

Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) による口腔癌細胞の  
ケラチン発現と増殖能の変化について

川本幸寛

明海大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導：坂下英明教授)

歯 甲 第302号

2014年3月22日

Alterations of Keratin Expression and Proliferation of Oral Carcinoma Cells in  
Response to Mucosa-Associated Lymphoid Tissue 1 (MALT1)

Yukihiro KAWAMOTO

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor: Prof. Hideaki SAKASHITA)

本稿は下記の論文をもとにテーシス論文とした.

1. Yukihiro Kawamoto, Yoshito Ohyama, Tadashige Chiba, Hisao Yagishita, Hideaki Sakashita, Kazushi Imai: Proteomic identification of keratin alterations with enhanced proliferation of oral carcinoma cells by loss of mucosa-associated lymphoid tissue 1 expression

International Journal of Oncology 43: 729-736, 2013

2. Yukihiro Kawamoto, Yoshito Ohyama, Shota Takizawa, Hideaki Sakashita, Tadashige Chiba: G1 arrest of oral carcinoma cell proliferation by mucosa-associated lymphoid tissue 1

Pediatric Oral and Maxillofacial Surgery 23(3), 2013  
(in press)

## 要 旨

Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) は、リンパ球系細胞で核外に発現し、NF- $\kappa$ B を活性化することにより MALT 型リンパ腫の発症に影響を与えている。しかし、上皮系細胞における作用は不明であった。これまでの研究から、MALT1 は正常な口腔扁平上皮に発現し、低分化型口腔扁平上皮癌組織では発現が低下する。MALT1 の発現低下は、口腔扁平上皮癌患者の予後不良と相関関係があるが、癌進展における役割は全く分かっていない。

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株に MALT1 遺伝子を導入した MALT1 安定発現細胞株を用いて、MALT1 により発現量が変動するタンパク質をプロテオーム解析で同定するとともに、細胞増殖に対する作用について検討した。プロテオーム解析の結果、MALT1 によって発現量が変動したタンパク質のうち、4 種類がケラチンであった。MALT1 の発現に伴いケラチン 5/14 は減少し、ケラチン 8/18 が増加した。これらのケラチン分子種の変化は MALT1 濃度依存性であり、多くの口腔扁平上皮癌細胞株で共通に認められた。細胞増殖能の測定では、MALT1 は増殖を有意に低下させ、N 末端を欠失させた MALT1 は上昇させた。フローサイトメーターを使用した細胞周期についての検討では、MALT1 安定発現癌細胞株で G1 期の細胞相が増加した。細胞周期の活性因子である cyclin D1 は、MALT1 により発現が抑制され、MALT1-siRNA によるノックダウンによりその発現が回復した。一方、サイクリン依存性リン酸化酵素阻害因子である p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> の発現は増加し、pRb のリン酸化は低下した。

以上の結果から、MALT1 は口腔扁平上皮癌細胞でケラチンの分子種を変化させ、G1 停止を引き起こすことにより細胞増殖を抑制することが明らかになった。

牽引用語：MALT1, 口腔扁平上皮癌, ケラチン, 細胞増殖, 細胞周期

欄外表題：MALT1 による口腔癌細胞への影響

### Abstract

Loss of mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) expression closely correlates with poor prognosis of patients with oral carcinoma. Its role in the pathology of carcinoma is entirely unknown. In the present study, I examined alterations of protein expression alter in response to MALT1 in oral carcinoma cells by proteomic analysis and profiled proliferation and cell cycle progression. Loss of MALT1 expression alters the keratin expression. Keratin substitutions were MALT1-dependent and commonly observed in a series of oral carcinoma cell lines. MALT1 suppressed cell proliferation and the dominant-negative form enhanced it. MALT1-expressing carcinoma cells increased the cell fraction at G1 phase with up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors including p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>. Cyclin D1 expression was recovered by MALT1-siRNA in a dose-dependent manner. These data demonstrate that MALT1 alters keratin expression and arrests carcinoma cell proliferation by the inhibition of G1-to-S cycle progression, and suggest that oral carcinomas advance the pathological states upon loss of MALT1 expression.

Key words: Mucosa-associated lymphoid tissue 1, Oral squamous cell carcinoma,

Keratin, Cell proliferation, Cell cycle

## 緒 言

口腔扁平上皮癌は口腔顎顔面領域に発生する悪性腫瘍の 80%前後を占めるが<sup>1)</sup>, 患者生存率は他の悪性腫瘍と比較して良好な成績が得られていない<sup>2)</sup>. また, その発生率は近年増加傾向を示している<sup>3)</sup>. 予後不良の原因となるメカニズムを解明することは, 癌の克服にむけて極めて重要な情報をもたらす. 口腔扁平上皮癌の進展には癌細胞の増殖能, 分化度, および浸潤能などの変化が大きく影響するが<sup>4)</sup>, その制御機構に関しては不明な点が多く残されている. 本研究では, 口腔扁平上皮癌の進展に抑制的に働くと考えられる *Mucosa Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation 1 (MALT1)* に着目した<sup>5)</sup>.

*MALT1* は MALT 型リンパ腫の原因遺伝子であり, N 末端より death ドメイン, Ig-like ドメイン, caspase-like ドメインの 3つのドメインより構成される. リンパ球系細胞では, *MALT1* は B cell lymphoid 10 (BCL10) および inhibitor of nuclear factor kappa B kinase (IKKs) と複合体を形成し, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) の活性化に働く<sup>6, 7)</sup>. しかし, 上皮系細胞における作用は依然として不明のままである. *MALT1* の上皮系細胞への作用を明らかにするため, これまでの研究からは, 正常な口腔粘膜上皮組織および分化度の異なる口腔扁平上皮癌組織に *MALT1* の免疫組織化学的検討を行い, 正常粘膜上皮組織では *MALT1* の発現が認められている. 一方, 口腔扁平上皮癌組織での *MALT1* の発現は, 高分化型口腔扁平上皮癌組織で上昇し, 低分化型口腔扁平上皮癌組織では低下している<sup>5)</sup>. さらに, 予後不良な症例の口腔扁平上皮癌組織では *MALT1* の発現が低下する<sup>5)</sup>. また, *MALT1* 遺伝子発現がメチル化により抑制され, *MALT1* タンパク質の発現が認められないことが明らかになっている<sup>5)</sup> (Fig1-3).

しかし, *MALT1* の発現低下がどのようなメカニズムで予後に影響するか, また口腔扁平上皮癌細胞の進展にどのような役割を果たしているかは不明である. そこで, 本研究は口腔扁平上皮癌細胞株に *MALT1* 遺伝子を導入した *MALT1* 安定発現細胞株を用いて, *MALT1* により発現量が変動するタンパク質をプロテオーム解析した. さらに, 細胞の増殖能との関連について検討した.

## 材料と方法

### 1) 培養細胞

ヒト口腔癌由来細胞株（口底：HSC2, KOSC2, Holu1. 舌：HSC3, OSC19. 歯肉：TSU, Ca9.22）は東北大学加齢医学研究所所属医用細胞資源センター（仙台）あるいは理化学研究所（つくば市）から購入し、10% ウシ胎仔血清 (HyClone Laboratories, Mordialloc, Victoria, Australia) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) あるいは Roswell Park Memorial Institute 1640 培地 (Sigma-Aldrich) 中で培養した（すべての細胞培養は 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 管理下で行われた。）。

野生型 *MALT1* (*wtMALT1*; 1-824 amino acids) と N 末端を欠失させた *MALT1* ( $\Delta$ *MALT1*; 333-824 amino acids) を pcDNA4-HisMaxB (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) および pCMV-Tag 2A (Stratagene, La Jolla, CA, USA) で発現ベクターを構築した。これらを *wtMALT1* 発現ベクター (*wtMALT1* / pcDNA4-HisMaxB),  $\Delta$ *MALT1* 発現ベクター ( $\Delta$ *MALT1* / pCMV-Tag 2A) とした。構築した発現ベクターを HSC2 細胞に FuGene (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて遺伝子導入した。さらに pcDNA4-HisMaxB のみ HSC2 細胞に遺伝子導入した。培養 72 時間後に 100  $\mu$ g / mL の G418 (Sigma-Aldrich) を添加し、約 2 カ月間かけコロニー形成まで培養した。それぞれの遺伝子導入した HSC2 細胞からコロニー 30 個を選択し、60 mm dish (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) で 80% コンフュレントまで 2 週間培養した。ウエスタンブロット法で *wtMALT1* (His tag) と  $\Delta$ *MALT1* (Flag tag) の発現を確認し、最も発現量が高かったクローンを安定株とした。HSC2 細胞に pcDNA4-HisMaxB のみ導入した *mock*HSC2 細胞, 野生型 *MALT1* (*wtMALT1*HSC2 細胞), N 末端を欠失させた *MALT1* ( $\Delta$ *MALT1*,  $\Delta$ *MALT1*HSC2 細胞) とした<sup>5)</sup>。

### 2) プロテオミクス解析

#### 1. タンパク質抽出と電気泳動

*mock*HSC2 細胞と *wtMALT1*HSC2 細胞に細胞溶解液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% NP-40 (Sigma-Aldrich), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF: Sigma-Aldrich), protein inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)] を加え、遠心分離後の可溶性画分を回収した。Bicinchoninic acid 法 (Pierce, Rockford, IL, USA) によりタンパク質の濃度を測定後、細胞抽出液 (30  $\mu$ g) を 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) - polyacrylamide 電気泳動 (SDS-PAGE) し、Coomassie Brilliant Blue (CBB: CBB R250, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) で染色した。染色したゲルをスキャナーで読み込み、Image J 1.46r で *mock*HSC2 細胞と *wtMALT1*HSC2 細胞に発現するタンパク質量を比較した<sup>8)</sup>。発現量に変動が認められたタンパク質のバンドをゲルから切り出し、CBB の脱色後に乾燥させた。

## 2. ゲル成分の消化と MALDI-TOF MS

乾燥させたゲルを質量分析用 trypsin (Roche Diagnostics) で処理後, 0.1 % トリフルオロ酢酸 (和光純薬工業, 大阪) 含有 50 % アセトニトリル (和光純薬工業) でゲルからペプチド断片を抽出した. 抽出液をバキュームポンプで乾燥させ, 飽和  $\alpha$  シアノ 4 ヒドロキシケイヒ酸 (和光純薬工業) および 0.1 % トリフルオロ酢酸を含む 50 % アセトニトリル溶液 1  $\mu$ l にて溶解し, 質量分析プレート上にて室温下で乾燥させた後, Voyager DE-PRO MALDI-TOF MS (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) によりマトリックス支援レーザー脱イオン化飛行時間質量分析 (MALDI-TOF MS) を行った. 内部標準にはペプチド質量基準 (Applied Biosystems) を用いた. MALDI-TOF MS で得られたスペクトルデータを MASCOT データベース (MASCOT ver. 2.0, Matrix Science, Boston, MA, USA<sup>9)</sup>) で解析した.

## 3) リアルタイム RT-PCR

*mock*HSC2 細胞と *wt*MALT1HSC2 細胞を TRIZOL 試薬 (Invitrogene) に可溶化し, フェノール抽出後, エタノール沈殿を行った. 沈殿物をミリ Q 水に溶解し, Gene Quant100 (GE Healthcare) にて吸光度を測定し全 RNA 濃度を調整した. 全 RNA 10  $\mu$ g を MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) およびランダムプライマーを用いて 37 °C, 120 分間 cDNA 合成を行った. 合成した cDNA, TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) および計 7 種類 (Table 1) の TaqMan specific probes (Applied Biosystems) を混合し, Step One Real-time PCR system (Applied Biosystems) でリアルタイム PCR を行った. 遺伝子発現量の測定には, 内部標準として *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : GAPDH* (Hs02758991\_m1) を用い,  $n=4$  でデータ解析は  $\Delta\Delta$ Ct 法で行った<sup>10)</sup>.

