

癌細胞由来の High mobility group box 1(HMGB1)が

マウス正常舌筋線維におよぼす影響

瀧澤将太

明海大学大学院歯学研究科

歯学専攻

(指導：坂下 英明 教授)

Influence of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) derived from Cancer Cells
on Mouce Normal Tongue Muscle Fibersof Mice

Shota TAKIZAWA

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor : Prof. Hideaki SAKASHITA)

要旨

High mobility group box 1 (HMGB1) は、全ての正常細胞の核に存在し、ホメオスタシスの維持に関与することが知られている。しかし、近年の研究では、癌の浸潤および転移との関連が示唆されている。そこで、われわれは、癌細胞から放出された HMGB1 がマウス正常舌筋線維にどのように影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。そこで本研究では、BALB 系ヌードマウスの舌に、マウス由来扁平上皮癌 (SCC7 細胞) を移植・着床させ、癌組織部および癌周囲の筋組織における HMGB1 と、HMGB1 の受容体である receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) の局在について免疫組織化学的および mRNA の発現量を検索し、解析を行った。SCC7 細胞を移植した舌では、H-E 染色像において舌前方から舌中央にかけて小径化した筋線維や筋線維の減少が確認された。また免疫組織化学的染色では、HMGB1 と RAGE が癌組織部と癌周囲筋線維部ならびに癌組織部より離れた部位の筋線維部に発現が認められた。免疫組織科学的染色と同様に、mRNA の発現量においても、癌組織部、癌周囲筋線維部および癌組織部より離れた部位の筋線維部に発現を認めた。以上の結果から、癌細胞より放出された

HMGB1 は、RAGE を介して正常な筋線維を矮小化させ、細胞密度の高い骨格筋に間隙ができ、癌が浸潤するのを促進している可能性が示唆された。

索引用語 : SCC7, HMGB1, RAGE, Tongue Cancer, Mouse

欄外表題 : High mobility group box 1(HMGB1)が筋線維におよぼす影響

緒 言

口腔癌の好発部位は舌であり，ほとんどの口腔癌は扁平上皮癌の組織型をとる¹⁻⁶⁾．外科的な切除範囲は異なるが，外科的切除により，摂食障害，構音障害，嚥下障害が起り，人体に多大な影響を与えることが知られている⁷⁻¹²⁾．それゆえに，口腔癌の発生，浸潤，転移についての研究は盛んであり，それらに関する遺伝子やさまざまな因子の解析が行われてきた¹³⁻¹⁶⁾．

近年，口腔癌に関する研究の中でも，high mobility group box 1 (HMGB1) というタンパク質は，癌の浸潤・転移への関与が強く示唆されている．HMGB1 は，正常な状態では全ての細胞の核内に存在するタンパク質であり，生体の恒常性の維持に関与していることが知られている¹⁷⁾．しかし，HMGB1 がネクローシスに陥った細胞から細胞外へ放出されると，敗血症のような種々の重症病態の後期メディエーターとして機能し，炎症反応や細胞遊走が促進される¹⁸⁻²¹⁾．HMGB1 は炎症のメディエーターとしてだけでなく，胃癌や結腸癌では腫瘍と正常細胞との境界部にある癌細胞で過剰に発現したという報告がある²²⁾²³⁾．さらに，HMGB1 は扁平上皮癌において腫瘍マーカーとしても使用されることが知られている²⁴⁾²⁵⁾．

そこで，本研究では癌から放出された HMGB1 が，周囲の筋組織にどのような影響を与えているのか明らかにすることを目的とした．実験マウスは，マウ

ス腹壁より分離された扁平上皮癌である、SCC7 細胞²⁶⁾²⁷⁾ を舌に移植し作成した。HMGB1 および HMGB1 の受容体である receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)²⁸⁾ の観察は、免疫組織化学的染色を用いた。さらに、HMGB1 と RAGE の mRNA の発現量についても検索し、比較検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験は 4 週齢の BALB/cAJcl-nu/nu ノードマウス (日本クレア, 東京, 日本) のオス (24 匹) を用いて行った。癌を自然に舌筋中に発癌させた場合は、試料の間に誤差が生じる。そのため、実験群はマウス腹壁由来の扁平上皮癌である、SCC7 細胞 (理化学研, 埼玉, 日本) を移植した。まず、SCC7 細胞を 1×10^6 個/ml の濃度に Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 液で調製した。その後、マウスにエーテル麻酔を行い、SCC7 細胞を、舌中隔を越えないように舌尖部から 3 mm 後方の舌左側面に移植した。移植には 26G の注射針 (テルモ, 東京, 日本) を使用し、可及的緩徐に SCC7 細胞を 100 μ l 注入した (Fig. 1)。

SCC7 細胞を注入した群を SCC7 細胞注入群と設定した。また、ネガティブコントロールは DMEM を注入した DMEM 注入群と設定した。そして、通常飼育を行った群を無刺激群と設定し、これら 3 群を作成した。

SCC7 細胞および DMEM の注入は、1 回/1 週間行い、計 4 回行った。注入した後は通常飼育を行い、それぞれ最後に注入した時から 1 週間後に試料を採取した。また、本研究は明海大学歯学部動物倫理委員会の承認（承認番号：A1302）を得ており、実験動物は明海大学歯学部動物実験ガイドラインに従って飼育した。

2. 組織化学的染色法

1) 切片作成

試料となる舌は、エーテルにて安楽死させた各群のマウスから、舌根部で切除し採取した。次に、採取した舌を、液体窒素で冷却したイソペンタンを用い、直ちに急速凍結した。その後、厚さ 10 μ m の前頭断連続凍結切片をクライオスタットを用いて、各群の舌前方および舌中央から作成した (Fig. 2A)。一部の切片は形態観察のために通法に従って、hematoxylin and eosin (H-E) 染色を行った。

2) 免疫組織化学的染色

切片を室温で乾燥後、内因性ペルオキシダーゼ除去のため 0.01% H₂O₂/methanol 溶液中で 10 分間処理した。その後、切片を 0.1% Tween 20/0.05 M トリス緩衝生理食塩水 (TBST, pH 7.6) で 10 分間洗浄し、10% 正常ヤギ血清 (ヒストファイン SAB-PO (R) キット, ニチレイ, 東京, 日

本) を室温で 30 分間反応させた。次に、切片に一次抗体を室温で一晩反応させた。一次抗体は、10% 正常ヤギ血清で希釈したウサギ抗ヒト HMGB1 モノクローナル抗体 (希釈倍率 1 : 100, Abcam, Cambridge, UK) と 10% 正常ヤギ血清で希釈したウサギ抗ヒト RAGE モノクローナル抗体 (希釈倍率 1 : 100, Abcam) を使用した。

切片を TBST で洗浄後、ビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (ヒストファイン SAB-PO (R) キット, ニチレイ) を二次抗体として使用し、室温で 1 時間反応させた。

その後、切片を TBST で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識スレプトアビジン液 (ヒストファイン SAB-PO (M) キット, ニチレイ) を室温で 1 時間反応させた。次いで、切片を TBST で洗浄し、0.02% H₂O₂/0.01% 3,3'-diaminobenziden tetrahydrochloride (DAB, 同仁化学, 熊本, 日本) 溶液中で発色させた。切片を水洗後、脱水・透徹し、封入を行った。その後、光学顕微鏡で切片の観察・写真撮影を行った。なお、陰性対照標本は一次抗体の代わりに 10% 正常ヤギ血清を反応させた後、同様に染色を行い、非特異的な免疫反応のないことを確認した。また、陽性対照は、HMGB1 では同一切片内の骨格筋線維の細胞核が特異的に染色されたこと、RAGE では血管内皮細胞が特異的に染色されたことを確認した。

3) 観察部位

a) SCC7 細胞注入群

観察部位は、舌前方と舌中央とした。それぞれ、癌組織部、癌周囲筋線維部（以下、周囲筋部）、癌組織に接しない遠位筋線維部（以下、遠位筋部）の合計 4 部位を観察した（Fig. 2B）。

b) DMEM 注入群

観察部位は舌前方と舌中央の 2 部位とした。

c) 無刺激群

観察部位は舌前方と舌中央の 2 部位とした。

3. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法

1) Laser Microdissection (LMD) のための切片作成

切片は、組織化学的染色時に作成した試料から、クライオスタットを用いて厚さ 10 μm の前頭断切片を作成した。その後、切片は LMD 用スライドガラスである Membrane Slides (Leica, Wetzlar, Germany) に貼り付けた。次いで、氷上にて切片を 70% エタノールに 3 分間浸漬し、氷冷水 (RNase-free) に 1 分間浸漬した。LMD を行う際に細胞の核が確認できるように、切片をトルイジンブルー (0.05% トルイジンブルー溶液) にて染色した。その後、切片を氷冷水にて洗浄し、5 分間乾燥させた。

2) LMD 法による試料採取

各群の観察部位を、LMD6500 (Leica) を用いてレーザーカットした。カットされた試料は、74.35 μl の RLT buffer (Qiagen, Venlo, Netherlands) に 0.65 μl の β -mercaptoethanol を混和した溶液の入った 100 μl チューブへ回収した。

3) 観察部位

a) SCC7 細胞注入群

試料は、舌前方 (刺入部, 辺縁部), 舌中央 (癌組織部, 周囲筋部, 遠位筋部) の合計 5 部位を採取した (Figs. 3A, 3B)。

b) DMEM 注入群

試料は、舌前方 (刺入部, 辺縁部) と舌中央の合計 3 部位を採取した (Fig. 3C, 3D)。

c) 無刺激群

試料は、舌前方と舌中央の 2 部位を採取した (Figs. 3E, 3F)。

4) Total RNA の抽出, 精製

LMD6500 を用いて回収した試料をボルテックスにて 30 秒間ホモジナイズした。その後、RNeasy/Mini Kit (Qiagen) を使用して total RNA を抽出した。

ホモジナイズされたライセートに 75 μ l の 70% エタノールを添加し、ピペッティングによりよく混和した。その後、全てのサンプルを 2 ml コレクションチューブにセットした RNeasy MinElute Spin Column にアプライし、9200 \times *g* で 15 秒間遠心操作を行った。遠心操作の後、チューブ内のろ液を破棄した。次いで、RNeasy MinElute Spin Column のスピncラム・メンブレンを洗浄するために、チューブに Buffer RW1 を 350 μ l 添加し、9200 \times *g* で 15 秒間遠心操作を行った。

