

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11250

研究課題名(和文) 口腔癌のEMT誘導調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of EMT-inducing mechanism in oral cancer

研究代表者

島末 洋(Hiroshi, Shimasue)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：40335683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の浸潤・転移といった進展や癌細胞の悪性化においてEMTが深く関与しており、その分化転換のマスターレギュレーターはSnailである。そのSnailの発現は、そのファミリー分子であるSlugの発現と相互しており、EMT強度の調節をしている。Slugは分化の重要な調節因子であり、基底細胞由来細胞株RT-7における発現とEMT様の細胞走化性の獲得が確認できた。癌細胞においては亜鉛依存性転写因子SnailとSlugの相互発現は、亜鉛トランスポーターであるLIV1とZIP2の発現が相関しており、これらがEMT誘導調節因子として機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：EMT definitely is involved in cancer invasion and metastasis, indeed cancer cells undergo malignant progress with EMT intensity. Snail controls the differentiation transition of oral cancer cells. Abundant expression of Slug, a family molecule of Snail, in basal cells of squamous epithelium controls generation of the epithelium structure, thus oral squamous basal cells-derived cell line RT-7 showed expression of Slug and acquired cell motility like EMT phenomenon. In oral cancer cell lines, reciprocal expressions of Snail and Slug were applied to the reciprocal expression of LIV1 and ZIP2, both Zn ion transporter molecules on the membrane, which controls EMT intensity and differentiation of cancer cell, resulting in oral cancer progression.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 EMT 浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

2000年に癌の悪性化とEMTに関する論文が報告されて以来、EMTに関する研究は現在の癌研究を席卷している。特に、古くは癌遺伝子、最近では癌幹細胞の提唱者であるRobert Weinberg博士らのグループは癌の進展におけるEMT関与について多数報告している。申請者らの研究グループは、2001年から(口腔)扁平上皮癌におけるEMT関与の研究報告を開始し、継続的に研究成果を挙げ、現在まで国内・国外においてリードしてきた。現在、癌細胞に生じるEMT研究は成熟し、癌の進展過程において癌細胞に「EMTを含めた分化転換」が生じる正当性は広く認識されている。そして、癌細胞の持つあらゆる分化転換の潜在能と分化転換過程の柔軟性が注目されている。正常細胞と癌細胞で「分化転換する目的」が異なるので、当然、正常細胞と癌細胞で「分化転換調節機構」も「分化転換後に獲得する能力」も異なってくる。今後は、正常組織を構成する正常細胞で生じる分化転換と、癌組織における癌細胞に生じるEMTの意義の相違を考慮しなければならない。つまり、癌細胞が組織化してEMTを制御しているのが焦点となってくる。癌幹細胞仮説では、少数の癌幹細胞が癌組織を支配し、その運命を握っていると考えられている。一方で、EMTを含む分化転換はどの癌細胞にも生じうるし、分化転換する癌細胞は癌の進展をリードすることが出来る。

申請者らの研究グループは、ウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いて癌細胞の可逆的なEMT誘導モデルを作成し、大きく

EMT誘導因子Snailの発現と活性化が口腔癌細胞にEMTを引き起こす、EMT型癌細胞は、Snailが発現誘導する液性因子を介して非EMT型癌細胞の集団的細胞遊走能を制御する結果を示した。そして、口腔癌細胞でも間質とのマージンの癌細胞にEMTが生じることを免疫組織化学染色で確認し、炎症細胞など癌周囲組織からの液性因子を介した外的要因で癌細胞にSnailの発現が誘導され、そして、Snailは別の液性因子を産生して非EMT型癌細胞に影響を与えることを明らかにし、その結果、EMT型癌細胞、非EMT型癌細胞および癌周囲環境の相互関係を体系化した口腔癌の局所浸潤モデルを提唱した。

