とIV型コラーゲンの蛍光二重染色

Hsp47を緑にIV型コラーゲンを赤に染色した。

A; 弱拡大像(×40対物レンズにて撮影)

B; 強拡大像(×63対物レンズにて撮影)

矢印は核周辺のHsp47の発現を示す。

矢頭はfilopodiaを示す。

ゲンにおいても、増殖期からconfluent期以降にかけて有意に増加した(図5B, $p < 0.005$)。

6. 他のコラーゲン分子の発現

HSC-3細胞においてI型コラーゲン、III型コラーゲンおよびXVIII型コラーゲンのmRNA発現をRT-PCRで検討した。その結果、どれも増殖期(培養4日)からconfluent期(培養7日)にかけて有意に増加し、confluent期以降(培養9日)では有意に減少する、という発現パターンを示し

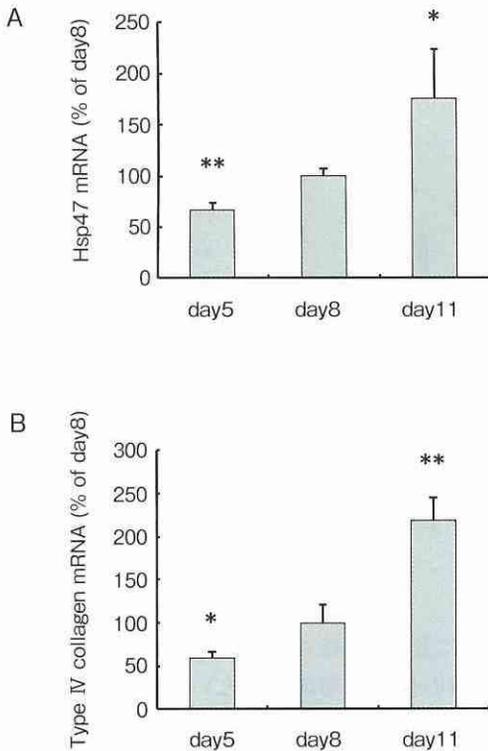


図5 正常ケラチノサイトにおける発現

A ; Hsp47 mRNA

B ; IV型コラーゲンmRNA

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ はconfluent期(day8)との差が有意であることを示す。

た(図6, $p < 0.001$)。

考 察

本研究の目的は、上皮細胞におけるHsp47の発現が基底膜の主成分であるIV型コラーゲンの合成に関わっているとの考えを改めて立証することにある。このために、基底膜形成を前提とする細胞移動に注目して検討を行った。その結果、Hsp47の発現は盛んに細胞移動が行われる増殖期からconfluent期にかけて増加し、細胞移動が停止したconfluent期以降では減少していた。これに呼応して、IV型コラーゲンがHsp47と同じ発現パターンを示した。一方、同じ基底膜の主成分であるラミニン5の発現は増殖期からすでに高く、Hsp47との相関がみられなかった。このことから、

上皮細胞におけるHsp47がIV型コラーゲン特異的な分子シャペロンであることが確認された。このことは蛍光二重染色において小胞体やゴルジ装置が存在する核周囲領域で、Hsp47とIV型コラーゲンの共発現が認められたことから明らかであり、この所見から小胞体でHsp47がIV型コラーゲン合成を介助していることが示唆された。これらの結果から上皮細胞がIV型コラーゲンを産生しており、その産生はHsp47によって介助されている可能性が改めて示された。

培養細胞は増殖とともに基質上を移動し範囲を拡大するが、上皮細胞はその際基底膜の形成を必要とする。今回、基底膜の主成分であるIV型コラーゲンとその産生を介助するHsp47の発現が増殖期からconfluent期にかけて増加していたのは、そのためであると考えられる。蛍光二重染色においても移動の少ないコロニー中央に比べ、活発に移動している周辺部の細胞でIV型コラーゲンがより強い陽性反応を示した。さらには細胞移動の際に細胞質辺縁に形成されるfilopodiaが特に強陽性であったことから、積極的に移動している細胞ではHsp47の発現を増加させることで、活発な基底膜産生を行っていることが示唆される。また、MarutaniらやNagaiらはHsp47のノックアウトマウスの解析から、基底膜はラミニン5によって形成されるが、IV型コラーゲンが産生されないため層構造を維持することができず崩壊し、さらにはI型コラーゲンの構造異常によって、受精後11.5日で致死することを報告している^{12,14}。したがって、今回の結果もHsp47が上皮細胞においてIV型コラーゲンの産生を介助することで基底膜産生に関与していることを示している。

