

平成 22 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2009
課題番号：18390541
研究課題名（和文） 上皮・間葉移行の解明による口腔癌の浸潤転移の制御
研究課題名（英文） Control of invasion and metastasis of oral cancer via clarification of the epithelial-mesenchymal transition
研究代表者 鎌田 伸之（KAMATA NOBUYUKI） 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授 研究者番号：70242211

研究成果の概要（和文）：上皮・間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)は、上皮細胞がその極性を失い、遊走能を持った間葉系細胞に変化する現象である。本研究においては、口腔癌のEMTを介した高度浸潤能の獲得機構を解明することを目的として、EMTに伴って制御される遺伝子群をマイクロアレイを用いて同定し、個々の産物の機能と発現機構を検討した。そのひとつの結果として、p63を同定し扁平上皮癌細胞の浸潤能における重要な機能を見出した。

研究成果の概要（英文）：Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is a phenomenon that epithelial cells lose their polarity and change into mesenchymal cells possessing active migration. In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism of acquisition of highly invasive phenotype through EMT in oral cancer. We identified the genes being regulated accompanied with EMT using micro-array analysis and analyzed the functions of these gene products and the regulatory mechanisms of gene expression. We found that p63 was one of the target gene of EMT and had the important function in invasion of squamous cell carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、浸潤転移、上皮間葉移行、発現遺伝子、転写因子、Snail、p63

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌原発巣の浸潤様式分類である山本・小浜分類の中で最も高度な浸潤を示すYK4D型癌は、個々の細胞が互いに接着せず慢性浸潤を示し予後も最も悪い。研究代表者らはこれまでに20種以上の口腔

扁平上皮癌細胞を樹立し検討を行い、これら高度浸潤型癌細胞におけるE-カドヘリンの発現消失、ビメンチンやSnailの発現上昇などを見出し、高度浸潤型扁平上皮癌がEMTを獲得した癌であることを示してきた。また、EMTに伴ってMMP-2やWnt-5aなどの遺伝子が

新たに転写誘導されることを見出している。発癌過程の後期の変化であるEMTのスイッチの機構とともに、これに伴って誘導される浸潤・転移関連遺伝子群の発現上昇機構の解明とその制御はほとんど解明されておらず重要な課題である。

2. 研究の目的

EMTに伴って制御される個々の遺伝子産物の機能と発現機構を検討し、口腔癌の高度悪化の機構を解明することを目的とした。また、上皮・間葉系細胞の正常対照として不死化口腔粘膜上皮細胞と不死化歯肉線維芽細胞の性状を比較検討した。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌組織を用い、CENP-H, Epiregulin, hyalunoan-mediator motility 受容体についてRNAおよび蛋白質発現を検討し、原発巣の浸潤、進展度、転移および予後との相関について検討した。

(2) ①扁平上皮癌細胞、高度浸潤型扁平上皮癌細胞、Snailの過剰発現によりEMTを誘導させた細胞を用いて、3次元培養による浸潤様式の検討、ケモカインとその受容体の発現をRT-PCR, Western blottingにより検討した。②正常不死化口腔粘膜上皮細胞、歯肉線維芽細胞におけるケモカイン発現とその誘導について比較検討した。

(3) ①扁平上皮癌細胞、高度浸潤型扁平上皮癌細胞、Snailの過剰発現によりEMTを誘導させた細胞を用いて網羅的発現遺伝子解析を行いEMTに伴って発現が制御される遺伝子群を同定しRT-PCR, Western blottingにより確認を行った。②EMTにより発現が制御される遺伝子のプロモーター領域DNAをルシフェラーゼの上流に組み込み発現制御機構の検討を行った。③扁平上皮癌細胞で最も優位に発現するp63のアイソフォームを同定し、EMTによる発現の影響を検討した。遺伝子導入による過剰発現細胞、siRNAによるノックダウン細胞を樹立し浸潤能を検討した。④p63により発現が誘導される遺伝子を同定し浸潤能におよぼす影響をさらに検討した。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌における①CENP-H遺伝子の発現上昇と増殖能の相関(Oncology Report, 2006)、②Epiregulinの発現と口腔癌の増殖能および予後との相関(Oncology Report, 2008)、③hyalunoan-mediator motility受容体の過剰発現とマイクロチューブ結合蛋白との相関を報告した(Int J Oncology, 2009)。(2) ①癌のリンパ節転移に重要な役割を持つケモカインSDF-1とその受容体CXCR4の発現