2. 研究の目的

Znフィンガー型転写因子であるSnailは、IL-6/LIV1経路で核内移行すること、そしてTGFがSnailの活性に関与していることが報告されているが、Slugについては分かっていない。申請者らはIL-6刺激でLIV1とSnailの発現上昇と、SnailによるIL-6とTGFの産生が誘導され、Snail発現の正のフィードバック制御機構を見いだした。その結果、EMT誘導率が上昇した。

しかし、同じくZnフィンガー型転写因子

Slugを過剰発現させた癌細胞ではIL-6刺激によるLIV1の発現上昇を示すも、Slugの発現量とEMT誘導率に影響がなかった結果を得ており、Slugの上流にIL-6/LIV1は関与していないことが示唆される。そこで、口腔癌のSnail依存的なEMT誘導における新たな調節因子を抽出し、Slugと共にそれら発現機構について明らかにする。

3. 研究の方法

外陰部扁平上皮癌細胞株A431あるいは舌癌由来細胞株OM-1を親株とし、ウイルスベクターにてSnail、あるいはSlugを導入した娘細胞株を樹立した。各細胞株のE-カドヘリン、ビメンチンのタンパク発現を蛍光免疫細胞染色法で確認し、EMT強度を測定した。また、Snail、Slug、IL-6、LIV1、ZIP family genesのmRNA発現をsemi-quantitative RT-PCR法で確認した。SnailおよびSlugの機能解析の目的においてsiRNA法でノックダウンするため、それぞれshRNAをデザインした。他、OM-1_SnailにおけるZIP2の機能を検索するため、当細胞株にZIP2を強制発現させた細胞株も樹立し、分子生物学的解析をおこなった。亜鉛イオン検出用蛍光試薬ZnAF-2 DA(積水メディカル、東京)を用いて細胞内亜鉛イオン濃度をFITC蛍光強度としてフローサイトメトリーで測定した。

4. 研究成果

上皮形質を維持する外陰部扁平上皮癌細胞株A431と、舌癌細胞株OM-1を含む4つの口腔扁平上皮癌細胞株(HSC2、HSC3、およびHOC719-PE)におけるE-cadherin mRNAの高発現とVimentin mRNAの低発現をRT-PCR法で確認した。これら細胞株において、EMT誘導因子Snail、Slug、Zeb1、Zeb2、およびTWISTのmRNA発現を検討したところ、Slugのみが恒常的に発現していた(図1)

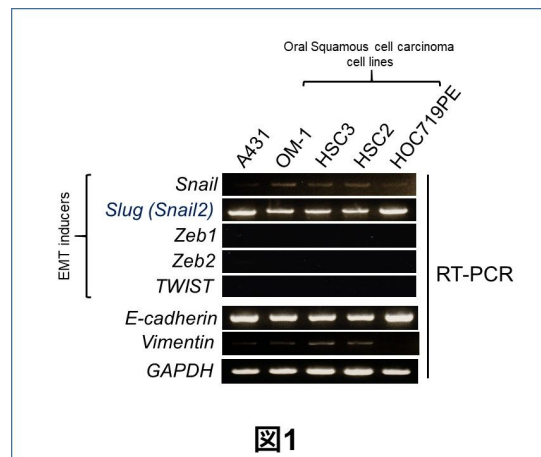


図1

光学顕微鏡下の細胞形態像において、外因性Slug導入によってA431およびOM-1の細胞形態に大きな変化はなかった。Snail強制発現癌細胞(A431_Snail、OM-1_Snail)は、E-cadherinの明らかな発現低下とVimentin

の発現亢進を示したが、Slug 過剰発現癌細胞 (A431_Slug、OM-1_Slug) では、それらは著明ではなかった (図 2)。興味深いことに、Snail 強制発現によって Slug の発現がほぼ消失し、逆に、Slug 過剰発現によって Snail の