## 4) ウェスタンブロット法

### 1. MALT1 si-RNA 処理と試料調製

*wt*MALT1HSC2 細胞,  $\Delta$ MALT1HSC2 細胞を 60 mm dish ( $1 \times 10^5$  cells / dish) に播種し, 80 % コンフュレントになるまで培養後, 50 nM の MALT1 siRNA (#18601: Ambion, Austin, TX, USA) と Negative Control として Silencer Negative Control #1 siRNA (Ambion) を Lipofectamine siRNA MAX Reagent (Invitrogene) を用いて導入した. 24 時間後に細胞を回収し, SDS Sample Buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 0.12 %  $\beta$ -メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich), 20 % グリセロール, 1 % brome phenol blue で可溶化し, 電気泳動試料とした.

### 2. 各安定細胞株の試料調製

*mock*HSC2 細胞, *wt*MALT1HSC2 細胞,  $\Delta$ MALT1HSC2 細胞を 60 mm dish ( $1 \times 10^5$  cells /

dish) に播種し, 80 % コンフレントになるまで培養後, SDS Sample Buffer を用いて可溶化し, 電気泳動試料とした.

### 3. HSC2 細胞および KOSC2 細胞への *wtMALT1* 一過性遺伝子導入

HSC2 細胞および KOSC2 細胞を 60 mm dish ( $1 \times 10^5$  cells / dish) に播種し, 80 % コンフレントになるまで培養後, 0.2, 1.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{g}$  の *wtMALT1* 発現ベクターを FuGene にて遺伝子導入した. 24 時間した後に細胞を回収し, SDS Sample Buffer で可溶化し, 電気泳動試料とした.

### 4. *wtMALT1* の導入

HSC2 細胞, KOSC2 細胞, Ho1u1 細胞, HSC3 細胞, OSC19 細胞, TSU 細胞および Ca9.22 細胞を 60 mm dish ( $1 \times 10^5$  cells / dish) に播種し, 80 % コンフレントになるまで培養後, 1.0  $\mu\text{g}$  の *wtMALT1* 発現ベクターおよび  $\Delta$ *MALT1* 発現ベクターを FuGene にて遺伝子導入後, 24 時間した後に細胞を回収し, SDS Sample Buffer で可溶化し, 電気泳動試料とした.

1 から 4 までの調製した各電気泳動試料を SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜に転写し, 3 % BSA 溶液で室温, 2 時間ブロッキングした. 本研究で使用した 1 次抗体を Table 2 で示す. これらの 1 次抗体を用いて 4 °C, 一晩反応させた後, 以下に示すビオチン標準 2 次抗体: rabbit biotinylated anti-goat IgG (H+L) (1:1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), goat biotinylated anti-rabbit (1:1000, DAKO), rabbit biotinylated anti-mouse (1:1000, DAKO), goat biotinylated anti-rat IgG (H+L) (1:1000, Vector Laboratories) と室温, 2 時間反応させ後, avidin-biotin complexes (Vector Laboratories) および 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB: Sigma-Aldrich) を用いて発色反応を行った.

### 5) 細胞増殖試験

#### 1. リアルタイム細胞増殖測定: リアルタイムアッセイ

リアルタイムに細胞増殖測定には xCELLigence RTCA-DP (Roche Diagnostics) を使用した.  $1 \times 10^4$  個の *mock*HSC2 細胞, *wtMALT1*HSC2 細胞および  $\Delta$ *MALT1*HSC2 細胞を培養プレート (E-plate16, Roche Diagnostics) に播種し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 60 時間連続的にインピーダンス (交流における抵抗値) を測定した. インピーダンスは cell index (CI) にパラメータ変換し, 各細胞の数をモニターする指標とした.

#### 2. 蛍光法を用いた細胞増殖測定: エンドポイントアッセイ

96 穴プレート (Greiner Bio-One) に *mock*HSC2 細胞, *wtMALT1*HSC2 細胞を各  $2.5 \times 10^3$



個播種し、0 時間、4 時間、9 時間、13 時間、22.5 時間、30 時間、44 時間、54 時間毎に calcein-AM (同仁化学研究所, 熊本) を加え、37°C、30 分間処理し、PARADIGM™ DTX800/800 (BECKMAN COLTER, Brea, CA, USA) を用いて、蛍光測定 (Ex 285 nm, Em 535 nm) した。細胞倍加時間の計測は、Doubling Time Software version 1.0.10 (www.doubling-time.com) を用いて解析した。

#### 6) TUNEL アッセイ

24 穴プレート (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) に mockHSC2 細胞, wtMALT1HSC2 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 個播種し、24 時間培養後にパラホルムアルデヒド液 (ナカライテスク, 京都) に室温、1 時間固定し、浸透化溶液として 0.1 % クエン酸ナトリウム液 (和光純薬工業) で 2 °C、2 分間処理した後、TUNNEL 反応混合液 (In situ cell death detection kit, Boehringer Ingelheim) 50 µl と反応させ、室温、1 時間湿式保存し、蛍光顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E600, ニコン, 東京) にて反応を観察した。

#### 7) フローサイトメーター (FACS)

35 mm dish (Greiner Bio-One) に mockHSC2 細胞, wtMALT1HSC2 細胞を  $1 \times 10^5$  cells / cm<sup>2</sup> 播種し、24 時間培養後、TrypLE Express (Life Technologies, New York, NY, USA) で回収し 450 × g、5 分間遠心分離後、-20 °C、2 時間 70 %エタノールで固定し、4 °C の PBS で洗浄後、propidium iodide (Millipore, Billerica, MA, USA) で室温、30 分間染色し、フローサイトメーター (Guava easyCyte™ 5HT Sampling Flow Cytometer, Millipore) を用いて各細胞 DNA の割合を測定した。

## 結 果

### 1) 変動タンパク質の同定

mockHSC2 細胞と wtMALT1HSC2 細胞間のタンパク質発現量を SDS-PAGE に比較検討した (Figure 4). mockHSC2 細胞では発現量が多いバンドを 9 個, wtMALT1HSC2 細胞では 7 個選択をした. これらのタンパク質を MALDI-TOF MS にて解析したところ, 6 個のバンドがスペクトルの不十分により解析が不能であり, 最終的に 10 種類のタンパク質が同定され, そのうち 4 種類がケラチンであった (Table 3). MALT1 の発現により K5, K14 の発現低下, K8, K18 の発現増強が認められた.

### 2) ケラチン発現の検討

ウエスタンブロット法による解析では, mockHSC2 細胞で発現がみられた K5, K14 は wtMALT1HSC2 細胞で発現低下が認められた (Figure 5). また K8, K18 は mockHSC2 細胞では発現が認められないか, あるいは低発現であったが, wtMALT1HSC2 細胞ではこれらのケラチンタンパク質の発現増強が認められた. N 末端を欠失させた MALT1 が安定発現する  $\Delta$ MALT1HSC2 細胞では mockHSC2 細胞に類似したケラチンタンパク質の発現が認められた.

mRNA レベルでは, mockHSC2 細胞と比較して *Keratin 5 (KRT5)*, *Keratin 14 (KRT14)* は wtMALT1HSC2 細胞では大きく低下したのに対して  $\Delta$ MALT1HSC2 細胞では mockHSC2 細胞とほぼ同程度の発現量を示した (Figure 6). 一方, *Keratin 8 (KRT8)*, *Keratin 14 (KRT14)* は, wtMALT1HSC2 細胞では発現増強し,  $\Delta$ MALT1HSC2 細胞では発現低下が認められた.

### 3) ケラチン分子種変化の MALT1 依存性

MALT1 の発現量によるケラチン分子種の変化を確認するため, 濃度の異なる MALT1 cDNA を HSC2 細胞に遺伝子導入し, ケラチンの発現をウエスタンブロット法により検討した (Figure 7). その結果, cDNA 濃度の上昇と共に K5, K14 は減少し, K8, K18 は増加した. また, 内在性 MALT1 を多く発現する KOSC2 細胞を用いて同様に MALT1 cDNA を一過性に導入したところ, HSC2 細胞と同様に MALT1 依存性のケラチンタンパク質の発現変動が確認された (Figure 8).

口腔扁平上皮癌細胞における MALT1 依存性変化を検証するため, wtMALT1 と  $\Delta$ MALT1 の cDNA を発生部位の異なる計 6 種の口腔扁平上皮癌細胞に一過性の遺伝子導入を行った. ほとんどの癌細胞において wtMALT1 は K5 と K14 の発現を低下させ, K8 と K18 は逆に増強した. その中で wtMALT1 による K8, K18 の発現増強は口底由来癌細胞株で顕著であった (Figure 9).

### 4) MALT1 による細胞増殖への影響

ケラチン分子種の変化は細胞増殖と密接な関連性がある<sup>11-14)</sup>. そこで, MALT1 による影響を検証するため, リアルタイム細胞増殖アッセイと蛍光測定法によるエンド

ポイントアッセイを行った。リアルタイムアッセイでは *mock*HSC2 細胞の細胞倍加時間が  $11.1 \pm 0.3$  h であったのに対し、*wtMALT1*HSC2 細胞では  $8.4 \pm 0.5$  h、 $\Delta$ *MALT1*HSC2 細胞では  $21.3 \pm 2.1$  h であった (Figure 10)。エンドポイントアッセイでは *wtMALT1*HSC2 細胞の増殖能低下が確認された (Figure 11)。細胞増殖能の変化に対するアポトーシスの影響は、TUNEL アッセイによる結果で否定された (Figure 12)。

#### 5) MALT1 による cyclin D1 に対する影響

細胞周期を加速する cyclin D1 は *wtMALT1*HSC2 細胞で発現が抑制されたが、MALT1-siRNA により濃度依存的に増加した (Figure 13)。

#### 6) MALT1 による細胞周期への影響

*mock*HSC2 細胞と比較して *wtMALT1*HSC2 細胞では、S 期、G2/M 期の細胞相が減少し、G1 期の細胞相の割合が顕著に増加した ( $69.2 \pm 0.8\%$ , Figure 14)。

#### 7) MALT1 による細胞周期抑制因子に対する影響

G1 期から S 期への細胞周期の移行にはサイクリン依存性リン酸化酵素 (cyclin-dependent kinase: CDK) が関与し、CDK の阻害因子である  $p21^{Cip1}$  と  $p27^{Kip1}$  により G1 期から S 期への移行が抑制される<sup>15, 16</sup>。そこでウエスタンブロット法により、これらの細胞周期制御因子の発現を検討したところ、*mock*HSC2 細胞と比較して *wtMALT1*HSC2 細胞で  $p21^{Cip1}$  と  $p27^{Kip1}$  の発現が上昇したが、CDK2 には変化がみられなかった (Figure 15)。またリアルタイム PCR 法により mRNA レベルでの発現を検討したところ、*wtMALT1*HSC2 細胞では *p21 (CDKN1A)*, *p27 (CDKN1B)* の発現が顕著に増加した (Figure 16)。一方、*CDK2* の発現はわずかな増加しか認められなかった。

G1 期から S 期への移行には CDK / cyclin による retinoblastoma protein (pRb) のリン酸化が必要である<sup>17, 18</sup>。そこで、pRb とリン酸化 (ppRb) の発現を検討した (Figure 17)。pRb の発現は *mock*HSC2 細胞と *wtMALT1*HSC2 細胞で変わりがなかったが、ppRb は *wtMALT1*HSC2 細胞でほとんど認められなかった。

## 考 察

MALT1 はリンパ球系細胞の細胞質に発現する細胞内シグナル伝達分子であり、染色体転座によりキメラ遺伝子を形成し、生じた恒常的活性型 MALT1 は MALT 型リンパ腫の原因遺伝子となる<sup>6,7)</sup>。一方、上皮系細胞ではリンパ球系細胞とは異なり、MALT1 は正常な口腔上皮細胞の核内に発現し、予後不良な口腔扁平上皮癌組織の浸潤先端部癌細胞では発現が低下する<sup>5)</sup>。しかし、MALT1 の上皮系細胞での機能的役割や癌細胞の増殖、進展における役割は不明である。そこで本研究では口腔扁平上皮癌細胞 HSC2 に MALT1 発現ベクターを導入した MALT1 安定発現細胞株を用い、プロテオーム解析により変動タンパク質を同定した。その結果、ケラチン分子種の発現変化が生じることが明らかとなった。