さらに、DNA を加水分解するため、10 μ l の DNase I 溶液と 70 μ l の Buffer RDD 溶液を混和し、その溶液の 80 μ l を RNeasy MinElute Spin Column メンブレンに直接添加した後、室温 (20 $^{\circ}$ C \sim 30 $^{\circ}$ C) にて 15 分間インキュベーションを行った。インキュベーションの後、メンブレン洗浄のためチューブに Buffer RW1 を 350 μ l 添加し、9200 \times *g* で 15 秒間遠心した後、チューブ内のろ液を破棄した。メンブレン洗浄のためチューブに Buffer RPE を 500 μ l 添加し、9200 \times *g* で 15 秒間遠心操作を行い、チューブ内のろ液を破棄した。続いて、洗浄を目的にチューブに 500 μ l の 80% エタノールを添加し、9200 \times *g* で 2 分間遠心操作を行い、ろ液とコレクションチューブを破棄した。RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、スピncラムの蓋を開けた状態で 9200 \times *g*

で5分間遠心操作を行い、ろ液の入ったコレクションチューブを破棄した。

RNeasy MinElute Spin Column を新しい 1.5 ml コレクションチューブにセットし、RNase フリー水 14 μ l をスピニングカラム・メンブレンの中央に直接添加した後、22100 \times g で1分間遠心操作を行い、total RNA を抽出した。

5) 定量 RT-PCR 法による mRNA 発現の解析

cDNA は Transcriptor First Strand complementary DNA (cDNA) Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland) を使用し、抽出した total RNA を使用して合成された。

まず 1.5 ml チューブに PCR グレード水 10 μ l と Anchored-oligo [dT]₁₈ primer を混和し、そこへ total RNA を 2 μ l 添加した。さらに、そこへ Transcriptor reverse transcriptase buffer 4 μ l, Protector RNase inhibitor 0.5 μ l, Deoxynucleotide Mix 2 μ l, Transcriptor reverse transcriptase 0.5 μ l を添加しよくピペティングにて混和した。その後、サーマルサイクラー PC320 (ASTECH, 福岡, 日本) にて 55°C・30 分間インキュベーションし、さらに 85°C・5 分間加熱し、cDNA を合成した。

合成した cDNA を 5 μ l, LightCycler 480 Probe Master (Roche) の Master Mix を 10 μ l, Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche) で設計したプライマー (forward 1.0 μ l, reverse 1.0 μ l) および対

応する加水分解プローブ (Table 1) を 1.0 μ l 添加しピペッティングにて混和した。混和した溶液を 96 穴ウェルプレート (Roche) に一穴あたり 20 μ l ずつ添加し, LightCycler480 (Roche) にて mRNA の発現量を解析した。サイクル条件は 95°C10 分 1 サイクル (pre-incubation), 95°C10 秒, 60°C 30 秒にて 60 サイクル (amplification), 40°C30 秒 1 サイクル (cooling) とした。各 mRNA の発現量は housekeeping gene である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現量で割り, 相対定量を行う advanced relative quantification 法にて比較検討した。

5) 有意差検定

HMGB1 および RAGE の mRNA 量の比較を, Tukey's HSD test を用いて行った。また, P 値が 0.01 以下のものを有意とした。

結 果

1. H-E 染色による形態学的変化の観察

1) SCC7 細胞注入群 (Fig. 4)

舌前方では、筋束構造の破壊が刺入点側に確認された (Fig. 4A)。筋線維のサイズは大小不同であり、正常な筋線維よりも小径化している筋線維 (arrow a) および細胞核が確認できない筋線維 (arrow b) が認められた。筋線維の小径化により、筋線維と筋線維の間は離開していた。また、筋病変でよく観察される細胞内空胞化した筋線維 (arrow c) や、少数の再生筋特有の中心核を持った筋線維 (arrow d) が確認できた。

舌中央では、癌組織 (*) が舌中隔を越えて増殖・着床しているのが確認された (Fig. 4B)。周囲筋部では、舌前方と同じく筋束構造が破壊されており (Fig. 4C)、筋線維の小径化 (arrow a) や細胞核が確認できない筋線維 (arrow b) が存在していた。また、筋線維の減少、小径化により筋線維間の間隙の増大を認めた。さらに、ほとんどの筋線維は細胞内空胞化を呈していた (arrow c) が、舌前方でみられた再生筋は全く確認できなかった。

また、遠位筋部 (Fig. 4D) でも、筋束構造が破壊されており、筋線維の小径化 (arrow a) や筋線維の減少、細胞核が確認できない筋線維 (arrow b)、筋線維間に間隙の増大を認めた。そして一部の筋線維は少数の筋線維の集

団として点在していた。さらに少数ではあるが、細胞内空胞化した筋線維 (arrow c) と中心核をもつ再生した筋線維 (arrow d) も確認された。

2) DMEM 注入群 (Figs. 5A, 5B)

舌前方では、ほとんどの領域で正常な筋線維が占めていた。しかし、刺入点側で筋束構造はわずかに破壊され、筋線維の小径化 (arrow a) や筋線維の減少により筋線維間の間隙の増大も一部に認められた (Fig. 5A)。

それに対し舌中央では、筋束構造の破壊や筋線維の小径化、筋線維の減少は観察できず、舌は正常な筋線維構造を呈していた (Fig. 5B)。

3) 無刺激群 (Figs. 5C, 5D)

舌前方では、筋束構造は正常に保たれており、筋線維の小径化や筋線維の減少は認められなかった。また、細胞内が腔胞化した病的な筋線維や再生筋、そして筋線維間の間隙の異常な増大はまったく認められなかった (Fig. 5C)。舌中央においても DMEM 注入群と同様に、正常な筋束構造が確認された (Fig. 5D)。

以上のことから H-E 染色像において、筋線維と筋線維の間隙が SCC7 細胞注入群の舌前方・中央および DMEM 群の舌前方では、増大していることがわかった。

2. 免疫組織化学的染色 (HMGB1 および RAGE)

1) SCC7 細胞注入群 (Figs. 6, 7)

舌前方では、筋束構造が破壊され筋線維間隙が増大していた。そして、その間隙に接した筋線維の周辺部 (arrows a) および正常な筋線維の核 (arrows b) に HMGB1 の発現が認められた (Fig. 6A)。しかし、RAGE は増大した筋線維間隙に接した筋線維 (arrows a) の周辺部のみに発現を認めた (Fig. 6B)。

一方、舌中央では癌組織 (*) と癌周囲の増大した筋線維間隙に接する筋線維の周辺部 (arrows a) および正常な筋線維の核 (arrows b) に HMGB1 の発現が認められた (Fig. 7A)。さらに、RAGE においても癌組織と増大した筋線維間隙に接した筋線維の周辺部 (arrows a) で発現が認められたが、正常な筋線維の核には RAGE は発現しなかった (Fig. 7B)。

また、遠位筋部では増大した筋線維間隙に接した筋線維の周辺部 (arrows a) および正常な筋線維の核 (arrows b) に HMGB1 の発現を認めた (Fig. 7C)。しかしながら、RAGE は増大した筋線維間隙に接した筋線維の周辺部 (arrows a) に発現したが、正常な筋線維核では全く発現が認められなかった (Fig. 7D)。

2) DMEM 注入群 (Fig. 8)

舌前方では、筋線維間隙の増大を一部認めた。HMGB1 は、その間隙に

接した筋線維の周辺部 (arrows a) および正常な筋線維の核 (arrows b) に発現していた (Fig. 8A). それに対し RAGE は, 筋線維に全く発現を認めなかった (data not shown).

同様に舌中央においても, HMGB1 は正常な筋線維の核 (arrows b) に発現していたが (Fig. 8B), RAGE の発現は全く認められなかった (data not shown).

3) 無刺激群 (Fig. 9)

舌前方と舌中央の両領域では, HMGB1 は正常な筋線維の核 (arrows) にのみ発現を認めたが (Figs. 9A, 9B), RAGE の発現は全く認められなかった (data not shown).

3. mRNA の発現量

予備実験にて, 培養した SCC7 細胞は, HMGB1 および RAGE の mRNA を発現していることを確認した.

1) HMGB1 (Fig. 10)

HMGB1 の mRNA の発現は SCC7 細胞注入群, DMEM 注入群, 無刺激群の 3 群全ての部位で認められた. HMGB1 の mRNA が最も多く発現したのは SCC7 細胞注入群の舌中央の癌組織部で, 他の全ての部位よりも有意に強い発現を認めた (*).

さらに、SCC7 細胞注入群の舌中央の周囲筋部は、癌組織部以外の全ての部位と比較し有意な HMGB1 の mRNA の発現を認めた (**). また、SCC7 細胞注入群の遠位筋部は、無刺激群に対してのみ有意な HMGB1 の mRNA の発現を認めた (***)).

それに対し、HMGB1 の mRNA は SCC7 細胞注入群の舌前方の辺縁部と DMEM 群および無刺激群の各部位は、あまり発現を認めなかった.

2) RAGE (Fig. 11)

RAGE の mRNA は、HMGB1 の mRNA 量が多く発現した SCC7 細胞注入群の舌中央（癌組織部、周囲筋部、遠位筋部）の 3 部位でのみ、発現を認めた. これらのうち、癌組織部が最も RAGE の mRNA を発現した.

それに対し、RAGE の mRNA の発現は SCC7 細胞注入群の舌前方および DMEM 注入群、無刺激群では全く認められなかった.

