

## 論文の内容の要旨

氏名：高 村 剛

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The role of secretory leukocyte protease inhibitor in oral squamous cell carcinoma cell migration  
(分泌型白血球プロテアーゼインヒビターの口腔扁平上皮癌浸潤における役割)

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) は、セリンプロテアーゼインヒビターの 1 種であり、好中球が産生するエステラーゼ、カテプシン G、トリプシンなどの酵素活性を抑制することで、皮膚および粘膜の保護に重要な役割を果たしている。また、気道、精囊、唾液腺などの分泌物に多く存在し、創傷治癒や上皮細胞の増殖を制御することも報告されている。SLPI は、様々ながん細胞でも発現が認められているが、その機能の詳細については明らかになっていない。そこで本研究では、腫瘍細胞の増殖能や移動能に対する SLPI の影響を検討し、腫瘍の悪性化における SLPI の役割について検索することを目的とした。

実験には、ヒト結腸腺癌由来 HT-29 細胞およびヒト口腔上皮癌由来 Ca9-22 細胞を用いた。まず最初に、SLPI の機能解析を目的として、SLPI 遺伝子を欠損させた Ca9-22 ( $\Delta$ SLPI Ca9-22) 細胞の作製を試みた。 $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞について SLPI mRNA およびタンパク質レベルでの発現を real-time RT-PCR 法および western blotting 法により解析したところ、SLPI mRNA およびタンパク質発現は  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞においては全く認められなかった。そこで、この細胞を用いて、HT-29 細胞および Ca9-22 細胞との増殖能および移動能の違いについて比較した。初めに、wound healing assay により、これらの細胞の移動能について検討した。wtCa9-22 細胞と比較して、HT-29 細胞および  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞では顕著な移動能の低下を認めた。HT-29 細胞と  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞の間にはそれらの移動能に顕著な差を認めなかった。また、細胞増殖および DNA 合成については、それぞれの細胞間に顕著な差を認めなかった。SLPI の発現程度が wtCa9-22>HT-29> $\Delta$ SLPI Ca9-22 の順であったことから、SLPI の発現量は細胞の移動度に関連している可能性が考えられた。

次に、それぞれの細胞間での遺伝子発現パターンの違いをマイクロアレイにより網羅的に解析し、発現量に変化が見られた遺伝子 (differentially expressed genes : DEGs) をスクリーニングした。これにより、SLPI の発現の有無あるいは発現の強弱に影響を受け、かつ、細胞増殖・移動能制御において重要な役割を担う候補因子の同定を試みた。その結果、wtCa9-22 細胞と比較して HT-29 細胞では、4,344 遺伝子の発現量の増加 (> 2 fold) と、4,625 遺伝子の発現量の減少 (< 0.5 fold) を認めた。同じく、 $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞では、4,396 遺伝子の発現量の増加と 4,571 遺伝子の発現量の減少を認めた。これらのうち、HT-29 細胞および  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞に共通して発現量が増加あるいは減少した DEGs の数は、それぞれ 2,917 および 3,788 であった。続いて DEGs について Gene Ontology (GO) 解析および KEGG pathway 解析を行った。GO 解析では、cell migration のタームに含まれる DEGs の発現パターンは wtCa9-22 細胞と HT-29 細胞あるいは wtCa9-22 細胞と  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞の間で大きく異なっており、HT-29 細胞と  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞の間では類似していた。このうち、wtCa9-22 細胞と比較して HT-29 細胞および  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞で最も発現量が増加あるいは減少した遺伝子は共通しており、それぞれ NADPH oxidase 1 gene (NOX1) および lymphocyte cytosolic protein 1 gene (LCPI) であった。real-time RT-PCR 法によるこれら遺伝子の mRNA 発現解析においても、wtCa9-22 細胞と比較して HT-29 細胞および  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞において発現量の増減をそれぞれ認めた。KEGG pathway 解析では、HT-29 細胞と  $\Delta$ SLPI Ca9-22 細胞に共通する DEGs について検討した。その結果、wtCa9-22 細胞と比較して発現量が増加した 741 遺伝子と減少した 921 遺伝子がそれぞれ 282 および 284 の KEGG pathway にグループ分けられた。このうち最も多くの DEGs がグループ分けされた上位 3 つの KEGG pathway は発現量が増加した DEGs および減少した DEGs のいずれの場合においても上位から順に metabolic pathways, cancer pathways, および PI3K-Akt signaling pathway であった。また、cAMP signaling pathway には発現量が減少した DEGs が 45 含まれていたが、発現量が増加した DEGs は含まれていなかった。

本研究の結果は、SLPI は細胞の増殖能ではなく移動能を制御することによって腫瘍の悪性化や転移を「正」に制御していると考えられた。また、マイクロアレイデータを基にしたバイオインフォマティクスと real-time RT-PCR 法から、SLPI による細胞移動能制御機序の 1 つとして、SLPI が cAMP signaling pathway に含まれる遺伝子の発現を増強させることによって cAMP signaling pathway が活性化し、これが引き金となって glioma-associated oncogene family zinc finger (GLI) のリン酸化、LCP1 の発現誘導がおこり、細胞移動能が増強される可能性が考えられる。また、LCP1 以外にも顕著な発現量の増減を認めた遺伝子を同定しており、これらが重要な役割を果たしている可能性も考えられる。今後、これら発現変化の認められた遺伝子や cAMP signaling pathway の活性化レベル、および GLI のリン酸化など、より詳細な解析を進め、SLPI による細胞移動能制御機序のより詳細な解明を行っていきたいと考えている。培養細胞における遺伝子欠損株の樹立とその応用は、細胞生物学的または分子生物学的機能解析にとって極めて有用であることが示唆された。