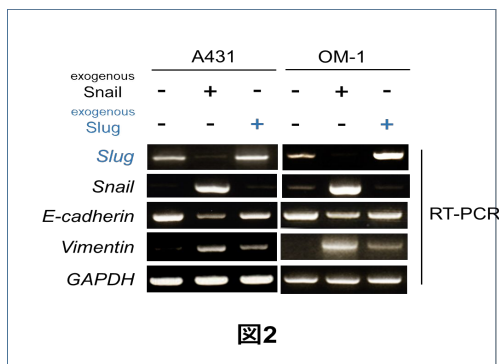


図2

発現がほぼ消失した (図 2)。

Snail と Slug 同時存在下で誘導される EMT について解析するため、Snail と Slug の両方を強制発現させた癌細胞を作製した。Snail/Slug 同時強制発現 OM-1 (OM-1_Snail_Slug) は、著明な E-cadherin の発現低下と Vimentin の発現亢進を示した (図 3)。光学顕微鏡観察下において、OM-1_Snail_Slug のほとんどの細胞が細胞間接着から解放され、線維芽細胞様を示した。また、90%以上の細胞に EMT が誘導された。また、OM-1_Snail_Slug のほとんどの細胞で、OM-1、OM-1_Snail、OM-1_Slug では観察されないクリアーな Snail と Slug の核内局在を示した。

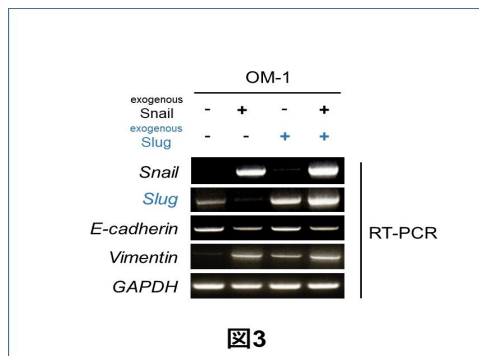


図3

Snail 誘導性 EMT において、IL-6 依存性の細胞膜 Zinc (Zn) トランスポーターである LIV1 (ZIP6) が、Zinc 依存的な Snail の活性化を制御し、そして TGF が Snail の発現を転写レベルから制御していることが報告されている (19)。そこで、OM-1_Snail および OM-1_Slug における IL-6 と LIV1 の mRNA 発現を RT-PCR 法で確認した。OM-1_Snail では、IL-6 の発現亢進とともに内在性 LIV1 の発現が亢進していたが、OM-1_Slug では、それらの発現亢進は認めなかった (図 4)。

RT-PCR 法で、OM-1_Slug における ZIP2 発現量の亢進を確認した (図 5)。

一方で、OM-1_Snail は ZIP2 の発現が消失

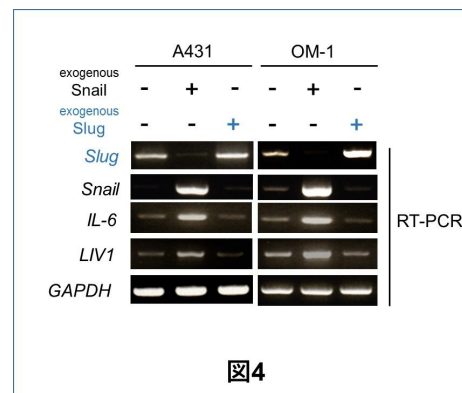


図4

していた (図 5)。ウエスタンブロッティング法で、OM-1 および OM-1_Slug における ZIP2 蛋白の発現と、OM-1_Snail における ZIP2 蛋白の消失を確認した (図 5)。また、OM-1 および OM-1_Snail における ZIP2 の細胞膜局在を確認した。