考 察

1. SCC7 細胞注入による筋組織の形態変化

ヒトの舌の形成は、舌正中の無対舌結節の出現と、その両側に外側隆起が出現することで胎生第4週の終わりに始まる。分界溝より前の舌前2/3の部分はこれらの3つの突起が前後方向に成長することで形成され、舌後1/3の部分は第三鰓弓に由来する間葉組織によって形成される。これに対し、舌筋の大部分は他の体幹の骨格筋と同様に筋節から遊走してきた筋芽細胞に由来する²⁹⁾。

成熟した骨格筋組織は、外周を筋膜に覆われている。その内部にはさらに、疎性結合組織、神経、血管から構成される筋周膜に包まれた筋束が多数存在している。さらに、筋束の内部には筋線維が数十～数百存在しており、筋線維と筋線維の間は少量の結合組織で構成される筋内膜でのみ覆われている。これらのことから、筋組織は細胞密度の高い組織として知られている³⁰⁾。骨格筋の疾患はWFN-Waltonの分類で示されるように、筋そのものに何らかの原因がある筋原性疾患と、筋を支配する神経の異常により筋線維が萎縮する神経原性筋疾患の二つに大別される³¹⁾。筋原性疾患の主病変は筋線維の変性と壊死である。さらに、筋原性疾患は先天的なものと後天的なものに分けられる³¹⁾。筋線維が壊死と再生を繰り返すと、筋線維のタイプに変化が生じる。先天的な筋原性疾患の代表的な疾患である筋ジストロフィー患者の筋組織に、Actomyosin

adenosine triphosphatase stain (ATPase) 染色を行うと、全ての pH で陽性反応を示す再生筋（タイプ 2C）が増加していることが報告されている³²⁾。これは再生が活発であることを示し、壊死や再生が繰り返し行われていることを示している。しかしながら原因は不明であるが、再生が活発に行われているにも関わらず壊死した筋量を代償できないため、筋線維はしだいに数を減らしていく³³⁾³⁴⁾。そして筋ジストロフィー患者の末期では、ほとんどの筋線維の消失と、筋線維の結合組織と脂肪への置換により、筋の伸展性がなくなると言われている³⁵⁾。

口腔内に発生する上皮性悪性腫瘍は口腔癌とよばれ、そのほとんどは口腔粘膜上皮由来の扁平上皮癌である¹⁻⁶⁾。人体の構造上、ほとんどの口腔粘膜の下には筋組織が存在している。そのため、筋組織は癌の侵襲を受ける。とりわけ、口腔癌の発生頻度の高い舌は骨格筋を芯とする組織であるため、内行性に癌が深く浸潤している場合には大部分の舌筋を切除することになる。その結果、手術後に舌運動が障害され、摂食障害、構音障害、嚥下障害などの臨床症状が発現することが知られている⁷⁻¹²⁾。これまで頭頸部における癌の発生原因や浸潤度などに関する研究はさまざまに行われてきた³⁶⁻⁴⁰⁾。しかし、癌の侵襲を受けた周囲組織、とくに筋線維がどのように変化しているのかに焦点をあてた報告はほとんどない。

そこで本研究では、ヌードマウスの舌尖の片側に SCC7 細胞を移植し、舌に SCC7 細胞を着床させることで、癌が舌筋にどのような影響を与えるのかについて検索を行った。その結果、SCC7 細胞注入群では、癌周囲筋線維および癌組織と接触のない遠位にある筋線維の筋束構造が破壊されていることがわかった。また、筋束構造の破壊だけではなく、筋原性疾患と同様の筋線維の小径化や筋線維の減少が観察された。その結果、筋線維と筋線維の間隙の増大を認めた。つまり、SCC7 細胞を注入した舌では、筋の伸展性がなくなると言われている筋ジストロフィーと似た筋線維構造を呈していた。このことから、舌癌においても舌筋の機能低下が生じている可能性が示唆された。

また、正常な舌筋は、速筋型の筋線維で構成されていることが知られている⁴¹⁾⁴²⁾。しかし、癌と隣接した舌筋は癌細胞の存在により遅筋型へ変わったことを崎山らは報告している²⁴⁾。今回、筋束構造が遠位の筋線維でも破壊されていたことから、同部の筋線維は筋線維特性が変化している可能性がある。

DMEM 注入群では、針を刺入した部位に局限した筋束構造の破壊を認めた。しかし、その範囲は狭くその他の部位の筋組織は正常であった。つまり筋束構造の破壊が DMEM 注入群では軽度であるのに対し、SCC7 細胞注入群の舌中央では刺激の加わっていない部位にまで広範囲に認められた。以上のことから、癌細胞の存在が周囲の筋組織へ影響を及ぼし、筋組織の破壊が引き起こされた

と考えられた。

2. HMGB1 および RAGE の筋線維への影響

後天的な筋原性疾患の代表に、特発性筋炎がある。HMGB1 は特発性筋炎患者の筋線維の核および細胞質に強度の発現を認めた。このことから、HMGB1 は筋線維の萎縮に関与している可能性があることが報告されている⁴³⁾。HMGB1 は、全ての正常な細胞核に存在する 30kDa の非ヒストン結合タンパク質として同定された¹⁷⁾。実際、著者の結果においても HMGB1 は、筋束構造や筋線維に病的な所見を認めなかった DMEM 注入群の舌中央および無刺激群の骨格筋の核で発現を認めた。HMGB1 が核内に存在する場合、ヒストン H1 と置換してヌクレオソーム構造を弛緩させる。このことから HMGB1 は、クロマチンを転写反応に最適な構造へと変換させるクロマチン構造変換因子として働き、転写を促進するなど重要な役割を果たしているといわれている⁴⁴⁾。そして、HMGB1 はアポトーシスでは放出されないのに対し、ネクローシスに陥った細胞では、細胞核から大量に放出されることが報告された⁴⁵⁻⁴⁷⁾。また、HMGB1 は炎症発症時には Toll-like receptor (TLR) に結合し、炎症の波及にも関わっているとされている⁴⁸⁾。

一方 RAGE は、1992 年に advanced glycation endproducts (AGE) と結合する 55kDa の膜一回貫通型の細胞表面受容体として同定された²⁸⁾。その後

RAGE は HMGB1 の受容体として働くことが分かった⁴⁷⁾。RAGE の発現は血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，周皮細胞および腎メサンギウム細胞など広範な組織で認められているが，一般的な生理条件下での発現は低い⁴⁹⁾。しかし，RAGE の発現はリガンドである AGE や HMGB1 が蓄積している部位で亢進することが知られている⁴⁶⁾。RAGE と動脈硬化，糖尿病，急性冠症候群などの関係について研究が進む中，神経膠腫および扁平上皮癌の浸潤や転移に RAGE が HMGB1 とともに関与しているという報告がなされた⁴⁷⁾。さらに結腸癌において，HMGB1 が RAGE を介して作用することで，nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や inducible nitric oxide synthase (iNOS) を活性化し，癌の浸潤や転移に関与すると報告されている⁵⁰⁾。

免疫組織化学的染色の結果では，HMGB1 は注射針を刺入した SCC7 細胞注入群の舌前方で，正常な筋線維の核と増大した筋線維間隙に接した筋線維の周辺部に発現が認められた。一方，RAGE は増大した筋線維間隙に接した筋線維の周辺部のみに発現が認められた。HMGB1 は壊死した細胞の細胞核から大量に放出されることが知られている⁴⁰⁻⁴²⁾。このことから，HMGB1 が強度に発現した SCC7 細胞注入群の舌前方では，筋線維が一次的な組織侵襲を受けたことにより壊死したと考えられた。そして HMGB1 が大量に放出された結果，RAGE の発現が誘導されたと示唆された。しかしながら，RAGE の mRNA は，SCC7

細胞注入群の舌前方では全く発現しなかった。これは、破壊された筋線維に再生が始まり、壊死した筋線維からの HMGB1 の放出が減少したことで RAGE の mRNA の発現が止まったと考えられた。

一方 DMEM 注入群の舌前方では、免疫組織化学的染色像において HMGB1 は正常な筋線維の核のみならず、増大した筋線維間隙に接した筋線維の周辺部にも発現していた。しかし、RAGE は増大した筋線維間隙に接した筋線維の周辺部には発現が認められなかった。また、HMGB1 の mRNA の発現はあったが RAGE の発現は認められなかった。

この RAGE の発現の違いは、DMEM 注入群が SCC7 細胞注入群よりも治癒傾向にあったため HMGB1 の発現が少なくなり、免疫組織化学および RT-PCR の結果で RAGE が検出されなかったためと考えられた。したがって、癌組織の存在が正常な筋組織の再生を遅延させていることが示唆された。

一方 SCC7 細胞注入群の舌中央では、HMGB1 と RAGE は免疫組織化学的染色および RT-PCR の解析において、癌組織部と癌周囲に増大した筋線維間隙に接した筋線維周辺部で強度に発現していた。さらに、癌組織部と接触のない遠位にある筋線維部においても、HMGB1 と RAGE の強度の発現を認めた。これらの結果から、SCC7 細胞注入群の舌中央では、癌細胞から HMGB1 が過剰に放出されることにより、RAGE が癌細胞および癌周囲に増大した筋線維間隙

に接した筋線維の周辺部に発現したと考えられた。さらに RAGE の発現が、癌組織部と接触のない遠位にある筋線維部にも認められたのは、HMGB1 の影響を受けた癌周囲の筋線維が壊死を起こしたことにより多量の HMGB1 が放出され、さらに遠位の骨格筋組織に作用したためではないかと考えられた。

結 論

本研究では、癌組織の筋肉組織周辺部において筋束構造の破壊、小径化した筋線維、壊死線維および細胞間隙の増加を認めた。さらに、HMGB1 および RAGE は、小径化した筋線維の周辺の壊死線維において強く発現していることがわかった。また、癌組織と直接的接触のない遠位部の筋線維においても同様の所見が得られた。これらの結果より、癌細胞から放出された HMGB1 が癌の周辺の筋線維の小径化、および壊死を誘導し細胞間隙を増加させ、増加した細胞間隙を介して HMGB1 が遠位の組織に影響を与えることで、癌細胞の浸潤の促進に大きく関与していることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行には、2013年度宮田奨励金 E（瀧澤 将太，舌癌が周囲筋組織に与える影響）の支援と科学研究費助成事業（20791548: Koji Sakiyama.）からの補助金を受けた。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご高閲を賜りました本学歯学部病態診断治療学講座顎顔面外科学分野 坂下 英明 教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、実験と論文作成を直接ご指導下さいました本学形態機能成育学講座解剖学分野 天野 修 教授ならびに崎山 浩司 講師に感謝いたします。

さらに、種々の御懇切なるご教示とご高閲を賜りました病態診断治療学講座病理学分野 草間 薫 教授，ならびに口腔生物再生医工学講座微生物学分野 大森 喜弘 教授に厚くお礼申し上げます。

