

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592349

研究課題名（和文） 口腔粘膜上皮細胞における癌関連遺伝子発現への口臭物質の影響

研究課題名（英文） Influence of oral malodor compounds for expression of cancer-related gene in oral epidermal cells.

研究代表者

村田 貴俊（MURATA TAKATOSHI）

鶴見大学・歯学部・寄附講座准教授

研究者番号：10313529

研究成果の概要（和文）：口臭の原因物質である硫化水素は口腔癌細胞株 Ca9-22 細胞にアポトーシスを誘導するとともに、pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) の発現を上昇させた。この PHLDA1 の発現上昇はアポトーシス抑制のためと推測された。また、PHLDA1 を発現しない癌細胞株では薬剤に対するアポトーシス感受性が低く、PHLDA1 がアポトーシス感受性マーカーである可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Ca9-22 cells that highly express pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) are susceptible to H<sub>2</sub>S-induced apoptosis. PHLDA1 in oral cancer cells plays a role in apoptosis suppression, and PHLDA1 may be a marker of apoptosis susceptibility.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：癌関連遺伝子、硫化水素、歯肉癌細胞、アポトーシス、PHLDA1

## 1. 研究開始当初の背景

（1）国際がん研究機関の報告（GLOBOCAN 2008）では、口腔は癌の発生部位としては 16 番目、口腔癌の年齢調整罹患率は 3.8/10 万人（食道癌：7.0/10 万人・肺癌：22.9/10 万人）であり、比較的発生頻度の低い部位である。

（2）硫化水素は口臭の原因物質として口腔内から優勢に検出されるが、硫化水素が歯肉癌細胞株にアポトーシスを誘導することを報告していた。また、他の研究者により、他

の癌細胞株でも硫化水素によりアポトーシスが誘導されることが報告された。

## 2. 研究の目的

「口腔で発生する硫化水素が口腔癌の低罹患率に貢献しているのではないか？」と仮説を設定し、この仮説を検討するために、

（1）硫化水素に対するアポトーシス感受性の差を、歯肉癌細胞と歯肉正常細胞で比較する。

（2）歯肉癌細胞と歯肉正常細胞で、発現に

差のあるアポトーシス関連遺伝子を探索し同定する。

(3) 同定したアポトーシス関連遺伝子の機能を調べる。  
以上を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 気体硫化水素を健康歯肉由来正常上皮細胞と歯肉癌細胞由来 Ca9-22 細胞に曝露し、アポトーシスが誘導された細胞の割合をフローサイトメトリー (アネキシン-V 使用) で調べる。

(2) 正常上皮細胞と Ca9-22 細胞で発現に差のあるアポトーシス関連遺伝子を、ディファレンシャルディスプレイ法で探索し、real-time PCR 法、ウェスタンブロッティング法、免疫蛍光染色で確認する。

(3) 正常上皮細胞と Ca9-22 細胞で発現に差のあるアポトーシス関連遺伝子として、pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) を同定した。硫化水素曝露による PHLDA1 の発現変化を real-time PCR 法、ウェスタンブロッティング法で確認する。

(4) アクチノマイシン D (アポトーシス誘導剤) によるアポトーシス誘導時の PHLDA1 発現変化を、硫化水素曝露による発現変化と比較する。

(5) PHLDA1 のノックダウンを RNA 干渉によりおこない、細胞に及ぼす影響を調べ PHLDA1 の機能を調べる。

### 4. 研究成果

(1) Ca9-22 細胞に対する硫化水素 (H<sub>2</sub>S) の曝露は有意にアポトーシス細胞割合を増加させた。一方、正常上皮細胞 (Keratinocytes) ではアポトーシス細胞割合に有意な変化は認められなかった (図 1)。すなわち、歯肉癌細胞株と歯肉上皮細胞では硫化水素に対するアポトーシス感受性が異なっていた。

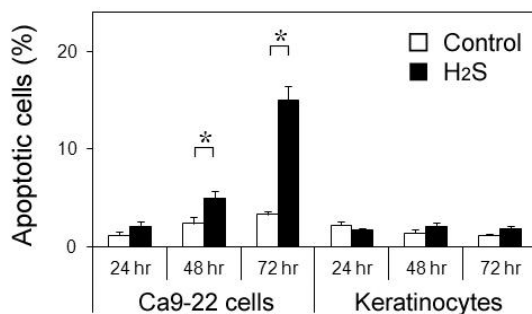


図 1 アポトーシス感受性

(2) Ca9-22 細胞と正常歯肉上皮細胞 (keratinocytes) の mRNA を抽出し、遺伝子発現の差をディファレンシャルディスプレイ法で探索したところ、図 2 に示す、Ca9-22 細胞に特異的に認められるバンドが確認された。通法に従い、このバンドをクローニングしたところ、pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) の一部であった。

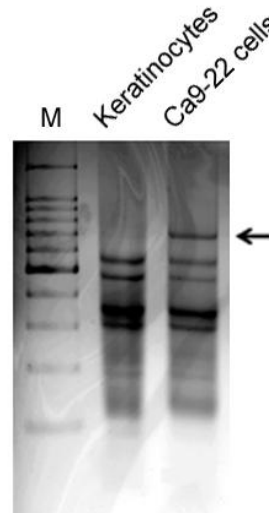


図 2 ディファレンシャルディスプレイ法

また、この PHLDA1 は実際に Ca9-22 細胞で高発現していることが、real-time PCR 法、ウェスタンブロッティング法、免疫蛍光染色で確認できた (図 3: 免疫蛍光染色)。