今回認められたケラチンの分子種変化は MALT1 濃度依存性を示した。多くの口腔扁平上皮癌細胞株で MALT1 の発現が認められている (Figure 1) が、本研究では MALT1 をほとんど発現しない HSC2 細胞を主として用いた。一方で、内在性 MALT1 を多く発現する KOSC2 細胞でも同様の変化が生じたことは、MALT1 によるケラチン分子種の変化が他の多くの口腔扁平上皮癌細胞に共通する現象であると考えられる。

正常な重層扁平上皮では K5 / 14 は角化上皮の基底層に発現し<sup>11)</sup>、K8 / 18 は非角化上皮の基底層に発現することが知られている<sup>19)</sup>。多くの癌細胞において、分化度や増殖能の変化に伴ってケラチンの発現に変化が生じる<sup>11-13)</sup>。さらに、ケラチンの分子種変化は細胞のアポトーシス、細胞増殖、細胞膜輸送などと密接に関連することが知られている<sup>20-24)</sup>。今回 MALT1 の発現に応じてケラチンのペアが変化したことは、MALT1 がケラチンフィラメントの構造を大きく変化させている可能性を強く示唆している。

口腔扁平上皮癌を含む上皮系癌では、K5 / 14 は増殖活性が高く予後不良な癌組織で高発現することが知られており<sup>25, 26)</sup>、上皮系腫瘍マーカーとして広く用いられている。一方、K5 / 14 は予後の良い舌由来の高分化型口腔扁平上皮癌細胞で発現が低下する<sup>14)</sup>。K14 のノックダウンは上皮細胞の分化度を亢進させるインボクリンや K1 などの発現を促進し、舌由来口腔扁平上皮癌細胞の増殖能や腫瘍形成能を抑制することが知られている<sup>14)</sup>。共同研究者の過去の発表では、同じく HSC2 細胞を使用し MALT1 がインボクリンと K10 の発現を促進し、間葉系細胞型中間径フィラメントであるビメンチンを減少させることが明らかにされている<sup>5)</sup>。また、K8 / 18 の高発現は上皮系の癌細胞のみでなく、乳癌細胞でも増殖能や悪性度を低下させる<sup>24, 27, 28)</sup>。一方、K8 / 18 の低発現は子宮頸癌細胞や肝癌細胞の悪性度を上昇させることが報告されている<sup>24)</sup>。このようにケラチンの分子種と癌細胞の表現型には密接な関連性があると考えられる。今回 MALT1 が口腔扁平上皮癌細胞のケラチン分子種を変化させたことは、MALT1 が口腔扁平上皮癌細胞の表現型に大きな影響を与えていることを示唆している。

本研究では、MALT1 が HSC2 細胞の細胞倍加時間を延長させ、細胞増殖を抑制す

ることが明らかとなった。TUNEL 法による解析の結果から、MALT1 による細胞増殖能の変化はアポトーシス誘導とは関連しないことが確認された。また、MALT1 によって発現変化する標的遺伝子をマイクロアレイより網羅的に解析した関連報告では、MALT1 が epidermal growth factor (EGF) と transforming growth factor (TGF)- $\beta$  シグナルに働く遺伝子群の発現を低下させることを明らかにした<sup>29)</sup>。EGF と TGF- $\beta$  シグナルは K5 / 14 の発現誘導と K8 / 18 の発現抑制に働き、胃癌細胞や乳癌細胞の増殖や悪性度の亢進に関与する<sup>30-33)</sup>。このように、ケラチン分子種の変化は細胞増殖能と密接な関係性を持っており<sup>14)</sup>、MALT1 の発現により細胞増殖が低下する可能性が考えられる。

細胞増殖は細胞周期の促進因子と抑制因子が複雑に連動しコントロールされている<sup>17, 34)</sup>。本研究では、MALT1 の細胞周期に対する影響を検討したところ、wtMALT1HSC2 細胞において S 期、G2 / M 期の減少、G1 期の顕著な細胞相の増加が認められた。このことから、MALT1 が G1 arrest を誘導する可能性が示唆された。そこで G1 / S チェックポイントに関わる細胞周期制御因子の発現について検討した。

G1 期から S 期への移行には、cyclin D1 を含む cyclin D と CDK4 / CDK6, cyclin E と CDK2 がタンパク質複合体を形成し、この複合体が転写因子 E2F に結合している Rb タンパク質をリン酸化することで E2F から解離し、抑制状態にあった S 期進行や DNA 複製に関わる遺伝子群の発現を誘導する。その結果、S 期への細胞周期は進行する (Figure 18)<sup>18)</sup>。Cyclin D1 タンパク質の発現は、mockHSC2 細胞では恒常的な発現が認められたが、wtMALT1HSC2 細胞ではその発現は抑制された (Figure 13)。この発現抑制は、MALT1 に対する siRNA によるノックダウンで解除されたことから、MALT1 依存性に cyclin D1 が抑制されることが明らかとなった。G1 期から S 期への進行には cyclin E / CDK2 の複合体の活性化が関与しているが、p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> は CDK2 の抑制因子であり<sup>18, 35)</sup>、その発現により G1 arrest が誘導される<sup>36, 37)</sup>。従って、p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> の発現誘導と CDK2 の発現抑制が細胞増殖の抑制に関わる<sup>38, 39)</sup>。本研究において、MALT1 は p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> の発現を増強させ、pRb のリン酸化を抑制した。口腔顎顔面領域の癌細胞では pRb が減少することは稀であるとの報告があるが<sup>40)</sup>、本研究においても MALT1 は Rb のタンパク質発現に対しては影響を与えなかった。以上の結果から、MALT1 による G1 arrest は、cyclin D1 の発現抑制、p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> の発現増強による pRb のリン酸化を介したものであることが考えられる (Figure 19)。

p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> は複数の細胞内シグナル伝達経路を介することが知られている。p21<sup>Cip1</sup> の発現誘導には、TGF- $\beta$  からの SMAD シグナル経路、成長因子に関連する Akt シグナル経路、および DNA ダメージに関連する p53 経路の活性化等が深く関連する<sup>41, 42)</sup>。関連報告で、MALT1 は TGF- $\beta$  シグナルに働く遺伝子群の発現を抑制し、また Akt シグナル伝達経路も抑制する可能性が示されたことから<sup>29)</sup>、MALT1 の発現による p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> の発現誘導にこれらのシグナル伝達経路が関与している可能

性は低いと考えられる。一方、p53 依存性の p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> の発現誘導経路に関しては、MALT1 は p53 遺伝子の発現を誘導することを確認しているが、タンパク質レベルでの発現は認められなかった (data not shown)。このことは、p21 と p27 遺伝子発現の誘導に転写因子として p53 タンパク質が直接関与している可能性は低いと考えられる。MALT1 は上皮系で核内に局在することから、MALT1 自身が直接的、あるいは転写因子と協調的に p21 と p27 遺伝子の転写抑制に関わっている可能性も考えられる。口腔扁平上皮癌細胞における MALT1 による p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> の発現がどのような細胞内シグナル伝達経路を介して誘導されるかについては多くの口腔扁平上皮癌細胞株を用いたさらなる解析が必要である。

### 結語

本研究から、口腔扁平上皮癌細胞において MALT1 の発現は K5 / 14 の発現増強と K8 / 18 の発現低下を引き起こし、細胞周期において G1 arrest を誘導することで口腔扁平上皮癌細胞の増殖を著しく抑制することが明らかとなった。

### 謝辞

稿を終えるに臨み、ご指導ご高覧頂きました日本歯科大学生命歯学部生化学講座今井一志教授ならびに千葉忠成准教授、同生化学講座の皆様、さらに明海大学歯学部病態診断治療学講座口腔顎顔面外科学第二分野坂下英明教授に感謝致します。最後に、明海大学歯学部口腔生物再生医工学講座微生物学教授大森喜弘教授、同学部病態診断治療学講座病理学教授草間薫教授、同学部形態機能成育学講座生理学村本和世教授のご指導に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) 井上勝元, 大山嘉人, 川本幸寛, 滝澤将太, 奥結香, 岡本英里, 福田正勝, 重松久夫, 天野修, 菊池建太郎, 草間薫, 鈴木正二, 坂下英明: 当科において過去 40 年間で診断した口腔顎顔面領域の悪性腫瘍 541 例の臨床的検討. *J Meikai Dent Med* 40, 173-179, 2011
- 2) Kiran BJ and Nidhi G : Clinicopathological prognostic implicators of oral squamous cell carcinoma: Need to understand and revise. *N Am J Med Sci* 5, 671-679, 2013
- 3) Choi S and Myers JN : Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 87, 14-32, 2008
- 4) Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674, 2011
- 5) Chiba T, Maeda G, Kawashiri S, Kato K and Imai K : Epigenetic loss of mucosa-associated lymphoid tissue 1 expression in patients with oral carcinomas. *Cancer Res* 69, 7216-7223, 2009
- 6) Thome M : Multifunctional roles of MALT1 in T-cell activation. *Nat Rev Immunol* 8, 495-500, 2008
- 7) McAllister-Lucas LM, Baens M and Lucas PC : MALT1 protease: a new therapeutic target in B lymphoma. *Clin Cancer Res* 17, 6623-6631, 2011
- 8) Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW : NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675, 2012
- 9) Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM and Cottrell JS : Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3351-3367, 1999
- 1 0) Schmittgen DD and Livak KJ : Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat Protoc* 6, 1101-1108, 2008
- 1 1) Bosch FX, Ouhayoun JP, Bader BL, Collin C, Grund C, Lee I and Franke WW : Extensive changes in cytokeratin expression patterns in



pathologically affected human gingiva. *Virchows Arch B Cell Pathol* 58, 59-77, 1989

- 1 2) Karantza V : Keratins in health and cancer: more than mere epithelial markers. *Oncogene* 30, 127-138, 2011
- 1 3) Kurokawa I, Takahashi K, Moll I and Moll R : Expression of keratins in cutaneous epithelial tumors and related disorders – distribution and clinical significance. *Exp Dermatol* 20, 217-228, 2011
- 1 4) Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal S and Vaidya MM : Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol Biol Cell* 22, 4068-4078, 2011
- 1 5) Caldon CE, Sutherland RL and Musgrove E : Cell cycle proteins in epithelial cell differentiation: implications for breast cancer. *Cell Cycle* 9, 1918-1928, 2010
- 1 6) Peurala E, Koivunen P, Haapasaari KM, Bloigu R and Jukkola-Vuorinen A : The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 15, R5, 2013
- 1 7) Kastan MB and Bartek J : Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323, 2004
- 1 8) Sherr CJ and Roberts JM : Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-1163, 1995
- 1 9) Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Taltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA and Wright MW : New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 174, 169-174, 2006
- 2 0) Coulombe PA and Omary MB : 'Hand' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Cell Biol* 14, 110-122, 2002

- 2 1 ) Oshima RG : Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ* 9, 486-492, 2002
- 2 2 ) Pan X, Hobbs RP and Coulombe PA : The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and disease epithelia. *Cell Biol* 25, 47-56, 2013
- 2 3 ) Kim S, Wong P and Coulombe PA : A cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 441, 362-365, 2006
- 2 4 ) Fortier AM, Asselin E and Cardin M : Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin 1 up-regulation. *J Biol Chem* 288, 11555-11571, 2013
- 2 5 ) Thiel UJE, Feltens R, Adryan B, Gieringer R, Brochhausen C, Schyon R, Fillies T, Grus F, Mann WJ and Brieger J : Analysis of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF MS. *J Oral Pathol Med* 40, 369-379, 2011
- 2 6 ) Garrel R, Dromard M, Costes V, Barbotte E, Comte F, Gardiner Q, Cartier C, Makeieff M, Crampette L, Guerrier B and Boulle N : The diagnostic accuracy of reverse-transcription PCR quantification of cytokeratin mRNA in sentinel lymph node invasion in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison with immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 12, 2498-2505, 2006
- 2 7 ) Iyer SV, Dange PP, Alam H, Sawant SS, Ingle AD, Borges AM, Shirsat NV, Dalal SN and Vaidya MM : Understanding the role of keratins 8 and 18 in neoplastic potential of breast cancer derived cell lines. *PLoS One* 8, e53532, 2013
- 2 8 ) Buhler H and Schaller G : Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adherent proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res* 3, 365-371, 2005
- 2 9 ) Ohyama Y, Kawamoto Y, Chiba T, Yagishita H, Sakashita H and Imai K : Inhibition of TGF- $\beta$  and EGF pathway gene expression and migration of