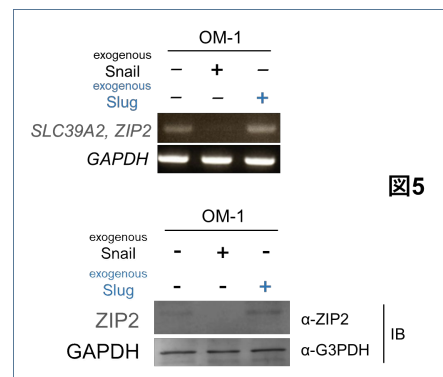


図5

ZIP2 の発現が OM-1_Snail で消失している結果から、ZIP2 が EMT にどのような影響を与えるのかを検討するため、OM-1_Snail に ZIP2 を強制発現させた細胞 (OM-1_Snail_ZIP2) を作製した。蛍光免疫細胞染色で、OM-1_Snail_ZIP2 における外因性 ZIP2 の細胞膜局在を確認した。また、OM-1_Snail_ZIP2 と OM-1_Snail は、同様な Snail と Slug の細胞内局在を示した。

OM-1_Snail_ZIP2 は、OM-1_Snail と比較して Slug の発現が誘導され、LIV1 の発現は維持されたまま、EMT 細胞率は約 30% から約 18% と有意に低下し、ZIP2 の強制発現によって Snail 誘導性の EMT は抑制された (図 6)。

また、TGF 刺激による OM-1_Snail の、Slug および LIV1 発現亢進を伴う EMT 感受性増強も ZIP2 強制発現によって抑制され、EMT 細胞率が約 58% から約 36% と有意に低下した (図 6)。

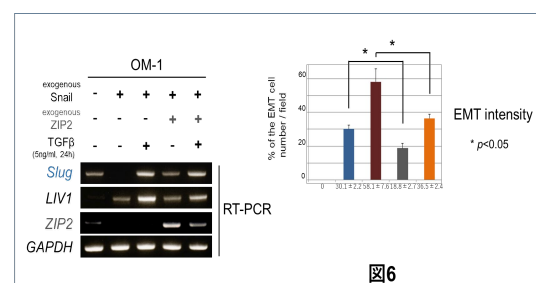


図6

最近になって、ZIP2 が上皮特異的 Zn イオントランスポーターであり、上皮分化マーカーとなりうることが報告された。上皮組織の Zinc 濃度は間質と比べて高濃度であり、さらに、上皮組織の Zinc 濃度の分布は、分化と ZIP2 発現に合致することが示された。そこで、膜透過性をもち、Zn イオンに特異的な親和性をもつ TPEN 類縁体に蛍光色素フルオロセインを結合させた ZnAF-2DA の蛍光強度を検知することで細胞内 Zn 濃度を測定した。OM-1、OM-1_Snail および OM-1_Snail_ZIP2 を、フローサイトメトリーで縦軸に細胞内 Zinc 濃度、横軸に上皮形質マーカーである上皮特異抗原 ESA をとって分画した(図7)。

OM-1_Snail のメジャーポピュレーションは、OM-1 のそれと比べて Zn 濃度の低い方へシフトし、さらに、ESA の発現の低い方へ延長した(図7)。一方で、OM-1_Snail に ZIP2 を強制発現させると、Zn 濃度が低い方にシフトしたメジャーポピュレーションは OM-1 の細胞内 Zn 濃度と同等に回復し、そして、OM-1 のメジャーポピュレーションと相似する ESA 発現の高いサブポピュレーションが出現した(図7)。これらの結果から、癌細胞が Snail によって上皮形質から間葉形質に移行し、細胞内 Zinc 濃度が低下したが、ZIP2 はそれを回復させ、癌細胞を上皮形質へと方向転換したことが推察された。