尚，本研究を行うにあたり種々のご理解，御支援を戴きました解剖学分野と口腔顎顔面外科学分野の諸先生方にも心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Zini A, Nasser N, Vered Y. Oral and pharyngeal cancer among the Arab population in Israel from 1970 to 2006. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 585-9.
- 2) Saadia A, Talat M, M AM, Masood Q. Emerging patterns in Clinico-pathological spectrum of Oral Cancers. *Pak J Med Sci* 2013; 29(3): 783-7.
- 3) Johnson NW, Jayasekara P and Amarasinghe AA: Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000 2011; 57: 19-37.
- 4) Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS, Santos TC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci* 2013; 21: 460-7.
- 5) Chi AC. Epithelial pathology. In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE, editors. *Oral & maxillofacial pathology*. 3rd ed. Philadelphia : Saunders Inc; 2009. p. 409-21
- 6) Silverman S. Epidemiology. In: Silverman S, editor. *Oral Cancer*. 4th ed. Hamilton, London: BC Decker Inc; 1998. p. 1-6.
- 7) Namaki S, Tanaka T, Hara Y, Ohki H, Shinohara M, Yonhehara Y. Videofluorographic evaluation of dysphagia before and after modification of the flap and scar in patients with oral cancer. *J Plast Surg Hand Surg* 2011; 45: 136-42.
- 8) Jäckel MC, Heyny-von Haussen R. Dysphagia and dysarthria due to the long-term growth of a tongue base tumor. *HNO* 2006; 54: 382-4.
- 9) Costa Bandeira AK, Azevedo EH, Vartanian JG, Nishimoto IN, Kowalski LP, Carrara-de Angelis E. Quality of

- life related to swallowing after tongue cancer treatment. *Dysphagia* 2008; 23: 183-92.
- 10) Son YR, Choi KH, Kim TG. Dysphagia in tongue cancer patients. *Ann Rehabil Med* 2015; 39:210-7.
 - 11) Nguyen NP, Moltz CC, Frnak C, Vos P, Smith HJ, Nguyen PD, Nguyen LM, Dutta S, Lemanski C, Sallah S. Impact of swallowing therapy on aspiration rate following treatment for locally advanced head and neck cancer. *Oral Oncol* 2006; 43: 352-7.
 - 12) Stecewicz M, Wysocki R, Halczy-Kowalik L. [Pronunciation and swallowing in patients with tongue deficits following resection of oral cavity tumor]. *Ann Acad Med Stein* 2006; 52(3): 97-106.
 - 13) Ehata S, Hanyu A, Fujime M, Katsuno Y, Fukunaga E, Goto K, et al. Ki26894, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase inhibitor, inhibits in vitro invasion and in vivo bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer Sci* 2007; 98: 127-33.
 - 14) Wu Y, Zhou BP: TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Brg J Cancer* 2010; 102: 639- 44.
 - 15) Baker L, Quinlan PR, Patten N, Ashfield A, Birse-Stewart-BellLJ, McCowan C. p53 mutation, deprivation and poor prognosis in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102: 719-26.
 - 16) Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens M, Nassar A, Kalli KR. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2009; 69: 2887-95.
 - 17) Lee KL, Pentecost BT, D'Anna JA, Tobey RA, Gurley LR, Dixon GH. Characterization of cDNA sequences corresponding to three distinct HMG-1 mRNA species in line CHO Chinese hamster cells and cell cycle expression of the HMG-1 gene. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 5051-68.
 - 18) Yamada S, Inoue K, Yakabe K, Imaizumi H, Maruyama I. High mobility group protein 1 (HMGB1) quantified by ELISA with a monoclonal antibody that does not cross-react with HMGB2. *Clin Chem* 2003; 49: 1535-7.
 - 19) Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 971-81.

- 20) DeMarco RA, Fink MP, Lotze MT. Monocytes promote natural killer cell interferon gamma production in response to the endogenous danger signal HMGB1. *Mol Immunol* 2005; 42: 433-44.
- 21) Rovere QP, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzon M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 2004; 5: 825-30.
- 22) Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, Shigeishi H, Matsutani N, Kuraoka K, et al. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol* 2002; 196: 163-70.
- 23) Kuniyasu H, Chihara Y, Takahashi T. Co-expression of receptor for advanced glycation end products and the ligand amphoterin associates closely with metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 445-8.
- 24) Sakiyama K, Takizawa S, Bando Y, Inoue K, Sasaki A, Kurokawa K, et al. Characteristics and effects of muscle fibers surrounding lingual carcinoma. *J Hard Tissue Biol* 2013; 22: 215-20.
- 25) Zeh HJ 3rd, Lotze MT. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* 2005; 28: 1-9.
- 26) Hirst DG, Brown JM, Hazlehurst JL. Enhancement of CCNU cytotoxicity by misonidazole: possible therapeutic gain. *Br J Cancer* 1982; 46: 109-16.
- 27) O'Malley BW Jr, Cope KA, Johnson CS, Schwartz MR. A new immunocompetent murine model for oral cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 20-4.
- 28) Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation endproducts from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 1992; 267(21): 14987-97.
- 29) Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The Pharyngeal Apparatus. In : *The developing human clinically oriented embryology*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p.176-7.
- 30) Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A. *Muscle Biopsy*. 4th ed. Philadelphia : Saunders; 2013. p. 28
- 31) Walton JN. Clinical examination of the neuromuscular system. In : *Walton JN editor. Disorders of voluntary muscle*. 4th ed, New York: Churchill Livingstone; 1981. p. 469-79.

- 32) Nonaka I, Takagi A, Sugita H. The significance of type 2C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1981; 4: 326-33.
- 33) Lipton BH. Skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. In: Mauro A, Bischoff R, Carlson BM, Shafiq SA, Konigsberg I, Lipton B, editors. *Muscle Regeneration*. New York: Raven Press; 1979. p. 31-40.
- 34) Bradley WG, Hudgson P, Larson PF, Papapetropoulos TA, Jenkison M. Structural changes in the early stages of Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1972; 35: 452-5.
- 35) Lopez MA, Pardo PS, Cox GA, Boriek AM. Early mechanical dysfunction of the diaphragm in the muscular dystrophy with myositis (Ttnmdm) model. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: 1092-1002.
- 36) JJ Pindborg, PA Reichart, CJ Smith, I van Der Waal I. editor. *Carcinoma*. In: *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa*, World Health Organization International histological classification of tumors. 2nd ed. Berlin: Springer Inc; 1997. p. 11-6
- 37) Jakobsson PA, Eneroth GM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1973; 12: 1-8.
- 38) Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; 95(3): 229-49.
- 39) Anneroth G, Hansen LS. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *Scand J Dent Res* 1984; 92(5): 448-68.
- 40) Willén R, Nathanson A, Moberger G, Anneroth G. Squamous cell carcinoma of the gingiva. Histological classification and grading of malignancy. *Acta Otolaryngol* 1975; 79: 146-54.
- 41) Abe S, Maejima M, Watanabe H, Shibahara T, Agematsu H, Doi T, et al. Muscle-fiber characteristics in adult mouse-tongue muscles. *Anat Sci Int* 2002; 77: 145-8.
- 42) Maejima M, Abe S, Sakiyama K, Agematsu H, Hashimoto M, Tamatsu Y, Ide Y. Changes in the properties of mouse tongue muscle fibres before and after weaning. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 988-93.
- 43) Grundtman C, Bruton J, Yamada T, Ostberg T, Pisetsky DS, Harris HE, et al. Effects of HMGB1 on invitroresponses of isolated muscle fibers and functional aspects in skele

tal muscles of idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J* 2010; 24: 570-8.

- 44) Gabrielli F, Hancock R, Faber AJ. Characterisation of a chromatin fraction bearing pulse-labelled RNA. 2. Quantification of histones and high-mobility-group proteins. *Eur J Biochem* 1981; 120: 363-9.
- 45) Harris HE, Raucci A. Alarmin (g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep* 2006; 7(8): 774-8.
- 46) Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5.
- 47) Taguchi A, Blood DC, Del TG, Canet A, Lee DC, Qu W, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumor growth and metastases. *Nature* 2000; 405: 354-60.
- 48) Wang YC, Lin S, Yang QW. Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 134.
- 49) Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993; 143(6): 1699-712.
- 50) Kuniyasu H, Chihara Y, Kondo H. Differential effects between amphoterin and advanced glycation end products on colon cancer cells. *Int J Cancer* 2003; 104: 722-7.

Figure legends

Fig. 1

The schema showing the mouse tongue operation for SCC7 cells injecting.

*: Carcinoma

The SCC7 cells were injected at the 3mm from the apex on the left lateral aspect of the tongue (A).

SCC7 cells were injected into only the left half of the tongue (B).

Fig. 2

The schema showing the location of tissue samples of mouse tongue for H-E and immunohistochemical stainings.

A: Serial frontal section of tongue

a: Sections of anterior tongue

b: Sections of middle tongue

*: Carcinoma

B: Observation area in the section of middle tongue of SCC7 group.

ca: Carcinoma

p: Muscle fibers peripheral of the carcinoma

d: Muscle fibers distal to the carcinoma

Fig. 3

LMD extraction areas in tongue sections for RT-PCR.

A: Section of anterior tongue in SCC7 group.

B: Section of middle tongue in SCC7 group.

C: Section of anterior tongue in DMEM group.

D: Section of middle tongue in DMEM group.

E: Section of anterior tongue in non-stimulating group.

F: Section of middle tongue in non-stimulating group.

c: Central area (A, C, D, E, F)

i: Needle injection area (A, C)

ca: Carcinoma (B).

p: Muscle fibers peripheral of the carcinoma (B).

d: Muscle fibers distal to the carcinoma (B).

Fig. 4

H-E stained sections from SCC7 group. Scale bars: 50 μ m

A: Section of anterior tongue.

B: Section of middle tongue, showing the formed carcinoma (*).

C: Muscle fibers peripheral of the carcinoma in middle tongue.

D: Muscle fibers distal to the carcinoma in middle tongue.

The destructed muscle bundles were observed (A, B, C, D). Muscle fibers with reduced in size (arrows a) were observed. In addition some muscle fibers were disappeared nuclei (arrows b). Moreover, vacuolated muscle fibers (arrows c) and central nuclei (arrows d) were observed (A, C). Central nuclei were characteristic of the regeneration muscle. Additionally, an increased gap was observed between muscle fibers.

Fig. 5

H-E stained sections of tongue from DMEM group and non-stimulating groups. Scale bars: 50 μ m

A: Section of anterior tongue in DMEM group.

B: Section of middle tongue in DMEM group.

C: Section of anterior tongue in non-stimulating group.

D: Section of middle tongue in non-stimulating group.

Arrow a: muscle fibers had become reduced in size.

Section of anterior tongue was observed a few gaps (A), but other sections

were not able to be appeared.

Fig. 6

Section of anterior tongue in the SCC7 group immunohistochemically stained with anti-HMGB1 antibody and anti-RAGE antibody.

Scale bars: 50µm

A: Immunohistochemical staining with anti-HMGB1 antibody.

B: Immunohistochemical staining with anti-RAGE antibody.

An increased gap was observed between muscle fibers. Peripheral muscle of the carcinoma in contact with the gap (arrows a) were positive for anti-HMGB1 antibody (A) and anti-RAGE antibody (B). In contrast, the nuclei of the muscle fibers reacted positively with anti-HMGB1 antibody (arrows b) but not with anti-RAGE antibody (B).

