

## 9) ヒト口腔扁平上皮癌細胞における galectin-1 の anoikis への関与

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座

鎌田 仁、加茂政晴、客本斉子、帖佐直幸、高橋典子、陳 明珠、佐藤詔子

### 【目的】

上皮細胞はインテグリンを介する細胞外マトリックス (ECM) からのシグナルにより、増殖、分化などの制御を受けている。しかし ECM との接着が欠如すると、上皮細胞はそのシグナルを絶たれることにより、足場に依存した apoptosis である anoikis を起こす<sup>1)</sup>。上皮由来の癌細胞の転移において anoikis は重要な因子であるが、口腔扁平上皮癌 (OSCC) における anoikis の研究はあまり進んでいない。本研究では、OSCC 由来の転移能のない HSC-2 細胞と、転移能を持つ HSC-3 細胞<sup>2,3)</sup> を用いて、OSCC における anoikis 関連分子の検索とその機能の解明を試みた。

### 【材料と方法】

細胞接着を防ぐ poly-HEMA (10mg/ml, Sigma) でコートしたディッシュ (6-well Multiplate) に各細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/well) を播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 12~48 時間培養した<sup>4)</sup>。培養後、死細胞数の計測をトリパンブルー染色により行い、apoptosis の確認を TUNEL 法により行った。anoikis 関連因子の解析として以下の分析を行った。1) RT-PCR: 細胞から全 RNA を精製し、逆転写反応により各細胞の cDNA を調製した。その cDNA を鋳型として各遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 反応を行った。2) プロテオーム解析: HSC 細胞から全タンパク質を抽出し、二次元電気泳動により分離した。一次元目は Immobiline DryStrip (pH4~7, 7cm) ゲルを用い、二次元目は 12.5% アクリルアミド (ゲルサイズ 10×10cm) を用いた SDS-PAGE を行った。泳動後、タンパク質を CBB 染色で検出した。両細胞間で発現量の異なるタンパク質スポットについて LC-MS/MS (BRUKER DALTONICS) を用いて分析し、タンパク質の同定を行った。3) ウェスタンブロット法: HSC-3 細胞の細胞ライゼートを調製し、ProteoExtract S-PEC (MERCK) を用いて分画し、抗 galectin-1 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。

### 【結果】

poly-HEMA コートディッシュを用いた懸濁培養における死細胞数の計測と、TUNEL 法の結果より、HSC-2 細胞は HSC-3 細胞と比較して有意に anoikis 感受性が高いことを認めた (図 1)。これまで anoikis 関連因子として知られている TrkB、caveolin-1 および galectin-3 について RT-PCR を行ったところ、両細胞間で mRNA の発現に有意差は認められなかった。プロテオーム解析の結果より、両細胞間で発現量の異なるタンパク質スポットがいくつか認められ、そのうちのひとつに等電点 pI5.0、分子量 15kDa 付近で、HSC-2 細胞と比較して HSC-3 細胞で強く発現しているタンパク質を見出した (図 2)。

LC-MS/MS 解析の結果、このタンパク質は galectin-1 と同定された。galectin-1 の mRNA も、HSC-2 細胞と比較して HSC-3 細胞で有意に強く発現していた。ウェスタンブロット法により、HSC-3 細胞内での galectin-1 の局在を調べた結果、大部分は細胞質に、一部が細胞膜に存在していた。細胞膜上の galectin-1 が anoikis に関与しているかどうかを検討するために、galectin と結合する糖質を添加し、膜上の galectin を除去した後、細胞死の割合を測定した。まず、galectin と結合する β-ガラクトシド構造を持つ lactose (50mM) を、HSC-3 細胞の培養液に添加したところ、有意に強く anoikis を生じた。これに対して、β-ガラクトシド構造を持たない maltose (50mM) の添加では、anoikis のレベルは変化しなかった (図 3)。そこで、HSC-2 細胞を用いて組換え galectin-1 (R&D SYSTEMS) を培養液に添加したところ、濃度依存的に HSC-2 細胞の anoikis のレベルが減少した (図 4)。

### 【考察】

galectin-1 は糖鎖の β-ガラクトシド構造に特異的に結合するレクチンであり、細胞膜上の糖タンパク質や糖脂質と結合し、細胞-基質間の接着や細胞のアポトーシス、腫瘍の形質変換などに関与していることが知られている<sup>5)</sup>。今回の実験で、galectin-1 の lactose への結合は、転移能を持つ HSC-3 細胞の anoikis を誘導した。一方、転移能を持たない HSC-2 細胞