- oral carcinoma cells by mucosa-associated lymphoid tissue 1. *Br J Cancer* 109, 207-214, 2013
- 3 0) Zeineldin R, Rosenberg M, Ortega D, Buhr C, Chavez MG, Stack MS, Kusewitt DF and Hudson LG : Mesenchymal transformation in epithelial ovarian tumor cells expressing epidermal growth factor receptor variant III. *Mol Carcinog* 45, 851-860, 2006
- 3 1) Kinouchi M, Takahashi H, Itoh Y, Ishida-Yamamoto A and Iizuka H : Ultraviolet B irradiation increase keratin 5 and keratin 14 expression through epidermal growth factor receptor of SV40-transformed human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 293, 634-641, 2002
- 3 2) Jiang CK, Tomic-Canic M, Lucas DJ, Simon M and Blumenberg M : TGF beta promotes the basal phenotype of epidermal keratinocytes: transcriptional induction of K#5 and K#14 keratin gene. *Growth Factor* 12, 87-97, 1995
- 3 3) Shukla A, Ho Y, Liu X, Ryscavage A and Glick AB : Cripto-1 alters keratinocyte differentiation via blockade of transforming growth factor-beta 1 signaling: role in skin carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 6, 509-516, 2008
- 3 4) Sherr CJ : Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 2689-2695, 2000
- 3 5) Weinberg RA : The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330, 1995
- 3 6) Philipp J, Vo K, Gurley KE, Seidel K and Kemp CJ : Tumor suppression by p27Kip1 and p21Cil1 during chemically induced skin carcinogenesis. *Oncogene* 18, 4689-4698, 1999
- 3 7) Claudio PP, Zamparelli A, Garcia FU, Claudio L, Ammirati G, Farina A, Bovicelli A, Russo G, Giordano GG, McGinnis DE, Giordano A and Cardi G : Expression of cell-cycle-regulated proteins pRb2/p130, p107, p27(kip1), p53, mdm-2, and Ki-67 (MIB-1) in prostatic gland adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 8, 1808-1815, 2002

- 3 8 ) Patel V, Lahusen T, Leethanakul C, Igishi T, Kremer M, Quintanilla-Martinez L, Ensley JF, Sausville EA, Gutkind JS and Senderowicz AM : Antitumor activity of UCN-01 in carcinomas of the head and neck is associated with altered expression of cyclin D3 and p27<sup>KIP1</sup>. Clin Cancer Res 8, 3549-3560, 2002
- 3 9 ) Sugiyama K, Akiyama T, Shimizu M, Tamaoki T, Courage C, Gescher A and Akinaga S : Decrease in susceptibility toward induction of apoptosis and alteration in G1 checkpoint function as determinants of resistance of human lung cancer cells against the antesignaling drug UCN-01 (7-hydroxystaurosporine). Cancer Res 59, 4406-4412, 1999
- 4 0 ) Okami K, Reed AL, Cairns P, Koch WM, Westra WH, Wehage S, Jen J and Sidransky D : Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. Oncogene 18, 3541-3545, 1999
- 4 1 ) El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al : WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 54, 1169-1174, 1994
- 4 2 ) Brown JP, Wei W and Sedivy JM : Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. Science 277, 831-834, 1997
- 4 3 ) Malovannaya A, Lanz RB, Jung SY, Bulyanko Y, Le NT, Chan DW, Ding C, Yucer N, Krenciute G, Kim BJ, Li C, Chen R, Li W, Wang Y, O'Malley BW and Qin J : Analysis of the human endogenous coregulator complexome. Cell 145, 787-799, 2011
- 4 4 ) Heallen TR, Adams HP, Furuta T, Verbrugghe KJ and Schumacer JM : An Afg2/Spaf-related Cdc48-like AAA ATPase regulates the stability and activity of the *c. elegans* Aurora B kinase AIR-2. Dev Cell 15, 603-616, 2008
- 4 5 ) Dong D, Stapleton C, Luo B, Xiong S, Ye W, Zhang Y, Jhaveri N, Zhu G, Ye R, Liu Z, Bruhn KW, Craft N, Groshen S, Hofman FM and Lee AS : A

critical role of GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 71, 2848-2857, 2011

- 4 6 ) Clausen H, Moe D, Buschard K and Dabelsteen E : Keratin proteins in human oral mucosa. *J Oral Pathol* 15, 36-42, 1986
- 4 7 ) Tsuei DJ, Hsu HC, Lee PH, Jeng YM, Pu YS, Chen CN, Lee YC, Chou WC, Chang CJ, Ni YH and Chang JMH : RBMY, a male germ cell-specific RNA-binding protein, activated in human liver cancers and transforms rodent fibroblasts. *Oncogene* 23, 5815-5822, 2004
- 4 8 ) Zhong Q, Putt DA, Xu F and Lash LH : Hepatic mitochondrial transport of glutathione: studies in isolated rat liver mitochondria and H4IIE rat hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys* 474, 119-127, 2008

## Figure legends

### Figure 1. Expression of MALT1 mRNA in oral squamous carcinoma cells.

MALT1 expression in normal keratinocyte (NKC1-3) and oral squamous carcinoma cells was examined by RT-PCR. -RT, negative control without reverse transcription of RNA isolated from a normal keratinocyte 3 samples.

### Figure 2. Morphology of *mock*HSC2, *wtMALT1*HSC2, $\Delta$ *MALT1*HSC2.

These cells were stained by Diff-Quik stain<sup>TM</sup>. *wtMALT1*HSC2 were largely different from *mock*HSC2 and  $\Delta$ *MALT1*HSC2 in morphology.

### Figure 3. Knock-down of MALT1 protein expression in *wtMALT1*HSC2 cells and $\Delta$ *MALT1*HSC2 cells by the siRNA.

The *wtMALT1* and  $\Delta$ *MALT1* protein expression was probed by western blotting with an anti-FLAG antibody.  $\beta$ -actin was shown as a loading control.

### Figure 4. Protein expression in *mock*HSC2 cells and *wtMALT1*HSC2 cells.

Total cell lysates of *mock*HSC2 cells and *wtMALT1*HSC2 cells were loaded on a 1-D SDS-PAGE gel under reducing conditions. Protein bands differentially detected between the cells indicated by arrowheads were subjected to the MS analysis.

Numbered closed arrowheads were specified proteins and open arrowheads were unambiguous proteins. Molecular marker proteins are phosphorylase *b* (94 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) and soya-bean trypsin inhibitor (21 kDa).

**Figure 5. Validation of keratin protein expression in  $wtMALT1$ HSC2 cells (western blotting).**

Expression of K5, K14, K8 and K18 in  $mock$ HSC2 cells,  $wtMALT1$ HSC2 cells and  $\Delta MALT1$ HSC2 cells were validated by western blotting.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

**Figure 6. Validation of keratin expression in HSC2 cells (real time RT-PCR).**

Relative fold of expression of genes encoding *Keratin5 (KRT5)*, *Keratin14 (KRT14)*, *Keratin8 (KRT8)* and *Keratin18 (KRT18)* in  $wtMALT1$ HSC2 cells (closed bars) and  $\Delta MALT1$ HSC2 cells (open bars) were compared with  $mock$ HSC2 cells by quantitative real-time PCR ( $n = 4$ ). The expression was standardized by expression level of *GAPDH* in each sample. Each column and bar represents mean  $\pm$ SE of four experiments.

**Figure 7. Dose-dependent expression of keratin in HSC2 cells transfected with MALT1 expression vector.**

Parental HSC2 cells were transiently transfected with the indicated concentrated of MALT1 expression vector and cultured for 24 hours before preparation of total cellular lysate. 20µg of proteins were analyzed by western blotting using antibodies against indicated keratins or β-actin, which was used as loading control.

**Figure 8. Dose-dependent expression of keratin in KOSC2 cells transfected with MALT1 expression vector.**

Parental KOSC2 cells were transiently transfected with the indicated concentrated of MALT1 expression vector and cultured for 24 hours before preparation of total cellular lysate. 20µg of proteins were analyzed by western blotting using antibodies against indicated keratins or β-actin, which was used as loading control.

**Figure 9. Effect of transfection of wild type and dominant negative MALT1 expression vector on keratin expressions on various oral carcinoma cells.**

KOSC2 cells were transiently transfected with 10µg of vector alone (-),



wtMALT1(w), or  $\Delta$ MALT1( $\Delta$ ) expression vector and cultured for 24 hours before preparation of total cellular lysate. 20 $\mu$ g of proteins were analyzed by western blotting using antibodies against indicated keratins or  $\beta$ -actin, which was used as a loading control.

**Figure 10. Real-time monitoring of proliferation of  $_{\text{mock}}$ HSC2 cells,  $_{\text{wtMALT1}}$ HSC2 cells and  $_{\Delta\text{MALT1}}$ HSC2 cells.**

Normalize cell index (CI) indicated electrical impedance readings between E-plates and attached cells. Mean value for each cell ( $n = 5$ ) was represented with S.D. at every 10 min.

**Figure 11. Spectrophotometry of proliferation of  $_{\text{mock}}$ HSC2 cells,  $_{\text{wtMALT1}}$ HSC2 cells.**

Growth curves for HSC2 cells stably expressing wild type MALT1 ( $_{\text{wtMALT1}}$ HSC2) and transfected vector alone ( $_{\text{mock}}$ HSC2). Cells were plated at equal densities in triplicate in 96-well plates and grew up to 54 h. The number of cells was counted using calcein-AM. Data were presented by means  $\pm$  S.D of triplicate cultures.

**Figure 12. TUNEL assay of  $_{\text{mock}}$ HSC2 cells,  $_{\text{wtMALT1}}$ HSC2 cells and  $_{\Delta\text{MALT1}}$ HSC2**

cells.

Cells ( $1.0 \times 10^4$  cells) were cultured for 24 hours before analysis of TUNEL assay.

TUNEL-positive nuclei are stained green. The entire cell population was visualized under a fluorescence microscope with a DAPI filter.

**Figure 13. MALT1-dependent down-regulation of cyclin D1 expression in  $wtMALT1HSC2$  cells.**

$mockHSC2$ ,  $wtMALT1HSC2$ , and  $\Delta MALT1HSC2$  cells were transfected with the indicated concentration of MALT1 siRNA for 24 hours before preparation of total cellular lysate. 20 $\mu$ g of proteins were analyzed by western blotting using an antibody against cyclin D1 or  $\beta$ -actin, which was used as a loading control.

**Figure 14. Cell cycle analysis of  $mockHSC2$  cells and  $wtMALT1HSC2$  cells.**

(A) Cell cycle profiles by flow cytometry analysis. Cell cycle distribution of  $mockHSC2$  and  $wtMALT1HSC2$  were analyzed by flow cytometry. Percentage of distributions in each cell cycle was depicted as means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. (B) Percentage of distribution of each cell cycle phase of  $mockHSC2$  and  $wtMALT1HSC2$  was summarized.

**Figure 15. Expression of cell cycle regulators (western blotting).**

Total lysates of *mock*HSC2 and *wt*MALT1HSC2 cells were subjected to western blotting. Expression of MALT1 was probed with an antibody against FLAG-tag (anti-DYKDDDDK antibody).

**Figure 16. Expression of cell cycle regulators (real time RT-PCR).**

Real-time PCR analysis for *p21*, *p27* and *CDK2* expression in *mock*HSC2 or *wt*MALT1HSC2 cells. The expression was standardized by that of *GAPDH*, and the relative fold of expression was calculated with the expression in *mock*HSC2 cells.

Data were presented by means  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).