Hsp47やIV型コラーゲンの発現は、扁平上皮癌由来のHSC-3細胞同様、非腫瘍性正常ケラチノサイト由来するFRSK細胞においても、増殖期からconfluent期にかけて増加したが、confluent期以降の発現パターンは二つの細胞で大きく異なっていた。Hsp47とIV型コラーゲンの発現は、HSC-3細胞では有意に減少したのに対し、FRSK細胞ではconfluent期以降も増加を続けた。WST-8アッセイにおいて細胞数増加に応じた吸光度の増加が観察されたことから、

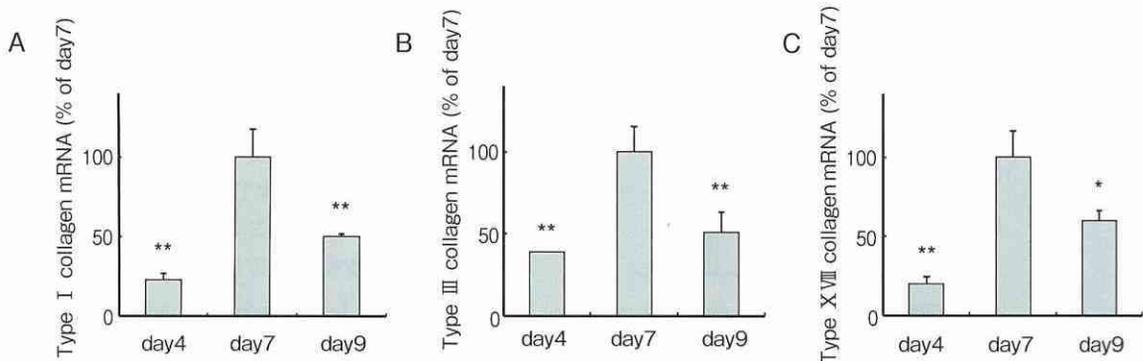


図6 その他のコラーゲンの発現

A; I型コラーゲンmRNA

B; III型コラーゲンmRNA

C; XVIII型コラーゲンmRNA

* p<0.05, ** p<0.001はconfluent期(day7)との差が有意であることを示す。

HSC-3細胞培養において confluent 期以降に見られるこれらの発現減少は、細胞の生活力が低下したためでないことは明らかである。したがって、この所見は正常上皮細胞では confluent 後も基底膜産生を継続するが、一方腫瘍細胞では confluent 後に基底膜の産生が低下することを示唆している。この点は、HSC-3細胞においてIV型コラーゲンだけでなく、ラミニン5の発現が confluent 期以降に有意な減少を示したことから明らかである。このような違いは腫瘍細胞に特有の性質によるものと考えられる。正常上皮細胞の場合、confluent 後は厚い基底膜を形成し基質との接着を強化して組織の安定化を図るのに対し、腫瘍細胞の場合は基底膜産生を低下させることにより基質との接着を弱め、腫瘍細胞としての運動性を確保して周囲への浸潤を容易にしているのかもしれない。しかし、本研究では上皮細胞と基底膜の接着に関与するインテグリンなどの接着分子の発現検討までには至らなかったため、この仮説を立証するにはさらなる研究が必要であろう。

上皮性腫瘍細胞、特に口腔扁平上皮癌における Hsp47の発現についてはいくつか報告されているが、予後や転移との関係について臨床病理学的に研究したものがほとんどである¹⁹⁻²¹⁾。しかしながら、膵臓癌原発巣における Hsp47の発現は正常

組織に比べて高く、悪性度が高くなるほど Hsp47の発現が増加するという報告もあれば¹⁹⁾、一方で、リンパ節転移が見られる原発腫瘍に比べて転移のない腫瘍では Hsp47の発現が高く、Hsp47の発現が高いほど転移が起こりにくいという報告もある²¹⁾などその意義については見解が一致していない。Herbert らは *in vitro* の研究で、類表皮癌細胞の細胞膜に発現する Hsp47が tetraspanin タンパク質である CD9と複合体を形成し、細胞外マトリックスに固着することで細胞の運動性を阻害することを報告し、Hsp47の発現が低いと癌細胞の浸潤に促進的に働く可能性を示唆しており²²⁾、この点本研究における confluent 期以降の結果と一致している。また、基底膜はバリアとしての作用を持つため、その合成に関与する Hsp47は浸潤を抑制する効果を持つのかもかもしれない。しかし伊東らは、口腔扁平上皮癌での免疫組織化学において、浸潤先端部癌巣最外層で Hsp47発現低下を示す所見は見られないと報告しており、Hsp47の浸潤抑制効果には否定的である²³⁾。この問題についてはさらに検討を加える必要がある。