への組換え galectin-1 の添加は、細胞の anoikis を抑制した。このことから、口腔扁平上皮癌において galectin-1 が anoikis の抑制に関与していることが示された。

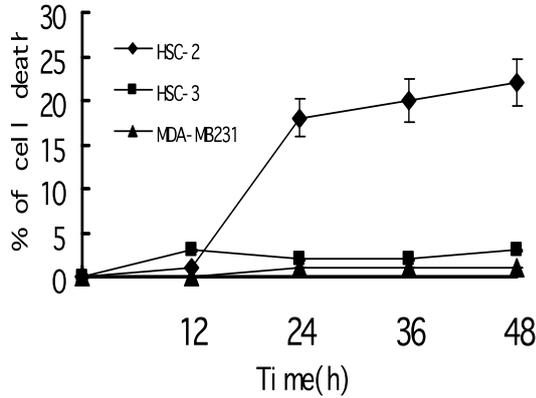


図1 懸濁培養における死細胞数の割合

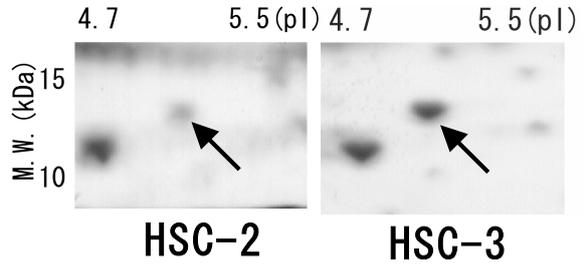


図2 二次元電気泳動による発現タンパク質の比較  
矢印は galectin-1 のスポットを示す。

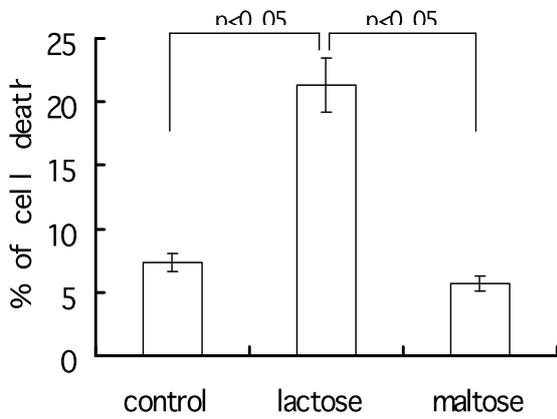


図3 lactose 添加における死細胞数の割合

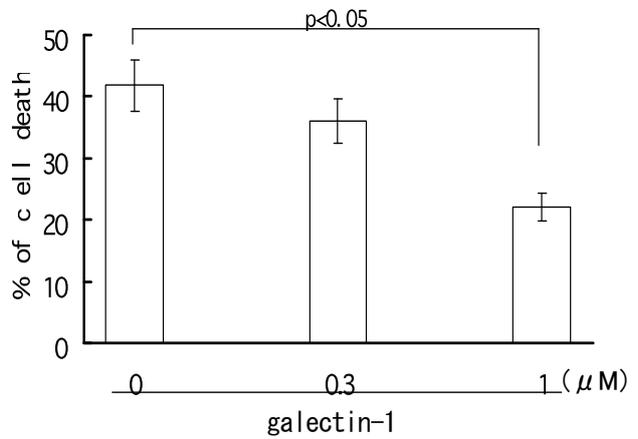


図4 galectin-1 添加における死細胞数の割合

【参考文献】

- 1) Geiger, T. R. & Peeper, D. S. : The Neuro trophic Receptor TrkB in Anoikis Resistance and Metastasis: A Perspective. *Cancer Res.*, 65: 7033-7036, 2005
- 2) Kudo, Y., Kitajima, S., et al. : Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line with high invasive and p27 Degradation activities from a lymph node metastasis. *Oral Oncol.*, 39: 515-520, 2003
- 3) Momose, F., Araida, T., et al. : Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J. Oral. Pathol. Med.*, 18: 391-395, 1989
- 4) Zhang, Y., Lu, H., et al. : Squamous Cell Carcinoma Cell Aggregates Escape Suspension-induced, p53-mediated Anoikis. *J. Biol. Chem.*, 279: 48342-48349, 2004
- 5) Robinovich, G. A. : Galectin-1 as a potential cancer target. *Br. J. Cancer*, 92: 1188-1192, 2005