が扁平上皮癌のEMTに伴って誘導されることを報告した(Oncol Rep. 2008, Am J Pathol. 2009)。②口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞において、IFN- γ とTNF- α によって誘導されるケモカインと誘導の機構が異なることを見出した(J Dental Research, 2008)。

(3) ①EMTによるMMP-2の誘導は新たに誘導される転写因子Ets-1を介することを報告した(Int J Oncology, 2006)。②マイクロアレイ解析により、扁平上皮癌細胞においてEMTによる高度浸潤能獲得に伴って発現が変化する遺伝子群を同定し、VEGF-Cやp63をEMTに伴って制御される新たな遺伝子として見いだした(Cancer Lett. 2008)。③p63は、扁平上皮癌細胞では δ Np63 α のアイソフォームとして優位に発現し、EMT細胞では発現消失しており、上皮様形質を示す扁平上皮癌細胞でp63の発現をノックダウンさせると著明に浸潤能が亢進し、EMT型の高度浸潤型扁平上皮癌細胞に過剰発現させるとその強い浸潤能が抑制された(Cancer Res. 2007)。④このp63依存性の高度浸潤能に関与する新たなターゲット遺伝子としてId-3を同定し、そのMMP-2転写活性に対する調節機能を報告した(Int J Cancer. 2009)。

以上より、サイトカインやケモカインなどのシグナル伝達経路が上皮細胞と間葉系細胞では異なることが示された。また、癌の高度浸潤・転移能に関与することが報告されている接着因子や転写因子、基質分解酵素などの種々の遺伝子の発現が、EMTによって制御されることが明らかになった。さらに、新たにp63を含む多くの遺伝子がEMTによって制御を受ける遺伝子として同定された。特に、p53が発癌に関与することはよく知られているが、p63が癌の浸潤に関与することが初めて明らかになった。

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18件)

1) Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K. Nodal lymphangiogenesis and metastasis: Role of tumor-induced lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease. American Journal of Pathology 175(5):2235-2248. 2009(査読有)

2) Shigeishi H, Yamaguchi S, Mizuta K, Nakakuki K, Fujimoto S, Amagasa T, Kamata N.

Amphiregulin induces proliferative activities in osseous dysplasia. *J Dent Res.* 88(6):563-568, 2009. (査読有)

3) Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, Higashikawa K, Kamata N. Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 34(6):1565-1571, 2009. (査読有)

4) Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, Shigeishi H, Ono S, Kamata N. DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 124(12):2837-2844, 2009. (査読有)

5) Tatsuka M, Sato S, Kanda A, Miki T, Kamata N, Kitajima S, Kudo Y, Takata T. Oncogenic role of nuclear accumulated Aurora-A. *Mol Carcinog.* 48(9):810-820, 2009. (査読有)

6) Shigeishi H, Ohta K, Hiraoka M, Fujimoto S, Minami M, Higashikawa K, Kamata N. Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep.* 21(2):341-344, 2009. (査読有)

7) Ohta K, Shigeishi H, Taki M, Nishi H, Higashikawa K, Takechi M, Kamata N. Regulation of CXCL9/10/11 in oral keratinocytes and fibroblasts. *J Dent Res.* 87(12):1160-1165, 2008. (査読有)

8) Shigeishi H, Higashikawa K, Hiraoka M, Fujimoto S, Mitani Y, Ohta K, Takechi M, Kamata N. Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep.* 19(6):1557-1564, 2008. (査読有)

9) Taki M, Higashikawa K, Yoneda S, Ono S, Shigeishi H, Nagayama M, Kamata N. Up-regulation of stromal cell-derived factor-1alpha and its receptor CXCR4 expression accompanied with epithelial-mesenchymal transition in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 19(4):993-998, 2008. (査読有)

10) Higashikawa K, Yoneda S, Taki M, Shigeishi H, Ono S, Tobiume K, Kamata N. Gene expression profiling to identify genes associated with high-invasiveness in human squamous cell carcinoma with epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 264(2):256-264, 2008. (査読有)

11) 鎌田伸之, 東川晃一郎 EMTを介した癌の高度浸潤能獲得の分子機構 *細胞工学* 27(4), 359-362 (2008. 3. 22) 秀潤社(査読無)