**Figure 17. Expression of pRb and ppRb.**

The *mock*HSC2 and *wt*MALT1HSC2 cell lysates were probed by antibodies to pRb and phosphorylated pRb (ppRb).

**Figure 18. “Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation”.**

Functional interacting network among gene datasets were uploaded in the Ingenuity Pathway Analysis tool and the network of “Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation”. Genes regulated by MALT1 and falling in this network were shown

in either red (up-regulated) or green (down-regulated). The data was reproduced from a reference 29.

**Figure 19. Predictable model for an involvement of MALT1 in G1 arrest.**

MALT1 negatively regulate CDK2 by up-regulation of p21 and p27. Repression of CDK2 activity decreases phosphorylation of pRb that is required for progression of G1 phase into S phase.

**Table 1. Lists of primers used in real time RT-PCR.**

<b>Gene name</b>	<b>Gene symbol</b>	<b>UniGene ID</b>
<i>keratin 5</i>	<i>KRT5</i>	Hs00361185_m1
<i>keratin 14</i>	<i>KRT14</i>	Hs00265033_m1
<i>kratin 8</i>	<i>KRT8</i>	Hs01595539_g1
<i>cyclin-dependent kinase 2</i>	<i>CDK2</i>	Hs01548894_m1
<i>CDKN1A</i>	<i>p21</i>	Hs00355782_m1
<i>CDKN1B</i>	<i>p27</i>	Hs01597588_m1
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>GAPDH</i>	Hs02758991_m1

**Table 2. Lists of primary antibodies used in Western blotting.**

<b>Antibody</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>
rabbit anti-human keratin 5 polyclonal	1:1000	Convace, Princeton, NJ, USA
mouse anti-human keratin14 monoclonal	1:1000	Cell Marque, Rocklin, CA, USA
mouse anti-human keratin 8 monoclonal	1:1000	PROGEN Biotechnik , Heidelberg, Germany
mouse anti-human keratin 18 monoclonal	1:1000	DAKO, Glostrup, Denmark
moues anti-human cyclin D1 monoclonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
mouse anti-human DYKDDDDK monoclonal	1:1000	TransGenic, Kobe, Japan
mouse anti-human FLAG-M2 monoclonal	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
mouse anti-human $\beta$ -Actin monoclonal	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
mouse anti-human p21 monoclonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
rabbit anti-human p27 KIP1 polyclonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
rabbit anti-human CDK2 monolclonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
rabbit anti-human Rb monolclonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
rabbit anti-human phospho-Rb monolclonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

**Table 3. Lists of identified proteins differentially expressed in  $_{wtMALT1}$ HSC2 and  $_{mock}$ HSC2 cells.**

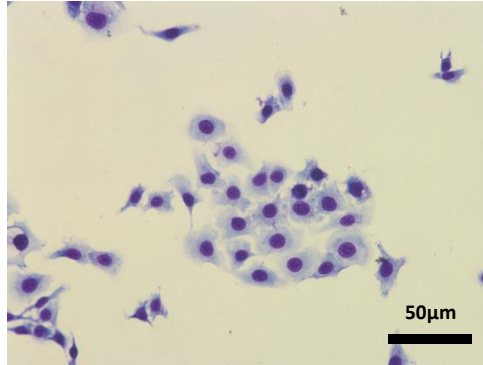
Protein no.	Accession no. <sup>a</sup>	Annotation	Mr (kDa)		Coverage (%) <sup>d</sup>	MS score <sup>e</sup>	Authors/(Refs.) <sup>f</sup>
			Theor. <sup>b</sup>	Obs. <sup>c</sup>			
<i>mock</i> HSC2 cells							
1	Q8N1G0	Zinc finger protein 687	115.6	129.5	16	27	Malovannaya <i>et al</i> <b>(43)</b>
2	Q8NB90	Spermatogenesis associated 5	97.7	97.9	25	32	Heallen <i>et al</i> <b>(44)</b>
3	P11021	GRP78 precursor	72.1	72.3	38	85	Dong <i>et al</i>
4	P13647	Keratin 5	62.4	62.4	27	64	<b>(45)</b>
5	P02533	Keratin 14	44.7	51.6	23	38	
6	43502	RAD51 homolog C	42.6	42.2	23	47	Clague <i>et al</i> <b>(46)</b>
<i>wtMALT1</i> HSC2 cells							
7	Q6GMYO	Keratin 8	53.4	53.7	34	61	
8	PO5783	Keratin 18	47.3	48.1	38	52	
9	P38159	RNA-binding motif protein	42.3	44.3	43	40	Tsuei <i>et al</i> <b>(47)</b>
10	Q02978	Solute carrier family 25	34.1	34.1	26	28	Zhong <i>et al</i> <b>(48)</b>

<sup>a</sup>Uniprot (www.uniprot.org) accession number. <sup>b</sup>Theoretical Mr (kDa). <sup>c</sup>Observed Mr (kDa) in 1-D SDS-PAGE. <sup>d</sup>Number of sequence coverage in MALDI-TOF MS. <sup>e</sup>MASCOT score. <sup>f</sup>References except for keratins.