Fig. 7

Sections of middle tongue in SCC7 group stained immunohistochemically with anti-HMGB1 antibody and anti-RAGE antibody. Scale bars: 50 µm

A: Anti-HMGB1 antibody stained section showing positive for the carcinoma and muscle fibers at the periphery of the carcinoma.

B: Anti-RAGE antibody-stained section showing positive for the carcinoma and muscle fibers at the periphery of the carcinoma.

C: Section stained with anti-HMGB1 antibody, showing positive for muscle fibers distal to the carcinoma.

D: Section stained with anti-RAGE antibody, showing positive for muscle fibers distal to the carcinoma.

The carcinoma (*) was immunoreactive with both anti-HMGB1 antibody (A) and anti-RAGE antibody (B).

An increased gap was observed between muscle fibers. Muscle fibers peripheral of the carcinoma in contact with the gap (arrows a) were positive for both anti-HMGB1 antibody (A, C) and anti-RAGE antibody (B, D). In addition, the nuclei of muscle fibers (arrows b) were observed immunoreactive with anti-HMGB1 antibody (A, C) but not with anti-RAGE antibody (arrows) staining (B, D).

Fig. 8

Tongue muscle section from the DMEM group stained with anti-HMGB1 antibody. Scale bars: 50 μ m

A: Section of anterior tongue was stained with anti-HMGB1 antibody.

B: Section of middle tongue was stained with anti-HMGB1 antibody.

An increased gap was observed between muscle fibers. Muscle fibers peripheral in contact with the gap (arrow a) were observed immunoreactive with anti-HMGB1 antibody (A).

The nuclei of muscle fibers (arrows b) were positive for anti-HMGB1 antibody (A, B).

Fig. 9

Immunohistochemical staining of tongue muscle with anti-HMGB1 antibody in the section of non-stimulating group. Scale bars: 50 μ m

A: Immunohistochemical staining with anti-HMGB1 antibody of the section of anterior tongue.

B: Immunohistochemical staining with anti-HMGB1 antibody of the section of middle tongue.

Nuclei of muscle fibers (arrows) were immunoreactive with anti-HMGB1 antibody (A, B).

Fig. 10

Expression level of HMGB1 mRNA in the tongue tissues.

Black bars: SCC7group. Gray bars: DMEM group. White bars: non-stimulating group.

*: Indicates a significant difference from the carcinoma (center of SCC7 group). Statistical analysis: $P < 0.01$ (n=5)

** : Indicates a significant difference from the muscle fibers peripheral of the carcinoma. Statistical analysis: $P < 0.01$ (n=5)

***: Indicates a significant difference from the muscle fibers distal from the carcinoma. Statistical analysis: $P < 0.01$ (n=5)

Expression of HMGB1 mRNA was observed in all groups. Above all, the highest HMGB1 expression was in the area of the carcinoma in the anterior tongue in the SCC7 group.

Fig. 11

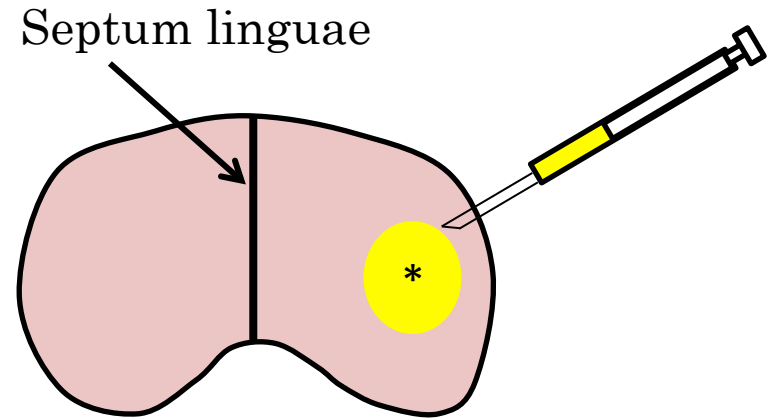
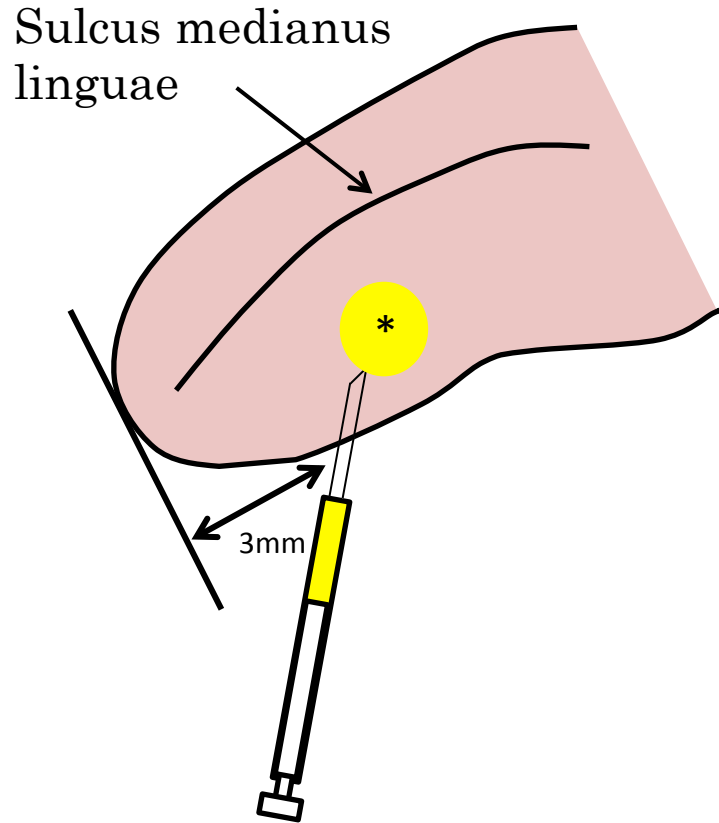
Expression level of RAGE mRNA in the SCC7 group (black bars).

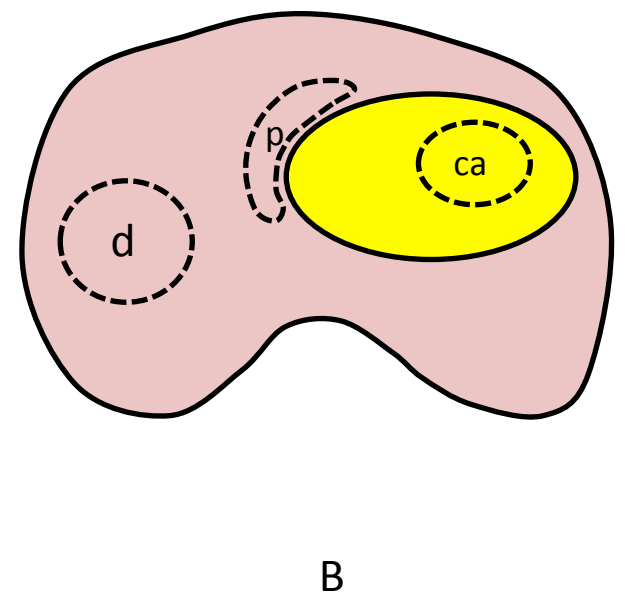
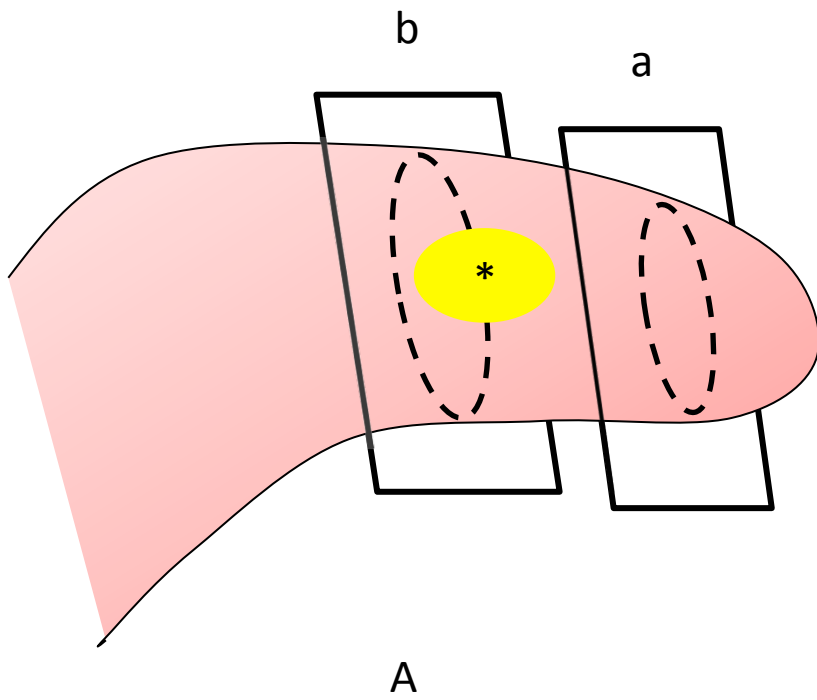
Statistical analysis: $P < 0.01$ (n=5)

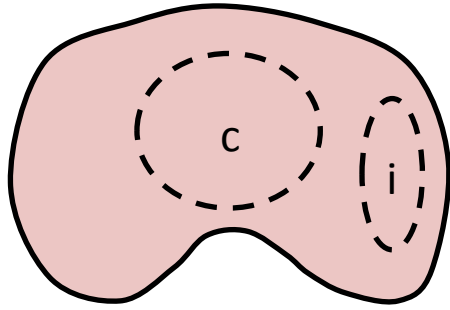
Expression of RAGE mRNA was observed in the carcinoma, muscle fibers

in the periphery the carcinoma, and muscle fibers distal to the carcinoma in the middle tongue, which the area of carcinoma or muscle fibers expressed much HMGB1 mRNA.