12) Nakajima Y, Yamada S, Kamata N, Ikeda MA. Interaction of E2F-Rb family members with

corepressors binding to the adjacent E2F site. *Biochem Biophys Res Commun.* 364(4):1050-1055, 2007. (査読有)

13) Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Taki M, Shigeishi H, Kamata N. Snail-induced down-regulation of DeltaNp63alpha acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 67(19):9207-9213, 2007. (査読有)

14) Suzuki E, Imoto I, Pimkhaokham A, Nakagawa T, Kamata N, et al. PRTFDC1, a possible tumor-suppressor gene, is frequently silenced in oral squamous-cell carcinomas by aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene.* 26(57):7921-7932, 2007. (査読有)

15) Mitani Y, Oue N, Matsumura S, Yoshida K, Noguchi T, Ito M, Tanaka S, Kuniyasu H, Kamata N, Yasui W. Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncogene.* 26(30):4383-4393, 2007. (査読有)

16) Shigeishi H, Higashikawa K, Ono S, Mizuta K, Ninomiya Y, Yoneda S, Taki M, Kamata N. Increased expression of CENP-H gene in human oral squamous cell carcinomas harboring high-proliferative activity. *Oncol Rep.* 16(5):1071-1075, 2006. (査読有)

17) Shigeishi H, Yoneda S, Taki M, Nobumori T, Ohta K, Higashikawa K, Yasui W, Kamata N. Correlation of human Bub1 expression with tumor-proliferating activity in salivary gland tumors. *Oncol Rep.* 15(4):933-938, 2006(査読有)

18) Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, Nagayama M, Kamata N. Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int J Oncol.* 28(2):487-496, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 33 件)

- 1) 東川晃一郎, 田中扶美, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之 EMT型口腔扁平上皮癌細胞における gamma-secretase inhibitor 抵抗性の解析 第54回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2009. 10. 9 札幌
- 2) 田中扶美, 東川晃一郎, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌細胞における高度浸潤能獲得機構の解析 第54回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2009. 10. 9札幌
- 3) 福井暁子, 太田耕司, 西裕美, 武知正晃, 鎌田伸之 口腔粘膜上皮細胞、歯肉線維芽細胞における Toll-like Receptorの発現と機

能 第54回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2009. 10. 9 札幌

4) 鎌田伸之, 東川晃一郎, 飛梅 圭 Snailによる転写調節とEMTの誘導 第68回日本癌学会学術総会・シンポジウム2009. 10. 3横浜

5) 東川晃一郎, 飛梅 圭, 田中扶美, 鎌田伸之 扁平上皮癌細胞においてSnailが発現抑制するdeltaNp63 α の機能解析 第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 3 横浜

6) 田中扶美, 東川晃一郎, 飛梅 圭, 小野重弘, 重石英生, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌細胞における高度浸潤能獲得へのSnail標的分泌型タンパクの関与 第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 3 横浜

7) 平川聡史, 松尾恵太郎, 東川晃一郎, 鎌田伸之 皮膚悪性腫瘍のリンパ行性転移機構：がん組織におけるリンパ管新生の役割 第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 2 横浜

8) 西裕美, 太田耕司, 福井暁子, 武知正晃, 鎌田伸之 口腔粘膜上皮・歯肉線維芽細胞における炎症性サイトカインによる JAK/STATシグナル伝達経路の解析 第19回日本口腔粘膜学会・総会 2009. 6. 6 神奈川

9) 太田耕司, 西裕美, 福井暁子, 重石英生, 武知正晃, 鎌田伸之 Candida albicansによる歯肉線維芽細胞のFractalkine(CX3CL1)発現誘導と機能 第19回日本口腔粘膜学会・総会 2009. 6. 6 神奈川

10) 福井暁子, 太田耕司, 西裕美, 武知正晃, 鎌田伸之 口腔粘膜上皮細胞, 歯肉線維芽細胞におけるToll-like Receptorの発現と機能 第19回日本口腔粘膜学会2009. 6. 6 神奈川

11) 西 裕美, 太田耕司, 福井暁子, 武知正晃, 鎌田伸之 歯肉線維芽細胞における炎症性サイトカインによるJAK/STAT シグナル伝達経路の解析 第63回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2009. 4. 17 浜松