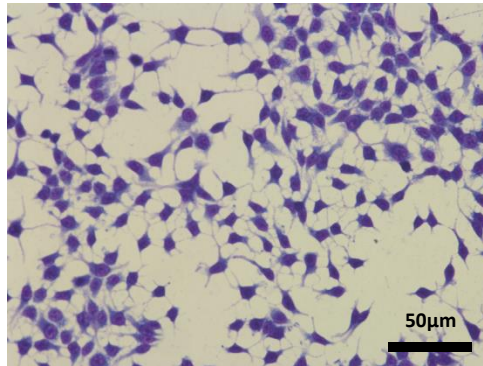




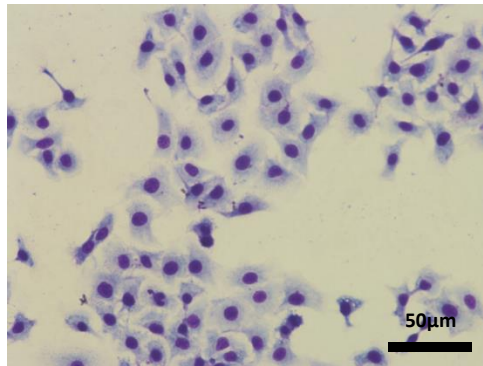
**mock**HSC2

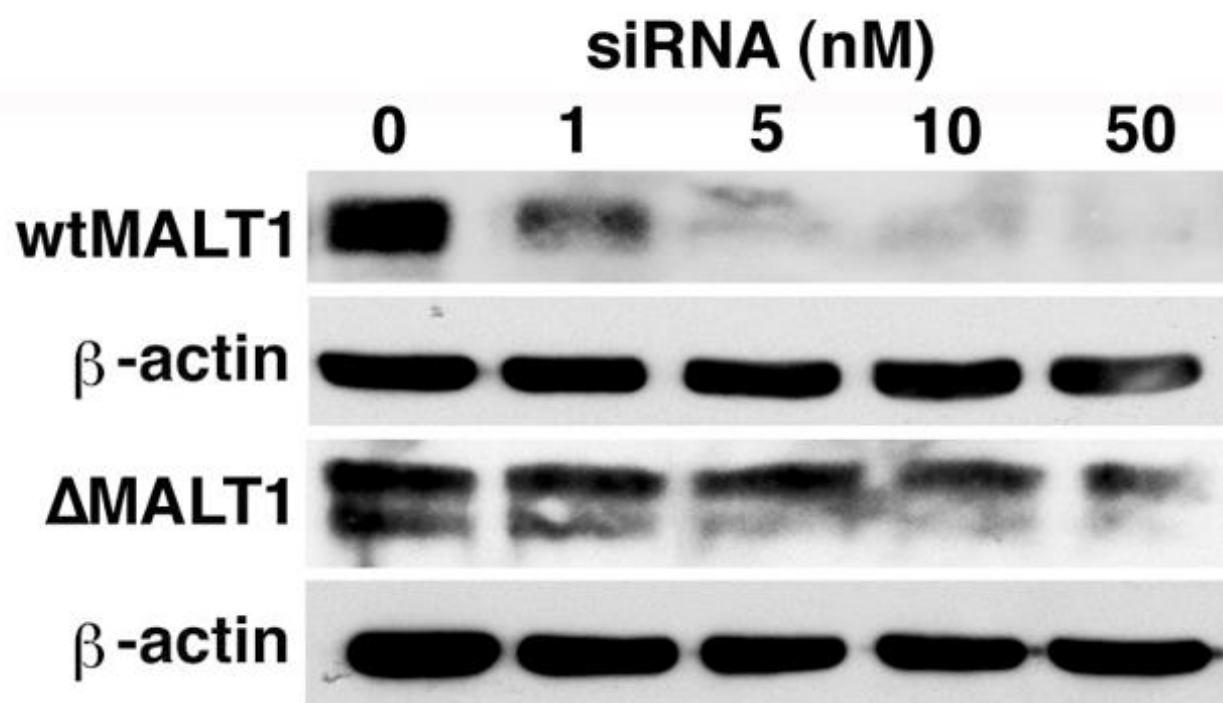


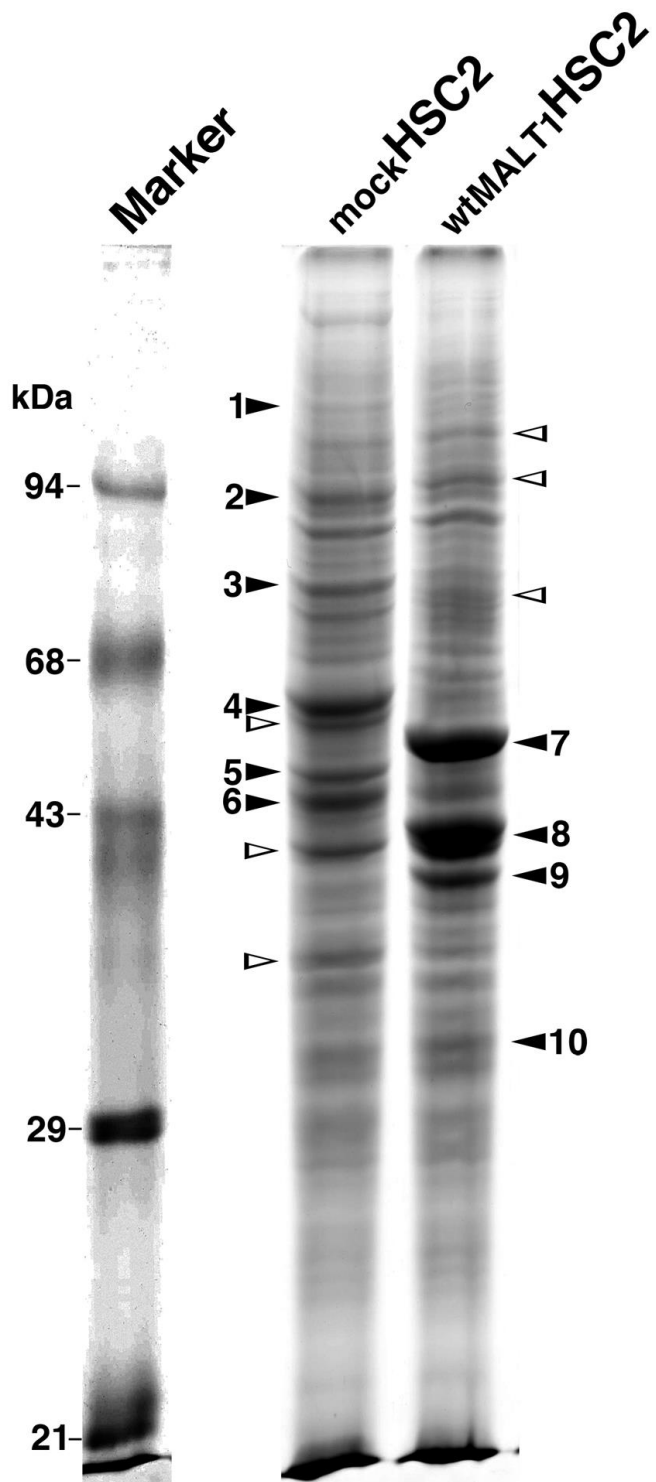
**wtMALT1**HSC2

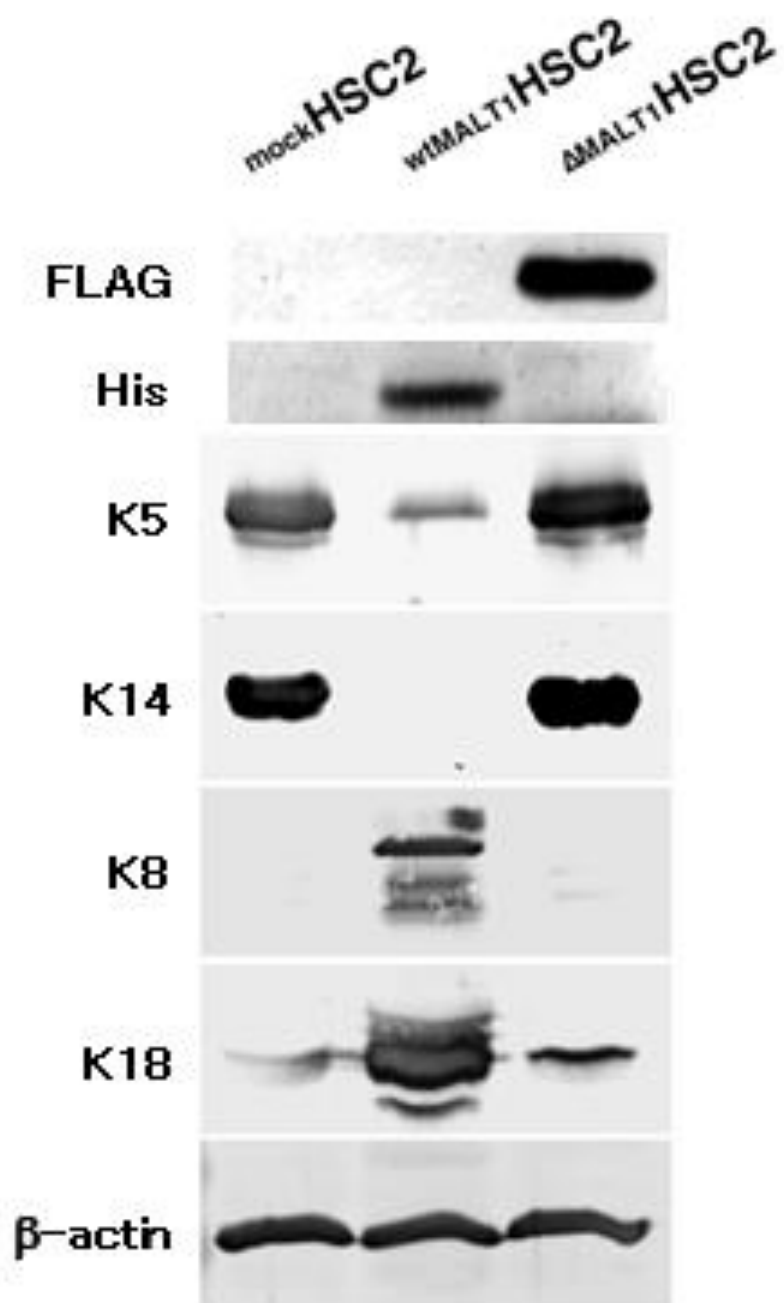


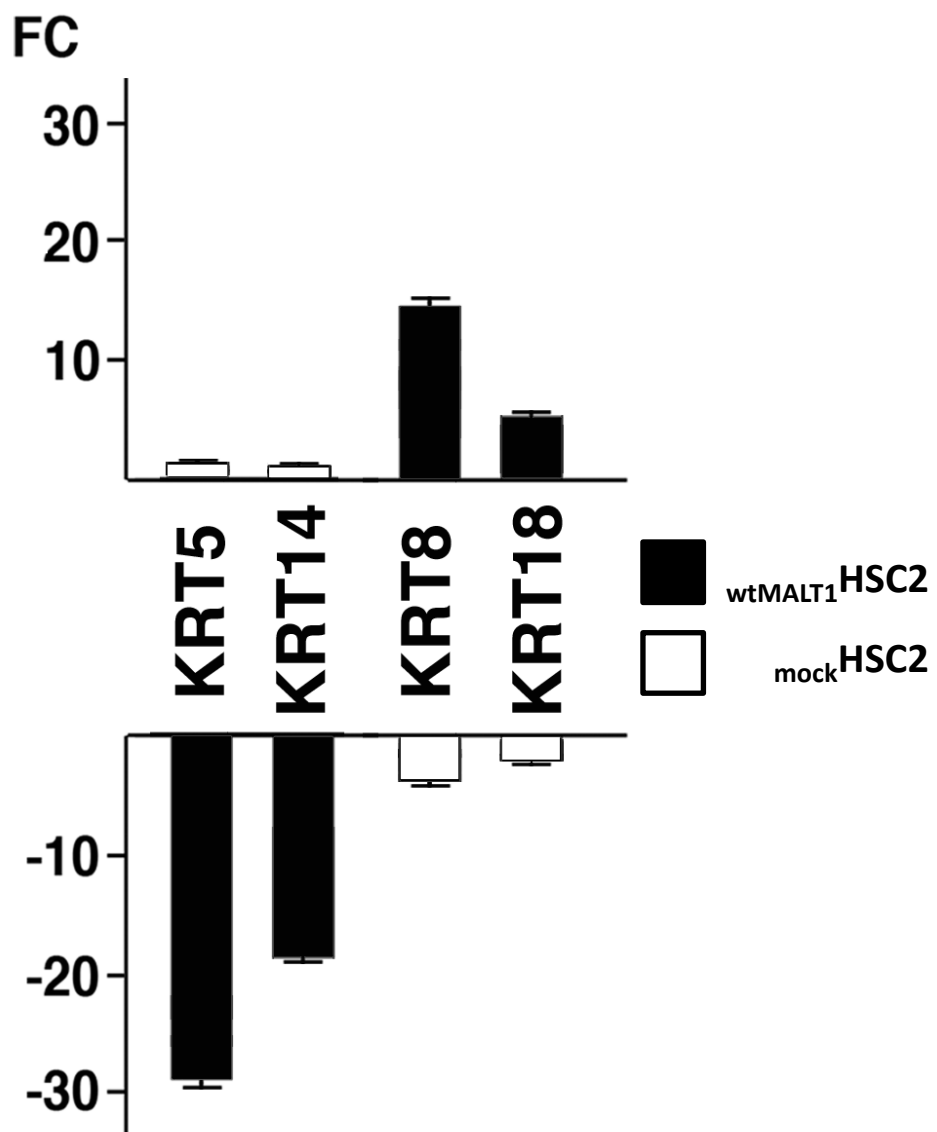
**DMALT1**HSC2

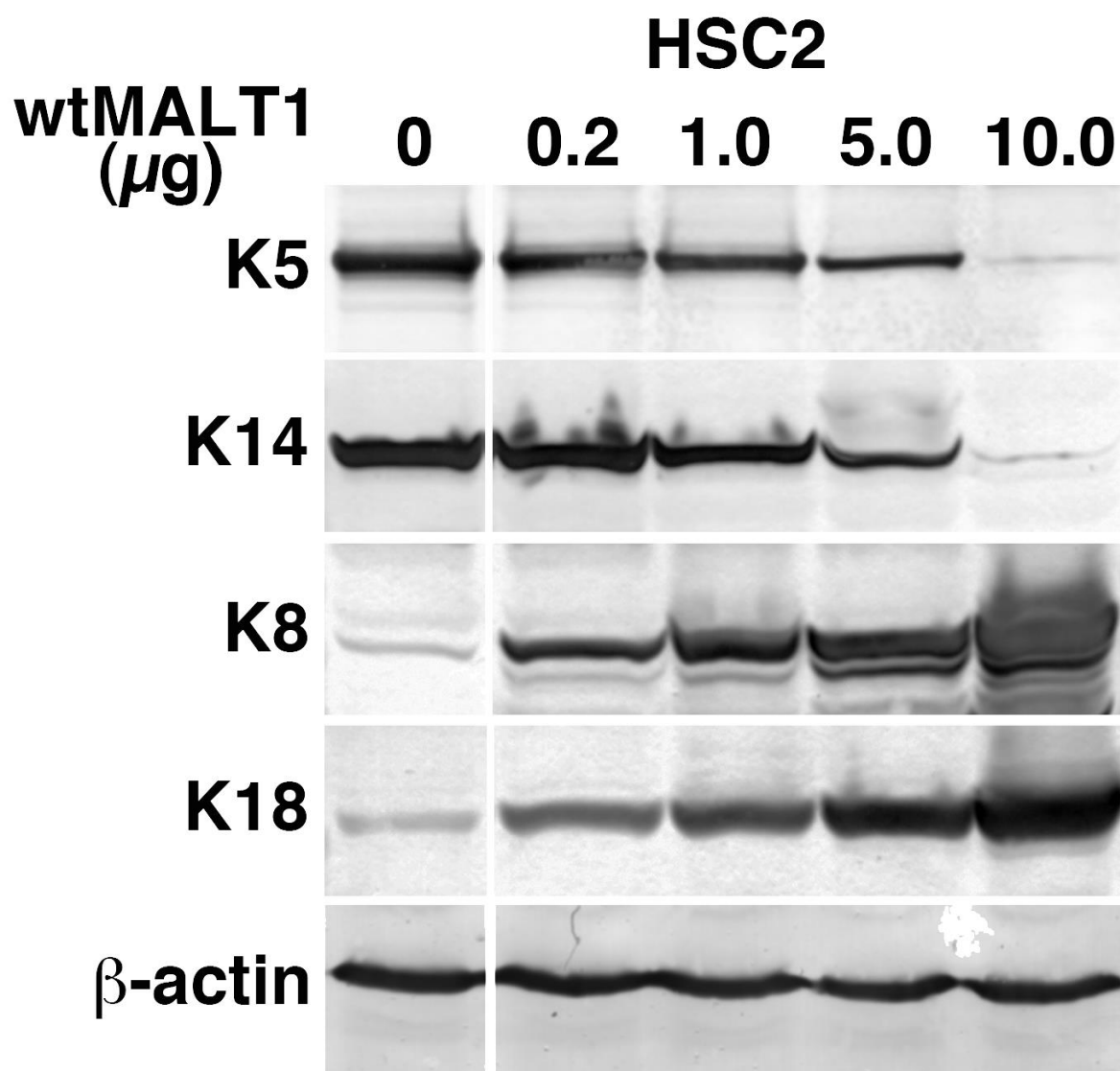