本研究では、上皮細胞における Hsp47発現の意義をさらに明確にするために、他のタイプのコラーゲンの発現についても HSC-3細胞を用いて

検索した。I型コラーゲン、III型コラーゲン、XVIII型コラーゲンのいずれもがHSC-3細胞において発現し、IV型コラーゲン同様、confluent期に向けて増加した後、confluent期以降減少した。癌細胞では浸潤や転移に重要であるepithelial to mesenchymal transition (EMT)に関連してI型コラーゲンやIII型コラーゲンの発現が増加することが報告されている^{24,25)}。したがって、HSC-3細胞におけるこれらコラーゲンの発現は、このような腫瘍化による形質転換を表している可能性がある。しかし、この仮説を立証するにはさらなる実験が必要である。XVIII型コラーゲンはそのC末端にエンドスタチン領域を含有しており、切断されると血管新生抑制因子として働く²⁶⁻²⁸⁾。口腔扁平上皮癌ではHsp47の増加に伴うXVIII型コラーゲンの増加により、エンドスタチンの産生が増加し、血管新生を抑制することで転移が抑制されることが報告されている^{21,29)}が、それがエンドスタチンの産生低下やさらには血管新生抑制の解除に関連しているかどうかは、今回の実験系では判断できない。

結 論

上皮細胞におけるHsp47の発現とIV型コラーゲン産生との関係を証明するために、ヒト口腔扁平上皮癌の単層培養を用い、各増殖段階におけるこれらの発現を検討した。Hsp47の発現は増殖期からconfluent期にかけて増加したが、confluent期以降は有意に減少した。IV型コラーゲンも同様の発現パターンを示した。また、蛍光二重染色ではHsp47とIV型コラーゲンが核周囲の領域で共発現しており、両者の結合が示唆された。以上の結果から上皮細胞においてHsp47はIV型コラーゲンの産生を介助することで細胞移動に必要な基底膜産生に関与していることが示唆され、confluent期以降の両者の減少が腫瘍細胞としての運動性の確保に関与しているとの可能性が考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、多方面からご協力して頂きました本学歯学部口腔機能分子生物学講座口腔生化学分野前教授、

堀内登先生ならびに生体構造学講座口腔組織学分野渡邊弘樹教授に深く感謝いたします。さらに、始終ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました山崎章先生に厚く御礼申し上げます。最後に数々のご協力をいただきました口腔病理学分野教室員の皆様に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第48回奥羽大学歯学会（平成21年11月 郡山）および第51回歯科基礎医学会（平成21年9月 新潟）において発表した。

文 献

- 1) TissiBres, A., Mitchell, H. K., Tracy, U. : Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84** : 389-398 1974.
- 2) 由良 隆 : ストレス応答研究の歴史. ストレス蛋白質 (永田和宏編) ; 1-9 中外医学社 東京 1994.
- 3) 永田和宏, 森 正敬, 吉田賢右 : フォールディングによる品質管理. 分子シャペロンによる細胞機能制御 (永田和宏編) ; 88-99 シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社 東京 2001.
- 4) Nagata, K., Saga, S. and Yamada, K. M. : A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J. Cell. Biol.* **103** ; 223-229 1986.
- 5) Saga, S., Nagata, K., Chen, W. T. and Yamada, K. M. : pH-dependent function, purification and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J. Cell. Biol.* **105** ; 517-527 1987.
- 6) Nagata, K., Hirayoshi, K., Ohara, M., Saga, S., Yamada, K. M. : Biosynthesis of a novel transformation-sensitive heat shock protein that bind to collagen. *J. Biol. Chem.* **263** ; 8344-8439 1988.
- 7) Koide, T., Takahara, Y., Asada, S., Nagata, K. : Xaa-Arg-Gly triplets in the collagen triple helix are dominant binding sites for the molecular chaperone Hsp47. *J. Biol. Chem.* **277** ; 6178-6182 2002.
- 8) Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S. I., Hosokawa, N., Nagata, K. : Intracellular interaction of collagen specific stress protein hsp47 with newly synthesized procollagen. *J. Cell. Biol.* **133** ; 469-483 1996.
- 9) Sauk, J. J., Norris, K., Herbert, C., Ordonez, J., Reynolds, M. : Hsp47 binds to the KDEL receptor and cell surface expression is modulated by cytoplasmic and endosomal pH. *Connect. Tissue Res.* **37** ; 105-119 1998.