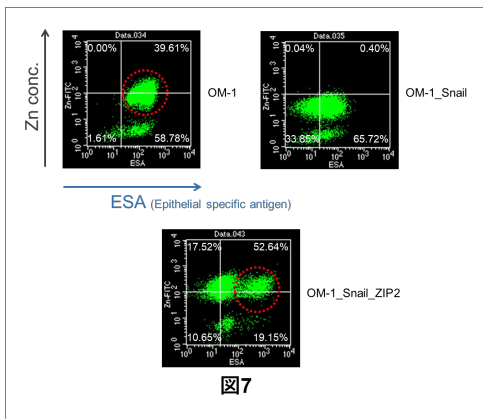


図7

癌の悪性化過程において、上皮形質を維持する癌細胞に EMT が生じ、これら EMT 型癌細胞が間質に浸潤して血管内に侵入すると考えられており、次に、これら EMT 型癌細胞が血管外で二次腫瘍形成する時は MET (間葉上皮移行)が生じ、再び上皮形質に移行する。すなわち、癌組織の悪性化機構における癌細胞の可逆的な分化転換が重要であると考えられている。そこで、上皮形質を維持する口腔扁平上皮癌細胞株にウイルスベクターシステムで Snail を強制発現させた細胞を作製したところ、それら癌細胞は多段階な EMT 表現型を示し、そして、細胞遊走スペースの確保や液性因子刺激などでそれら癌細胞の EMT 強度を制御することができた。

さらに、この可逆性 EMT 誘導の解析を進め、上皮形質を維持する口腔扁平上皮癌細胞株

における液性因子 TGF、TNF、および PDGF 刺激による内因性 Snail の発現亢進を伴う EMT 誘導に成功した。このサイトカイン依存的 EMT 誘導には Snail だけでなく、Snail ファミリー分子である Slug も必要であることを示した。上皮形質を維持する口腔扁平上皮癌細胞株における EMT 誘導因子群の発現を確認したところ、予想外に Slug は恒常的に発現していた。

扁平上皮癌細胞株 A431 と OM-1 は、Snail 強制発現によって一定の率で EMT が誘導される。しかし、恒常的に発現していた Slug の発現はほぼ消失してしまう。一方で、A431 と OM-1 に恒常的に発現している Slug を、さらに過剰発現させてもほとんど EMT は誘導されなかった。これら Slug 過剰発現癌細胞の Snail の発現はほとんど消失し、口腔扁平上皮癌細胞の EMT 誘導において Snail の依存性が示唆される。しかしながら、OM-1 に Snail と Slug の両方を強制発現させた OM-1 は、ほとんどの細胞で EMT が生じ、EMT プログラムの完了には Snail と Slug の共発現が効率的であることが推察される。

近年、Snail 誘導性 EMT において IL-6 依存性の細胞膜 Zn イオントランスポーター LIV1 (ZIP6) が Zinc 依存的 Snail 活性化を制御していることが明らかとなった。これに合致して、Snail 強制発現癌細胞では IL-6 の発現亢進とともに内在性 LIV1 の発現が誘導されていた。これに対し、Slug 過剰発現癌細胞では LIV1 の発現は認められなかった。これらの結果から、Zinc 依存的 EMT 誘導因子の活性化を制御する Zn イオントランスポーターの違いが、Snail と Slug による EMT 誘導の違いを生んでいる可能性が考えられ、Slug 過剰発現 OM-1 において発現が亢進されている細胞膜 Zn トランスポーター ZIP2 に着目した。ZIP2 は OM-1 にも発現していたが、Snail 強制発現 OM-1 では発現が消失していた。その消失した ZIP2 を強制発現によって Snail 強制発現 OM-1 で再発現させると、EMT 細胞率が低下し、EMT が抑制された。ごく最近になって、ZIP2 が上皮特異的 Zn イオントランスポーターであり、上皮分化マーカーとなりうることが報告された。そこで、フローサイトメトリーで OM-1、Snail 強制発現 OM-1 および Snail/ZIP2 強制発現 OM-1 における細胞内 Zn 濃度と上皮特異的抗原 ESA の発現を解析したところ、EMT 形質を持つ Snail 強制発現 OM-1 は Zn 濃度と ESA 発現が低いポピュレーションが大多数であった。一方で、Snail/ZIP2 強制発現 OM-1 では、OM-1 と同様の Zn 濃度と ESA 発現が高いサブポピュレーションが出現した。逆に、OM-1 および Slug 過剰発現 OM-1 の内在性 ZIP2 をノックダウンすると Snail と LIV1 発現亢進を伴う EMT が誘導された。また、Snail と Slug を同時に強制発現させた OM-1 は、LIV1 を発現して ZIP2 の発現は消失しており、EMT 誘導効率率は Snail 単独発現のそれよりも高かった。そして、OM-1 の内在性 Slug ノックダ