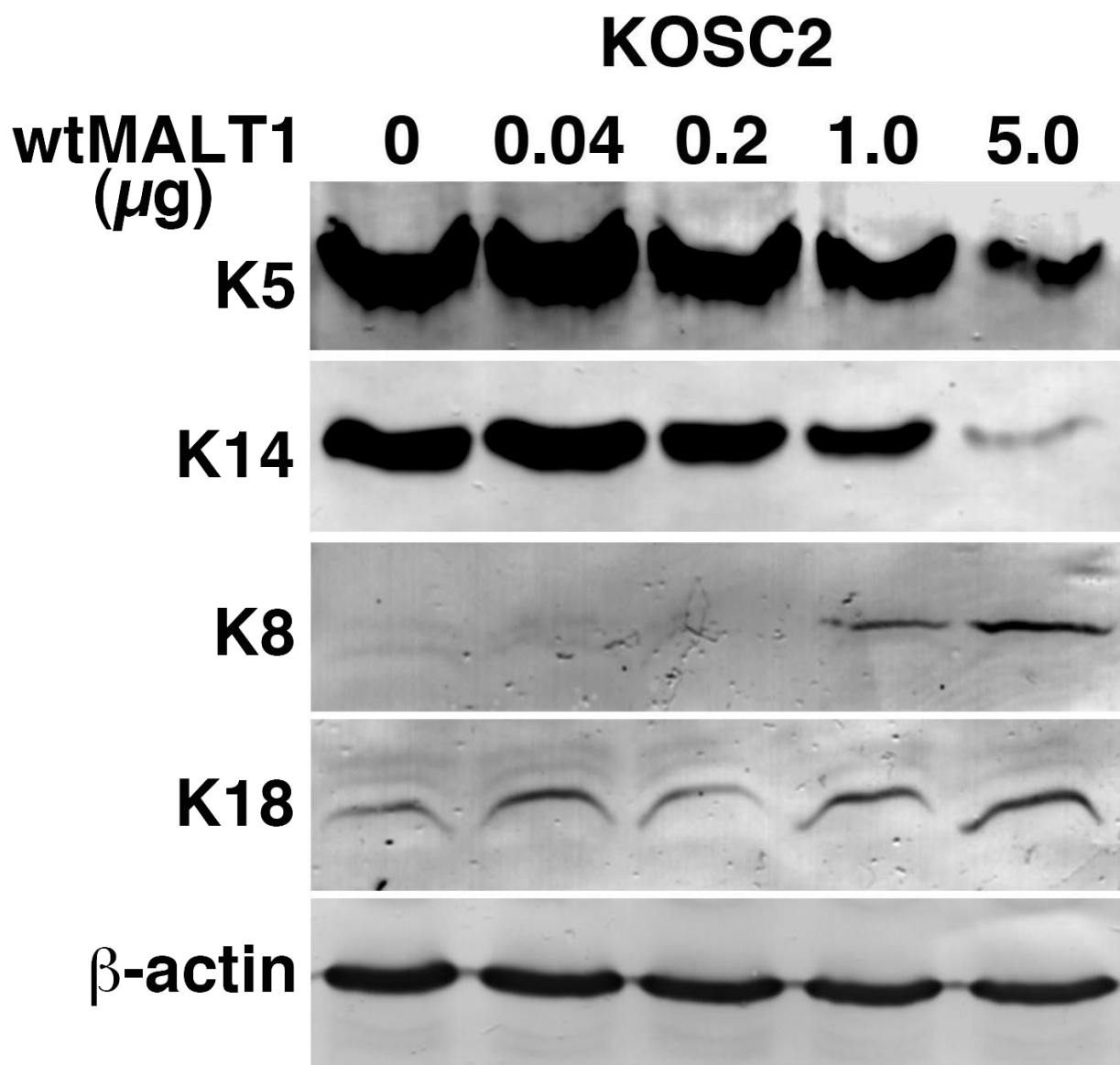


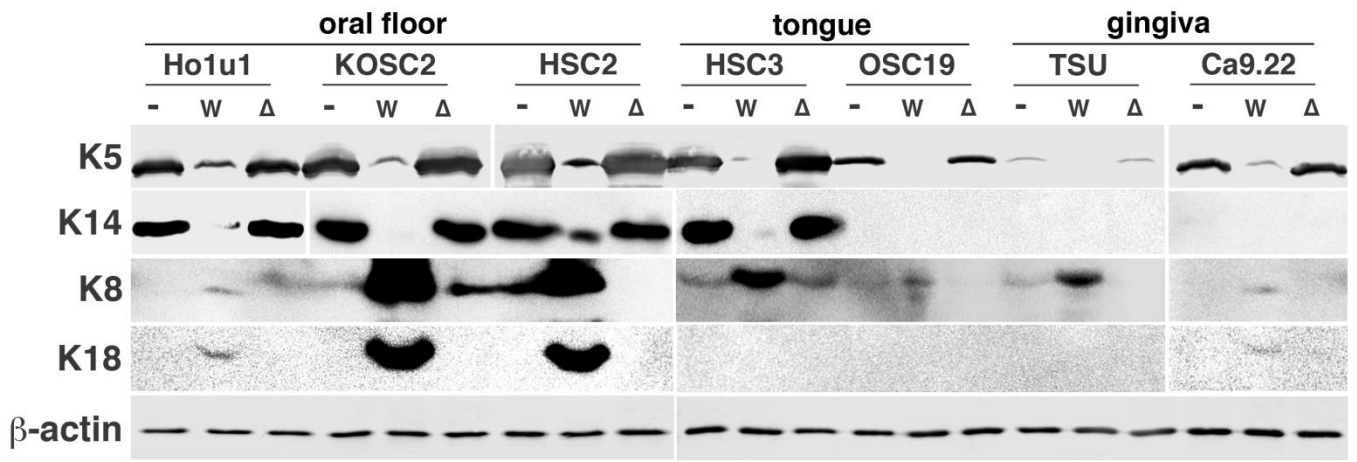




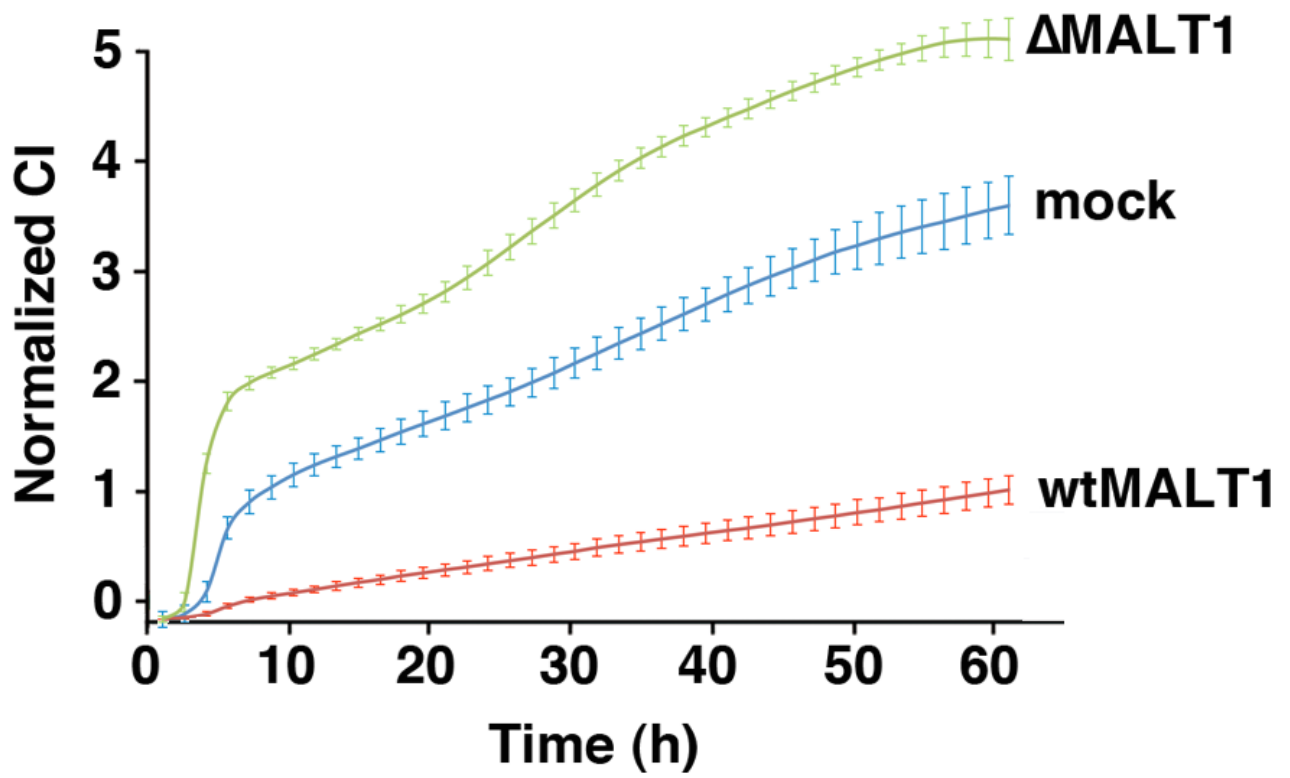


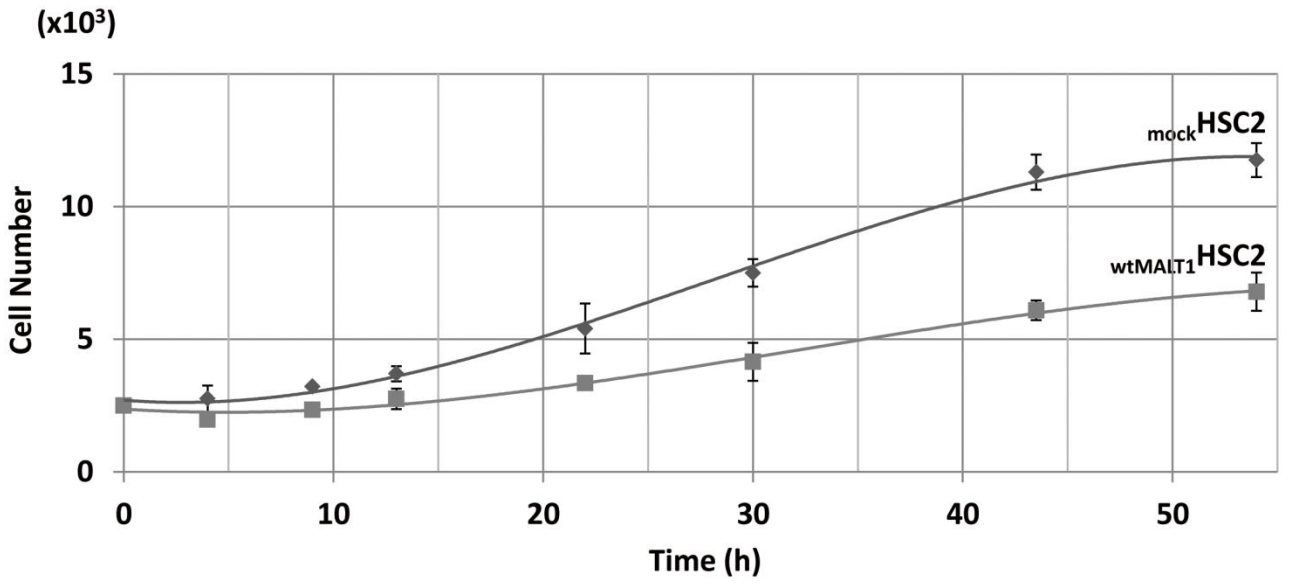


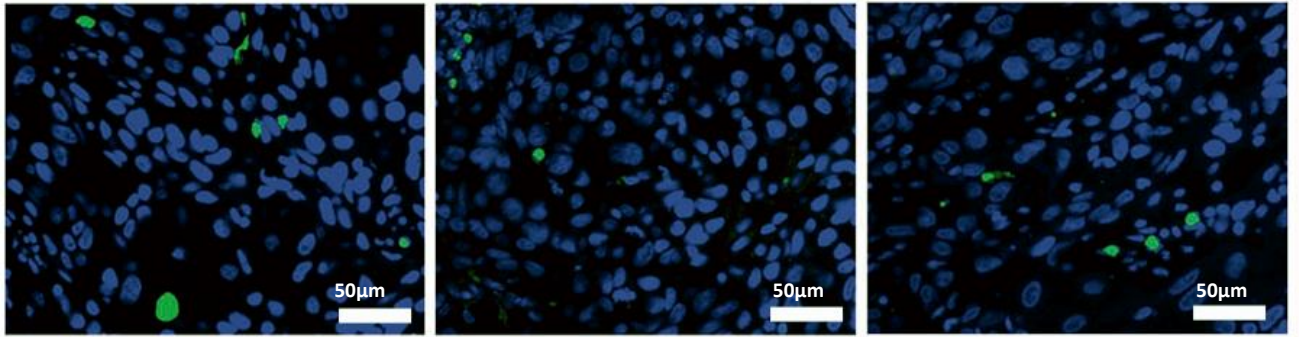








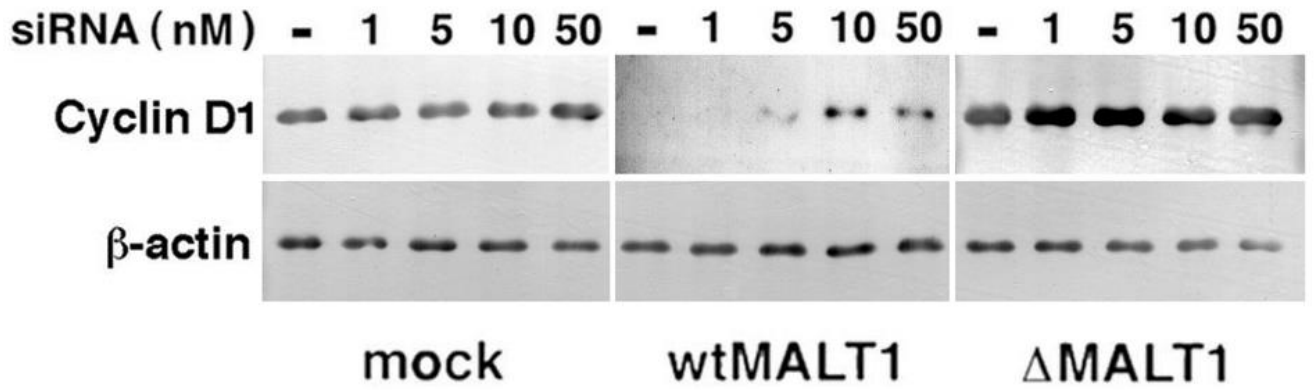


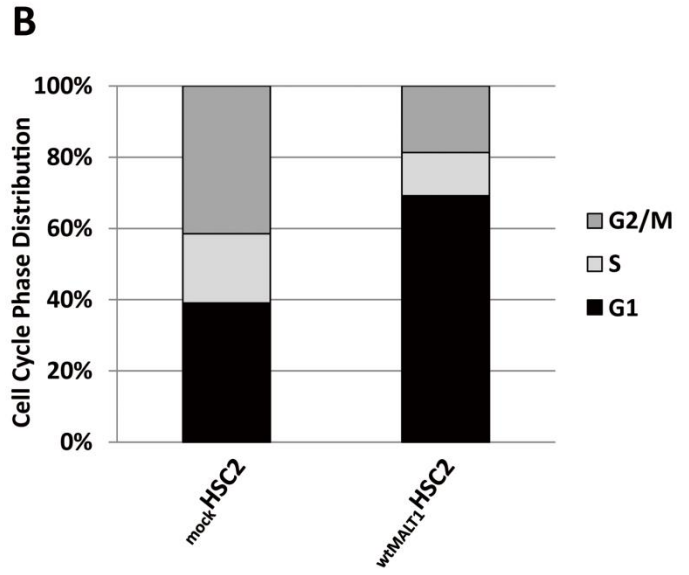