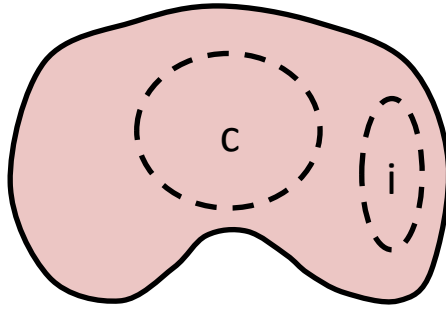
Primer	Forward	Reverse	Probe
GAPDH	5' TGTCCGTCGTGGATCTGAC 3'	5' CCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'	# 80
HMGB1	5' TTGGGTCACATGGATTATTAGTGT 3'	5' CAGGGCATGTGGACAAAAG 3'	# 11
RAGE	5' GAATCCTCCCCAATGGTTC 3'	5' GAAAGTCCCCTCATCGACAA 3'	



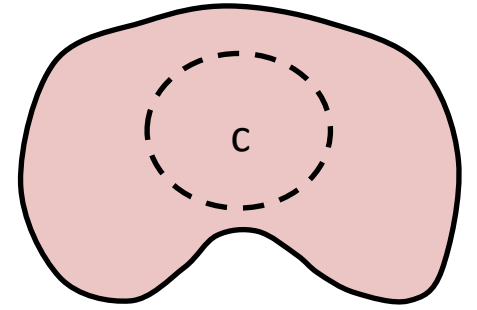




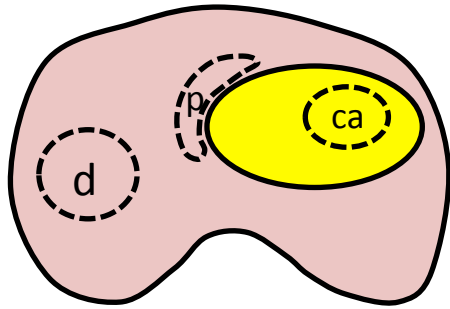
A



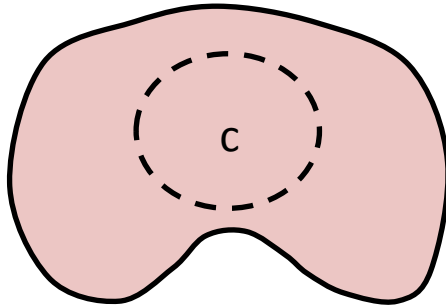
C



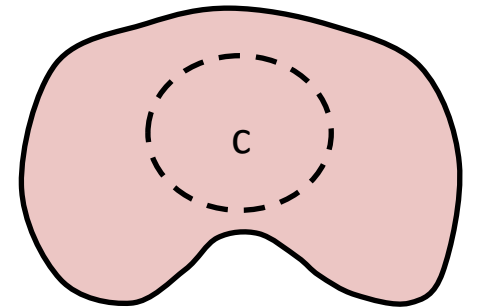
E



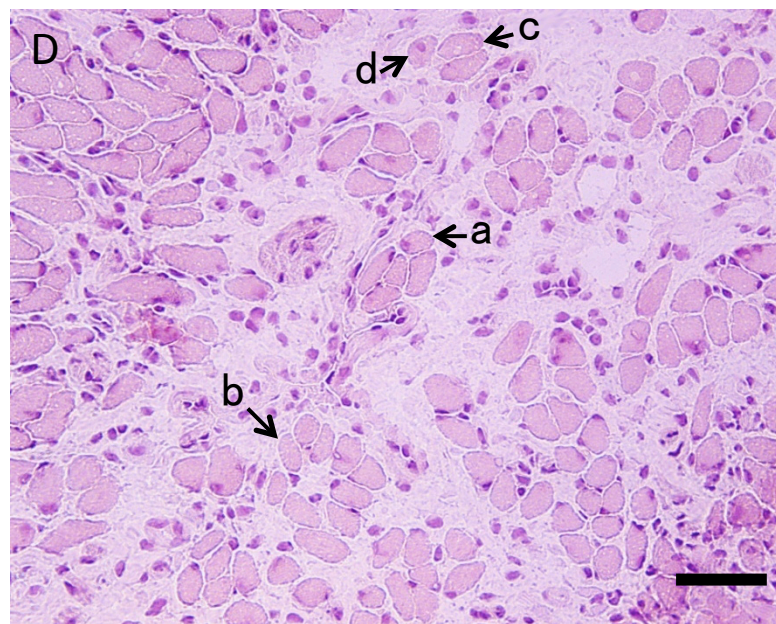
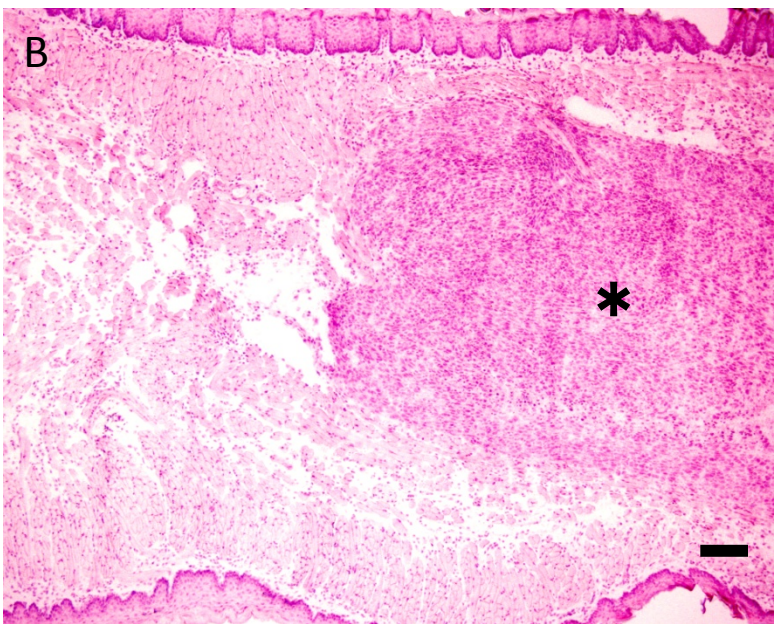
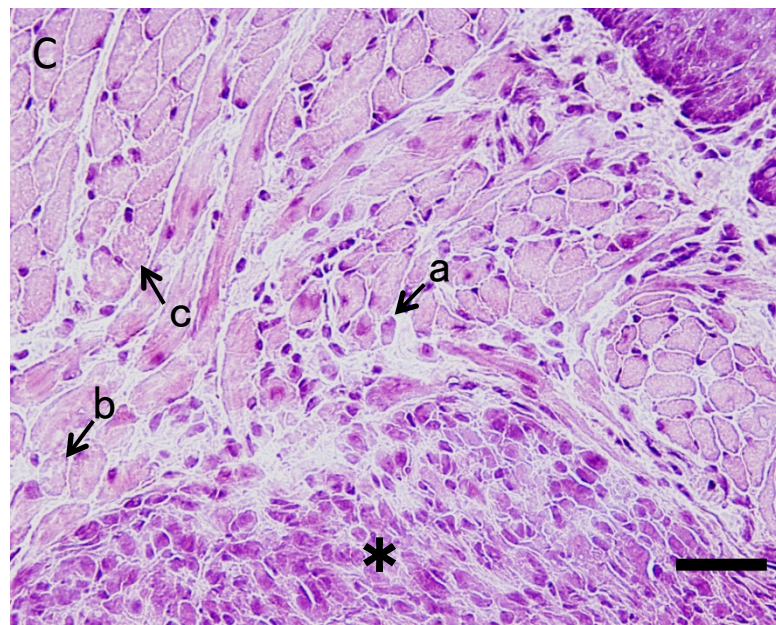
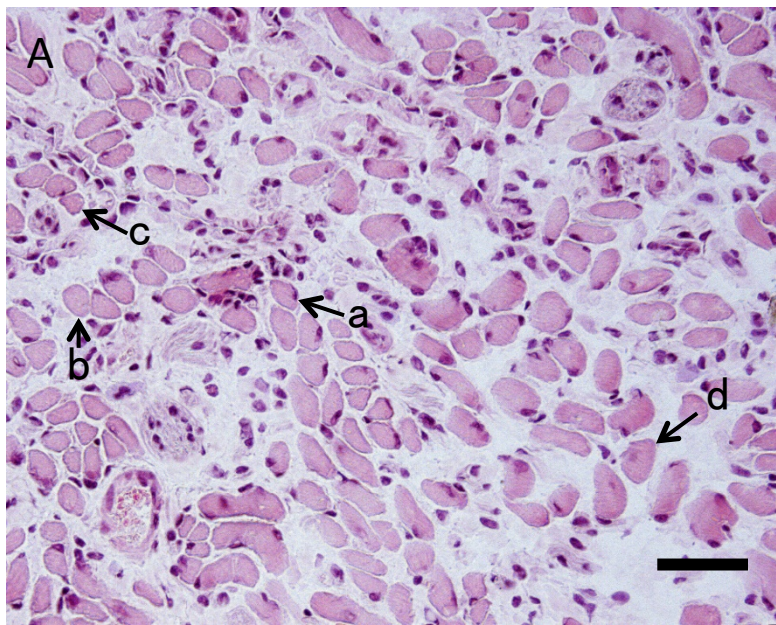
B



D

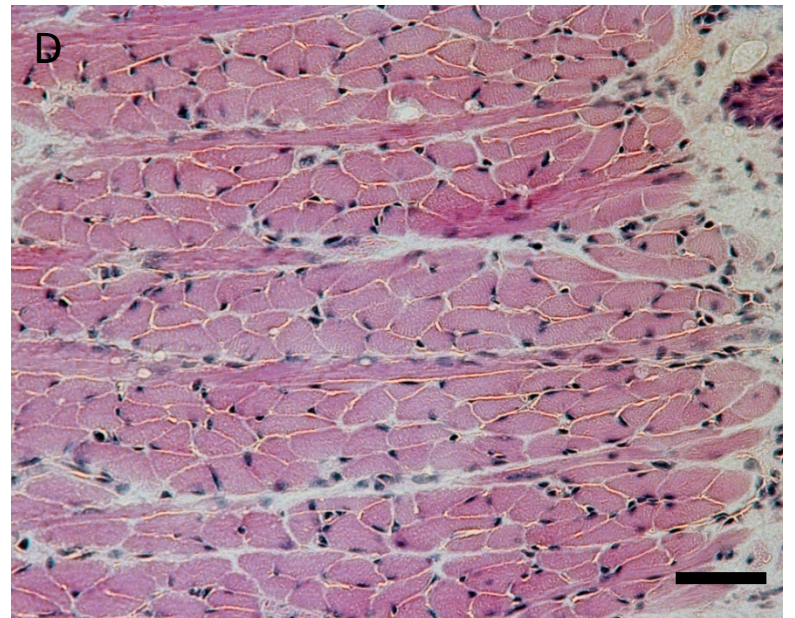
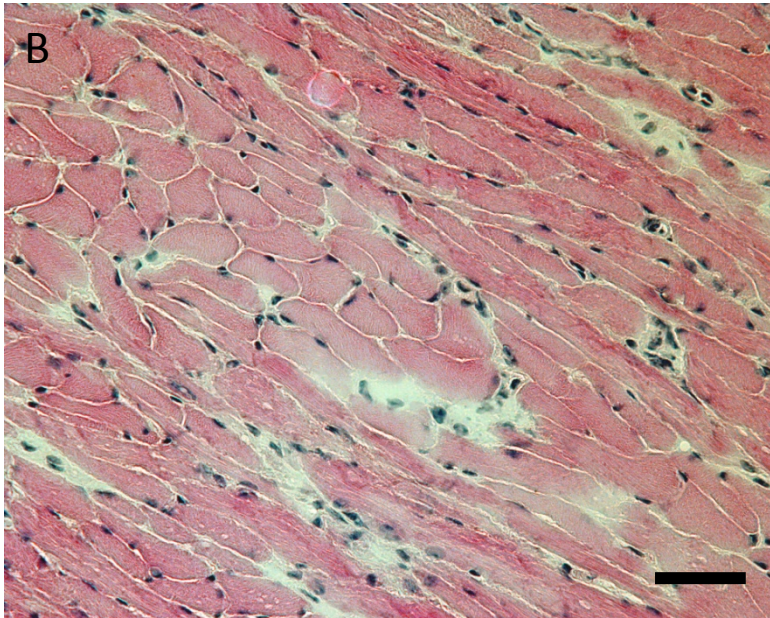
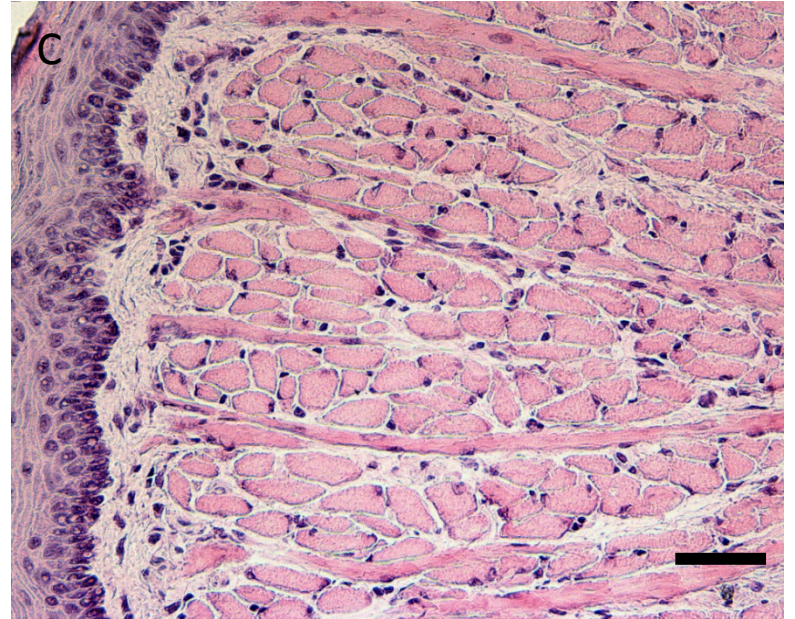
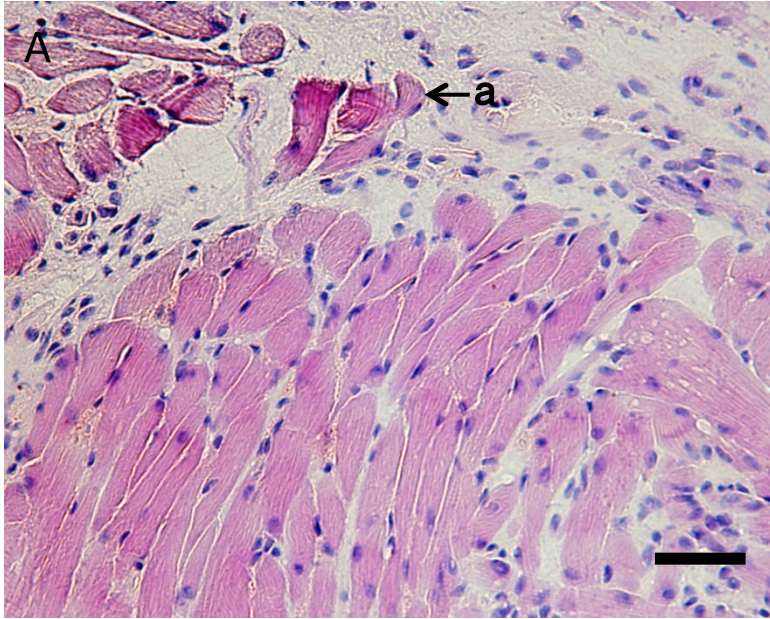


F



天

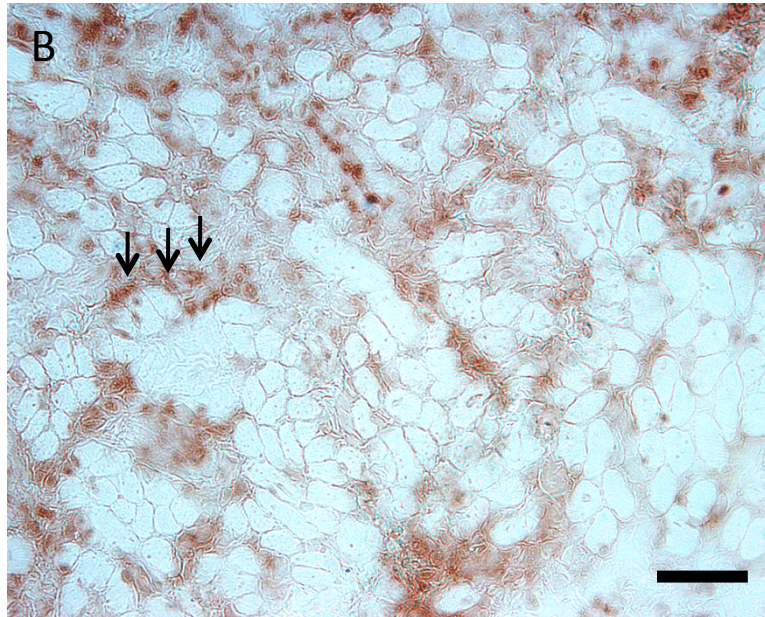
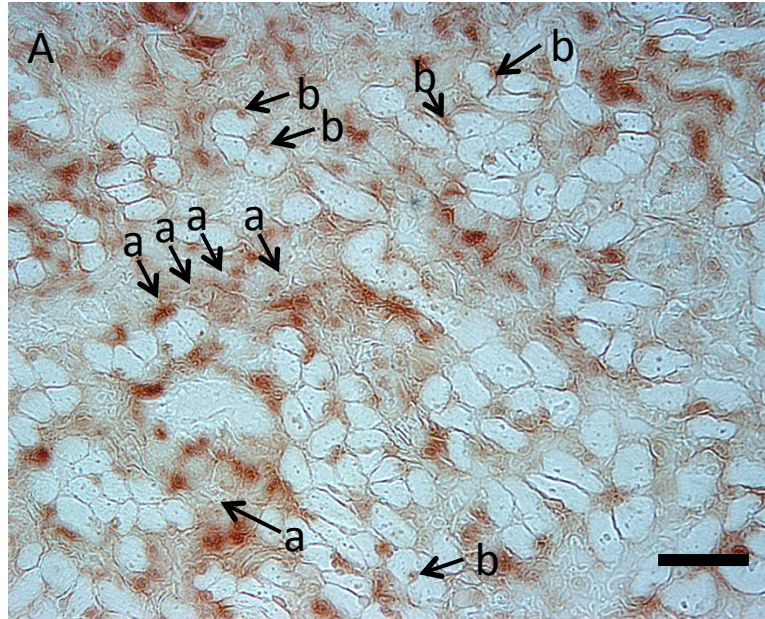
Fig 5 瀧澤将太