- 10) Xia, Z., Abe, K., A, Furusu., Miyazaki, M., Obata, Y., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S. : Suppression of renal tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA targeting heat shock protein 47. *Am. J. Nephrol.* **28** ; 34-46 2007.
- 11) Wang, Z., Li, L. : Adenovirus-mediated RNA interference against collagen-specific molecular chaperone 47-kDa heat shock protein suppresses scar formation on mouse wounds. *Cell Biol. Int.* **32** ; 484-493 2008.
- 12) Nagai, N., Hosokawa, M., Itohara, S., Adachi, E., Matsushita, T., Hosokawa, N., Nagata, K. : Embryonic lethality of molecular chaperone Hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J. Cell. Biol.* **150** ; 1499-1505 2000.
- 13) Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bachinger, H. P., Nagata, K. : Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Biol. Cell* **17** ; 2346-2355 2006.
- 14) Marutani, T., Yamamoto, A., Nagai, N., Kubota, H., Nagata, K. : Accumulation of type IV collagen in diluted ER leads to apoptosis in Hsp47-knockout mouse embryos via induction of CHOP. *J. Cell Sci.* **117** ; 5913-5922 2004.
- 15) Matsuoka, Y., Kubota, H., Adachi, E., Nagai, N., Marutani, T., Hosokawa, N., Nagata, K. : Insufficient folding of type IV collagen and formation of abnormal basement membrane-like structure in embryoid bodies derived from Hsp47-null embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* **15** ; 4467-4475 2004.
- 16) 櫻井裕子, 奥山典子, 玉村清治, 小澤 亮, 伊東博司, 山崎 章 : ラット上皮組織におけるコラーゲン特異的ストレスタンパク質 Hsp47の発現. *奥羽大歯学誌* **34** ; 131-136 2007.
- 17) Morino, M., Yasuda, T., Shirakami, T., Kiyosuke, T., Yoshimura, M., Furusho, T., Yoshikami, C. : Hsp47 as a possible marker for malignancy of tumors *in vivo*. *In Vivo* **8** ; 285-288 1994.
- 18) Morino, M., Tsuzuki, T., Ishikawa, Y., Shirakami, T., Yoshimura, M., Kiyosuke, Y., Matsunaga, K., Yoshikami, C., Saijo, N. : Specific expression of Hsp47 in human tumor cell lines *in vitro*. *In Vivo* **11** ; 17-22 1997.
- 19) Maitra, A., Rahman, A., Iacobuzio-Donahue, C., Sohn, T. A., Argani, P., Meyer, R., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Goggins, M., Kern, S. E., Ashfaq, R., Hruban, R. H., Wilentz, R. E. : Immunohistochemical validation of a novel epithelial and a novel stromal marker of pancreatic ductal adenocarcinoma identified by global expression microarrays. *Am. J. Clin. Pathol.* **118** ; 52-59 2002.
- 20) Cao, D., Maitra, A., Saavedra, J. A., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Hruban, R. H. : Expression of novel markers of pancreatic ductal adenocarcinoma in pancreatic nonductal neoplasms : additional evidence of different genetic pathways. *Modern Pathol.* **18** ; 752-761 2005.
- 21) Nikitakis, N. G., Ricera, H., Lopes, M. A., Siavash, H., Reynolds, M. A., Ord, R. A., Sauk, J. J. : Immunohistochemical expression of angiogenesis-related markers in oral squamous cell carcinomas with multiple metastatic lymph nodes. *Am. J. Clin. Pathol.* **119** ; 574-586 2003.
- 22) Hebert, C., Norris, K., Coletta, R. D., Reynolds, M., Ordonez, J., Sauk, J. J. : Cell surface colligin/Hsp47 associates with tetraspanin protein CD9 in epidermoid carcinoma cell lines. *J. Cell Biochem.* **73** ; 248-258 1999.
- 23) 伊東博司, 杉浦淳子, 山崎 章 : 口腔扁平上皮癌におけるストレスタンパク質47と fascin の発現状況. *日病会誌* **97** ; 319 2008.
- 24) Thiery, J. P. : Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat. Rev. Cancer* **2** ; 442-454 2002.
- 25) Rastaldi, M. P., Ferrario, F., Giardino, L., Dell'Antonio, G., Grillo, C., Grillo, P., Strutz, G. A., Colasanti, G., D'Amico, G. : Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* **62** ; 137-146 2002.
- 26) O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., Folkman, J. : Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88** ; 277-285 1997.
- 27) Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., O'Reilly, M. S. : Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390** ; 404-407 1997.
- 28) Marneros, A. G., Olsen, B. R. : The role of collagen-driven proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol.* **20** ; 337-345 2001.
- 29) Nyberg, P., Heikkila, P., Sorsa, T., Liostarinen, J., Heljasvaara, R., Stenman, U., Pihlakaniemi, T., Salo, T. : Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and matrix metalloprotease-2, -9, and -13. *J. Biol. Chem.* **278** ; 22404-22411 2003.

著者への連絡先：奥山典子，(963-8611)郡山市富田町字
三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口
腔病理学分野

Reprint requests : Noriko OKUYAMA, Division of Oral
Pathology, Department of Oral Medical Sciences, Ohu
University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita Koriyama, 963-8611, Japan