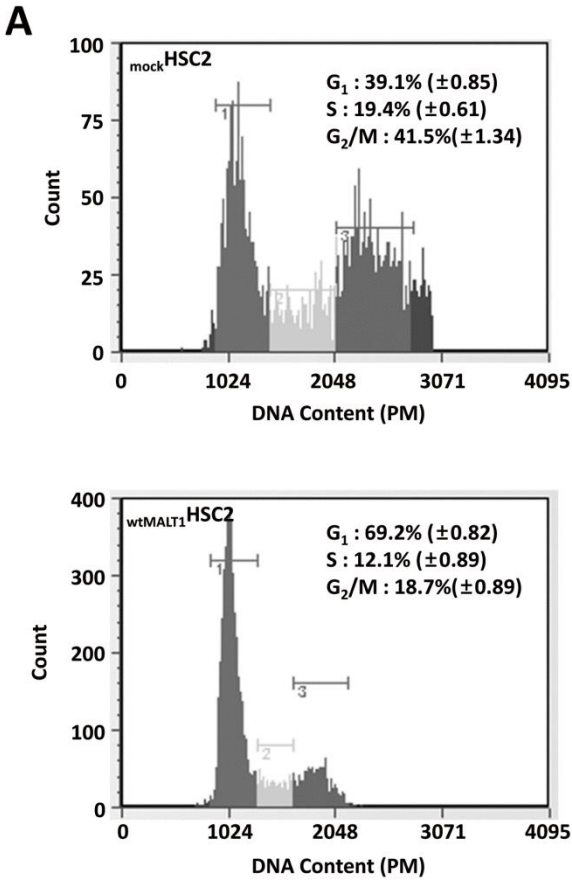


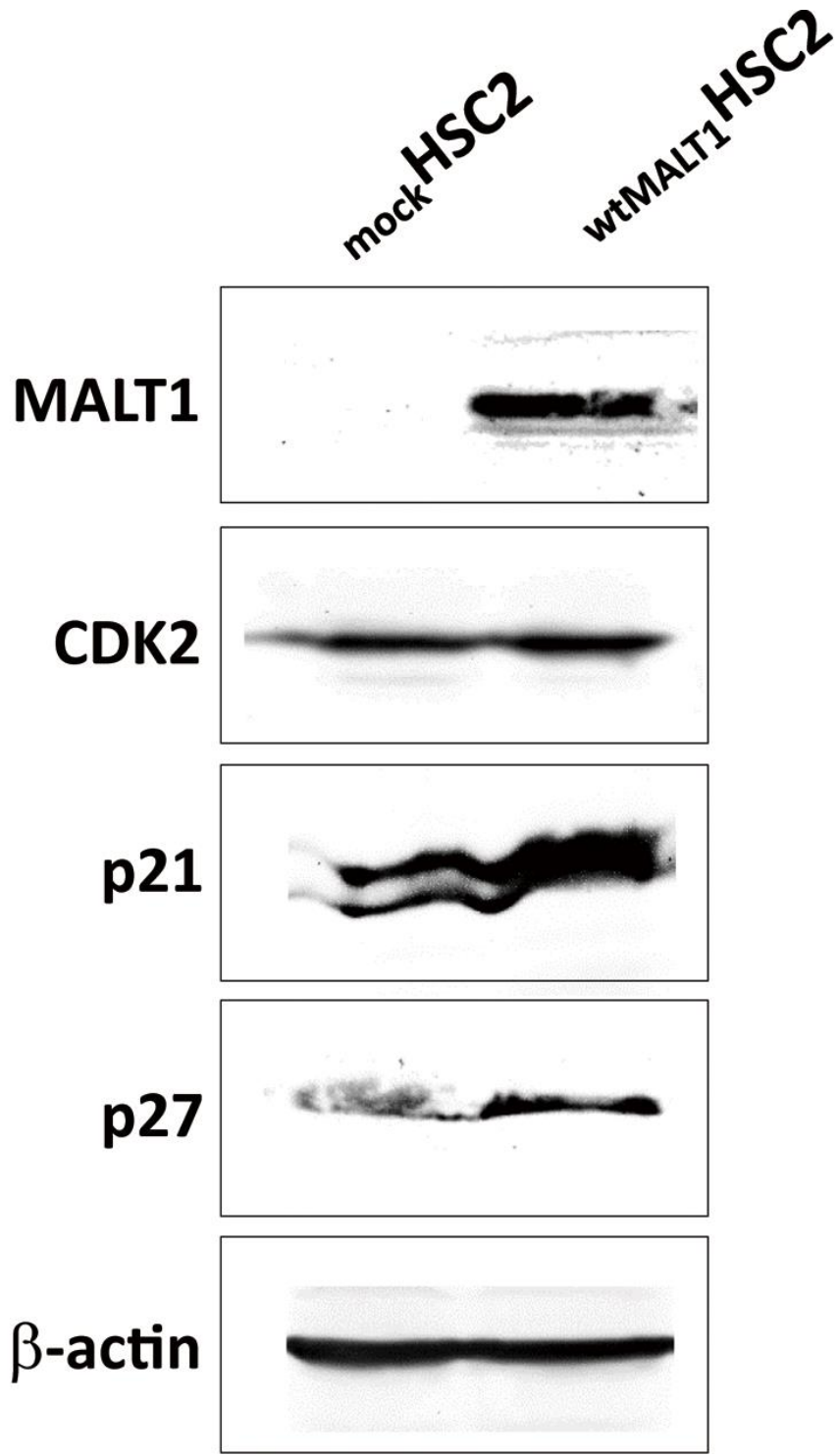
**mock**

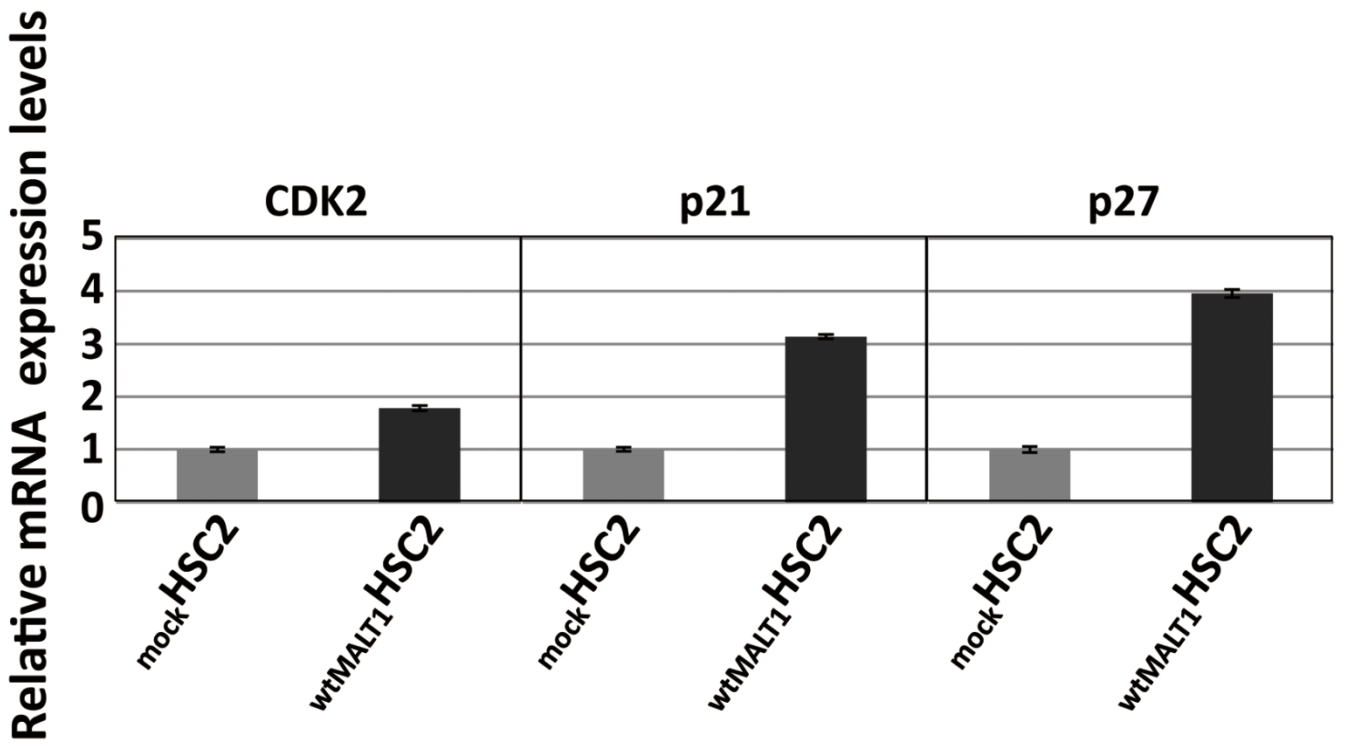
**wtMALT1**

**$\Delta$ MALT1**



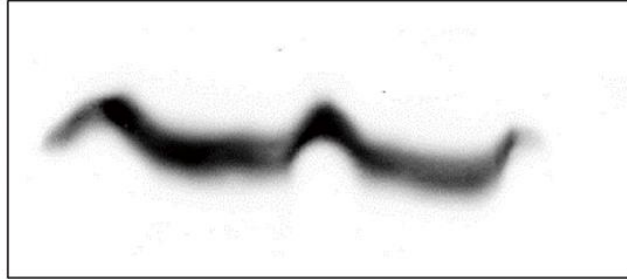






**mock HSC2**      **wtMALT1 HSC2**

**pRb**



**ppRb**





Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation