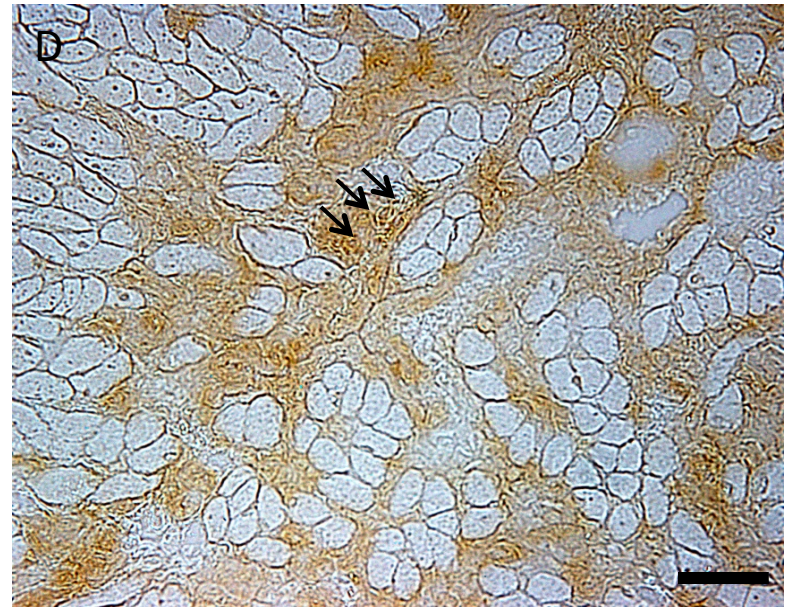
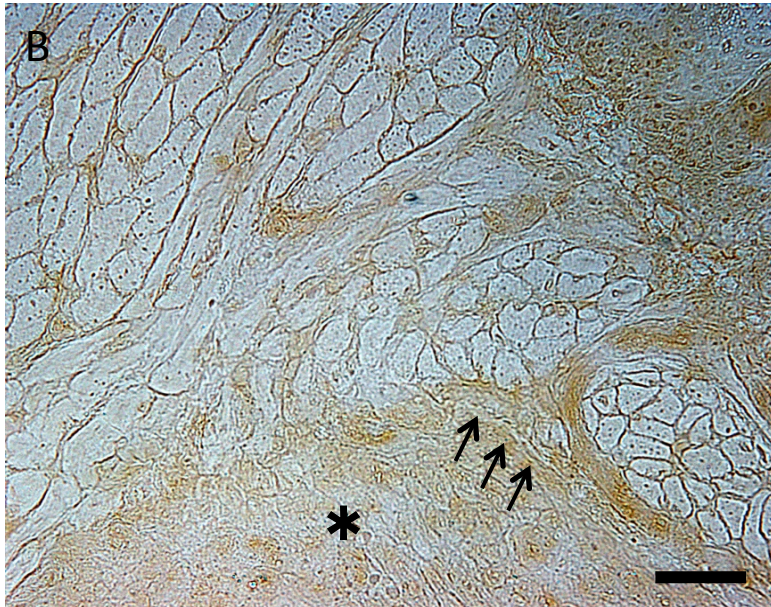
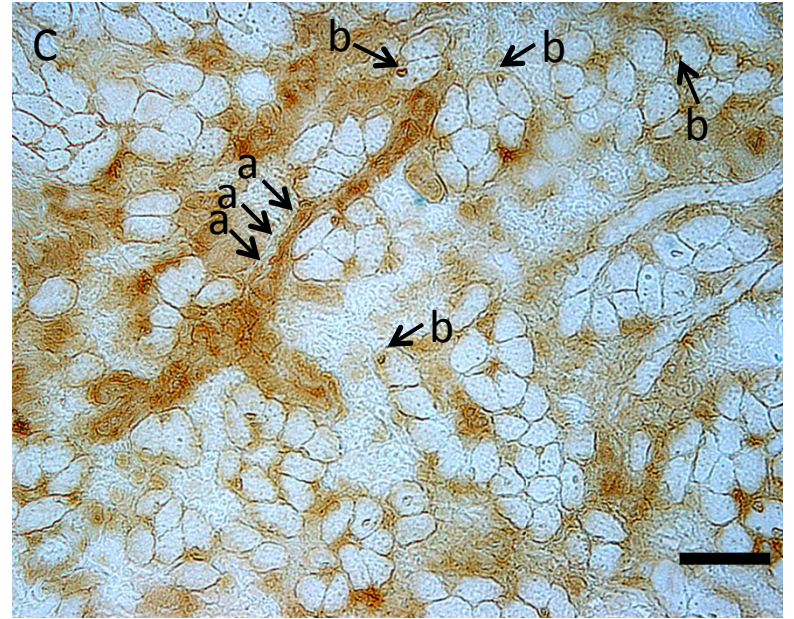
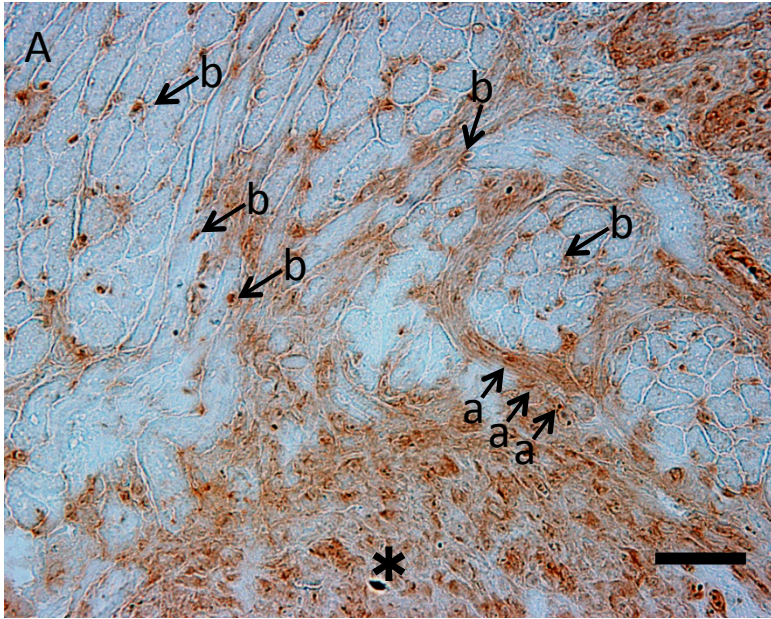
地

天

Fig 6 瀧澤将太

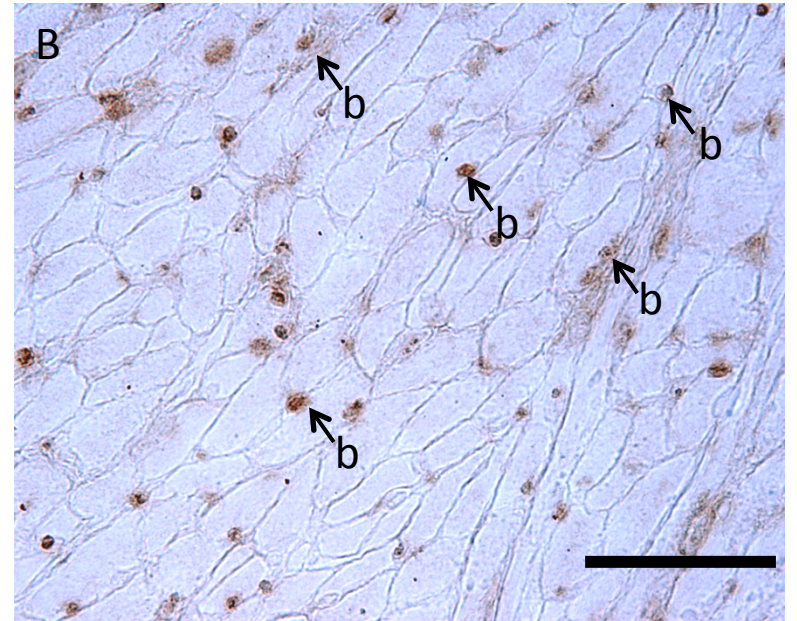
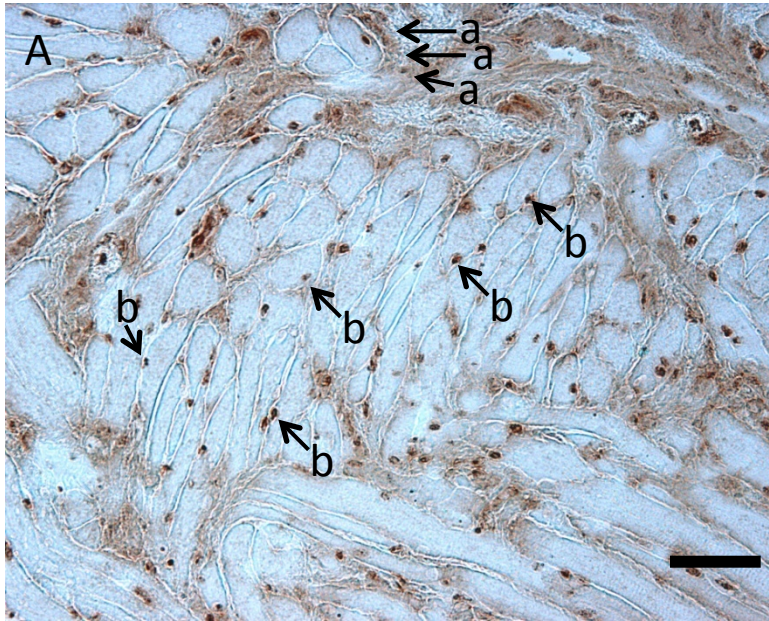


地



天

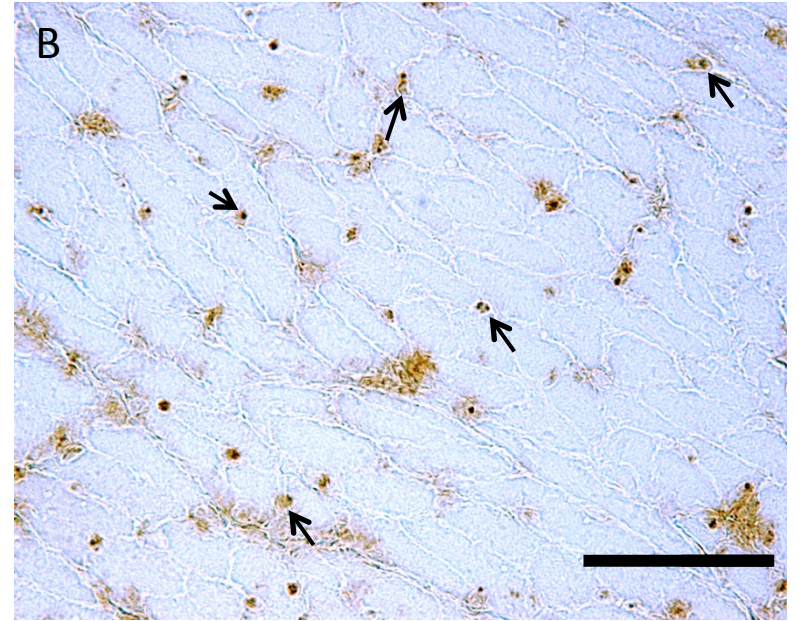
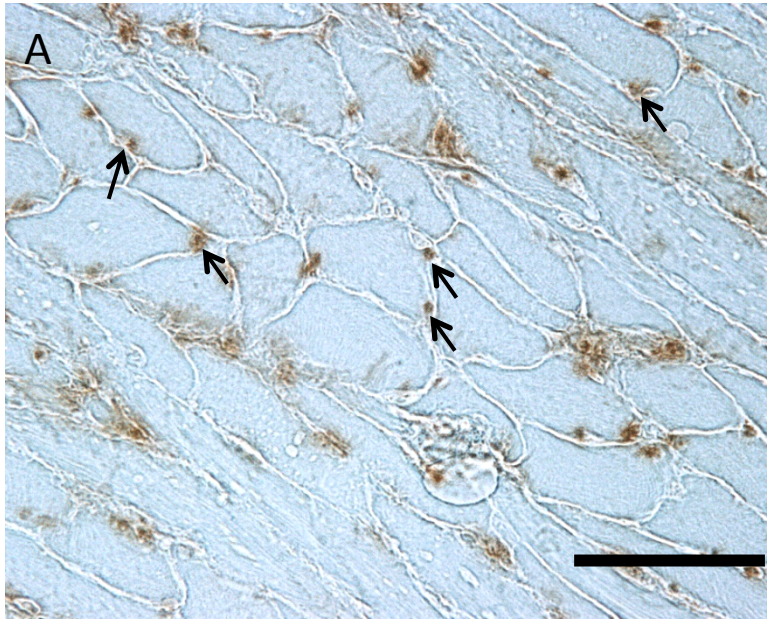
Fig 8 瀧澤将太



地

天

Fig 9 瀧澤将太



地

SCC7 group (Positive control)
 DMEM group(Negative control)
 non stimulating