ウンにより、OM-1 の内在性 ZIP2 発現は抑制された。これら結果は、口腔扁平上皮癌細胞株 OM-1 は、EMT 誘導因子 Slug と共に ZIP2 を恒常的に発現しているため EMT を回避して上皮形質を保持していると推察された。癌細胞が保有する Zn イオントランスポーターについて、上皮形質としての Zn イオントランスポーター-ZIP2 の発現は EMT 誘導因子 Slug 発現下では保たれるが、新規に獲得した Snail の発現が Zn イオントランスポーターを間葉形質として LIV1 ヘススイッチさせることにより、Snail 存在下では EMT 誘導因子としての Slug の機能も開放されることが示唆された。Snail ファミリーによる EMT を上皮特異的な Zn イオントランスポーター-ZIP2 が阻害していることが、本研究で初めて明らかとなった。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

1. CD44^{high}/ALDH1^{high} head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3beta-dependent cancer stem cell properties.: Seino S, Shigeishi H, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Okui G, Yamamoto K, Uetsuki R, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Nimiya A, Ono S, Ohta K, Sugiyama M, Takechi M. J Oral Pathol Med. 45(3):180-188, 2016.

[学会発表](計 5 件)

1. Semi-stable EMT 型口腔癌細胞における上皮幹細胞特性の解析: 植月 亮, 東川晃一郎, 重石英生, 石田扶美, 小野重弘, 島末 洋, 武知正晃.: 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会(2017.10.21 京都)

2. 口腔扁平上皮癌細胞における幹性と EMT との関連性についての in vitro 解析: 植月 亮, 東川晃一郎, 重石英生, 石田扶美, 小野重弘, 島末 洋, 武知正晃.: 第 61 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会(2016.11.25 幕張)

3. Snail-induced EMT ignores epithelial stem cell-like properties of oral squamous cell carcinoma cells: Uetsuki R, Higashikawa K, Shigeishi H, Ishida F, Ono S, Shimasue H, Ohta K, Takechi M.: 第 49 回広島大学歯学会総会(2016.7.2 広島)

4. 口腔癌細胞の EMT 誘導機構における亜鉛トランスポーター-スイッチ: 植月 亮, 東川晃一郎, 奥井 岳, 石田扶美, 山本一博, 重石英生, 小野重弘, 武知正晃.: 第 60 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会(2015.10.16 名古屋)

5. CD44^{high}/ALDH1^{high} 口腔扁平上皮癌細胞における癌幹細胞形質の解析: 清野紗矢香, 重石英生, 奥井 岳, 箆方美帆, 植月 亮, 山本一博, 小野重弘, 東川晃一郎, 太田耕司, 島末 洋, 武知正晃.: 日本組織培養学会 第 88 回大会(2015.5.27 広島)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島末 洋 (SHIMASUE HIROSHI)
広島大学・病院・助教
研究者番号: 40335683

(2) 研究分担者

飛梅 圭 (TOBIUME KEI)
広島大学大学院・医歯薬保健学研究科・准教授
研究者番号: 40350037

東川 晃一郎 (HIGASHIKAWA KOICHIRO)
広島大学・病院・講師
研究者番号: 80363084

重石英生 (SHIGEISHI HIDEO)
広島大学・医歯薬保健学研究科・講師
研究者番号: 90397943