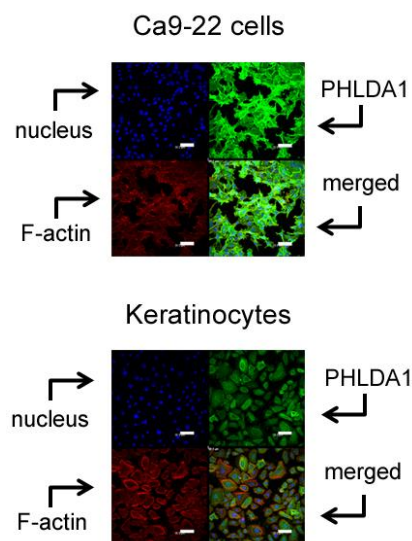


図 3 PHLDA1 の発現

(3) 硫化水素 (H<sub>2</sub>S) 曝露により Ca9-22 細胞の PHLDA1 発現上昇が real-time PCR 法、

ウェスタンブロッティング法で確認された。一方、正常上皮細胞 (Keratinocytes) では有意な差は認められなかった (図 4)。

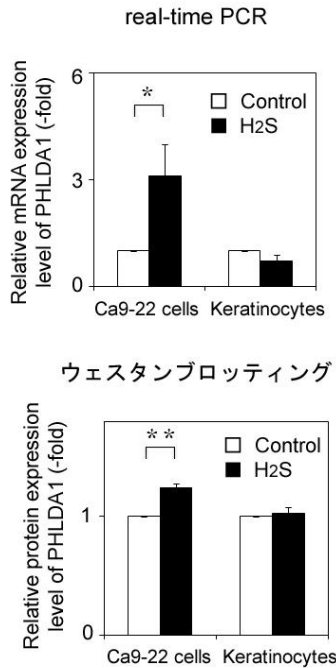


図 4 硫化水素曝露による PHLDA1 の発現

(4) アクチノマイシン D (AD) によるアポトーシス誘導時の PHLDA1 発現の変化は、硫化水素曝露時と同様に Ca9-22 細胞では上昇したが、正常上皮細胞 (Keratinocytes) では有意な差が認められなかった (図 5)。

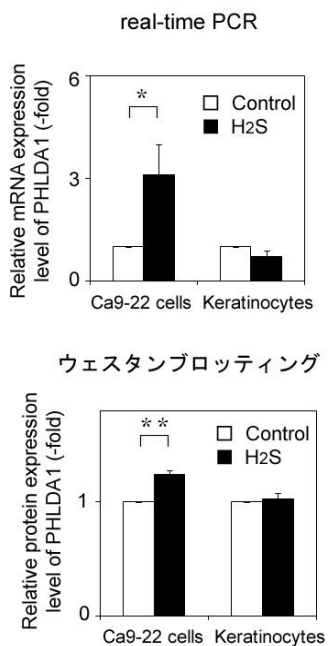


図 5 AD による PHLDA1 の発現

(5) RNA 干渉 (siRNA) による Ca9-22 細胞の PHLDA1 遺伝子ノックダウンにより活性化カスパーゼ 3 が発現した。つまりアポトーシスが誘導された (図 6)。

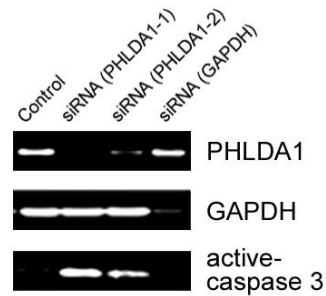


図 6 siRNA によるアポトーシス誘導

- (6) 以上の結果から以下の結論を導いた。
- ① 歯肉癌細胞株 Ca9-22 細胞は、正常歯肉上皮細胞より硫化水素によるアポトーシス感受性が高い。
  - ② アクチノマイシン D によるアポトーシス誘導時に正常上皮細胞の PHLDA1 発現に変化がないことから、PHLDA1 はアポトーシス誘導に必須ではない。
  - ③ 過剰発現している PHLDA1 のノックダウンによりアポトーシスを誘導したことから、PHLDA1 はアポトーシスを抑制している。
  - ④ Ca9-22 細胞のアポトーシス誘導時の PHLDA1 発現の上昇は、アポトーシス抑制増強のためである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 村田貴俊、花田信弘、正常歯肉上皮細胞と Ca9-22 の硫化水素に対するアポトーシス感受性の差、およびアポトーシス抑制に働く PHLDA1、第 62 回日本口腔衛生学会、2013 年 5 月 16 日、キッセイ文化ホール (長野県)
- ② 村田貴俊、角田衣理加、今井奨、花田信弘、歯肉上皮癌細胞株 Ca9-22 のアポトーシス誘導における PHLDA1 の役割、第 54 回歯科基礎医学会、2012 年 9 月 16 日、奥羽大学記念講堂 (福島県)
- ③ 村田貴俊、角田衣理加、野村義明、今井奨、花田信弘、Ca9-22 細胞への硫化水素

暴露により発現が上昇する PHLDA1、2011  
年 10 月 1 日、長良川国際会議場 (岐阜県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 貴俊 (MURATA TAKATOSHI)  
鶴見大学・歯学部・寄附講座准教授  
研究者番号：10313529

(2) 研究分担者

八重垣 健 (YAEGAKI KEN)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号：40166468  
(H23 削除)

(3) 研究分担者

佐藤 勉 (SATO TSUTOMU)  
日本歯科大学東京短期大学・歯科衛生学  
科・教授  
研究者番号：60130671  
(H23 削除)

(4) 研究分担者

今井 敏夫 (IMAI TOSHIO)  
日本歯科大学・生命歯学部・准教授  
研究者番号：90120617  
(H23 削除)