12) 太田耕司, 西 裕美, 福井暁子, 瀧 雅行, 重石英生, 武知正晃, 鎌田伸之 Candida albicans感染による口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞におけるFractalkine(CX3CL1)の発現の検討 第63回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2009. 4. 17 浜松

13) 東川晃一郎, 米田進吾, 飛梅圭, 瀧雅行, 三谷佳嗣, 小野重弘, 重石英生, 鎌田伸之 EMT型口腔扁平上皮癌細胞の浸潤抑制因子Id3の解析 第67回日本癌学会学術総会2008. 10. 30 名古屋

14) 小野重弘, 三谷佳嗣, 東川晃一郎, 重石英生, 米田進吾, 瀧雅行, 北台靖彦, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌におけるEMT関連遺伝子VEGF-Cの役割と発現機構 第67回日本癌学会学術総会 2008. 10. 30 名古屋

15) 瀧雅行, 東川晃一郎, 米田進吾, 三谷佳嗣, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之 扁平上皮癌細胞における上皮・間葉移行を介したWnt-5aによる高度浸潤能獲得機構 第67回日本癌学会学術総会2008. 10. 30 名古屋

16) 三谷佳嗣, 瀧雅行, 小野重弘, 東川晃一郎, 菊池章, 鎌田伸之 h-pruneの高発現は扁平上皮癌のアノイキスや細胞運動に関与する 第67回日本癌学会学術総会2008. 10. 30名古屋

17) 達家雅明, 神田暁史, 鎌田伸之, 北島正二郎, 工藤保誠, 高田隆, 嶋本文雄, 太田隆英 悪性腫瘍で過剰発現するオーロラAは細胞核を標的として機能する 第67回日本癌学会学術総会 2008. 10. 30名古屋

18) 重石英生, 藤本伸一, 瀧雅行, 小野重弘, 三谷佳嗣, 東川晃一郎, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌におけるRHAMM遺伝子の発現解析第53回(社)日本口腔外科学会総会2008. 10. 20 徳島

19) 瀧雅行, 東川晃一郎, 米田進吾, 三谷佳嗣, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之 扁平上皮癌細胞におけるWnt-5aによる高度浸潤能獲得機構の解析 第53回(社)日本口腔外科学会総会 2008. 10. 20 徳島

20) 小野重弘, 三谷佳嗣, 東川晃一郎, 重石英生, 米田進吾, 瀧雅行, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌におけるEMT関連遺伝子VEGF-Cの役割と発現機構 第53回(社)日本口腔外科学会総会 2008. 10. 20 徳島

21) 東川晃一郎, 米田進吾, 瀧雅行, 田中扶美, 三谷佳嗣, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之 EMT型口腔扁平上皮癌細胞の浸潤を抑制するId3の解析 第53回(社)日本口腔外科学会総会 2008. 10. 20 徳島

22) 小野重弘, 三谷佳嗣, 重石英生, 米田進吾, 瀧雅行, 東川晃一郎, 北台靖彦, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌におけるEMT標的遺伝子VEGF-Cの発現と病期進展との関連 第66回日本癌学会学術総会 2007. 10. 3 横浜

23) 三谷佳嗣, 米田進吾, 瀧雅行, 小野重弘, 東川晃一郎, 鎌田伸之 口腔癌におけるh-pruneの発現と浸潤・転移との関連 第66回日本癌学会学術総会 2007. 10. 3 横浜

24) 米田進吾, 東川晃一郎, 瀧雅行, 重石英生, 小野重弘, 三谷佳嗣, 鎌田伸之 扁平上皮癌細胞におけるEMT標的遺伝子 Δ Np63 α の発現依存的な浸潤能の変化 第61回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2007. 4. 20 神戸

25) 小野重弘, 重石英生, 米田進吾, 瀧雅行, 東川晃一郎, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌におけるEMT標的遺伝子VEGF-Cの発現と病期進展との関連 第51回(社)日本口腔外科学会総会 2006. 10. 12 北九州

26) 東川晃一郎, 瀧雅行, 米田進吾, 重石英生,

小野重弘, 鎌田伸之 上皮・間葉移行を介した扁平上皮癌の高度浸潤能の獲得における△Np63αの役割 第51回(社)日本口腔外科学会総会 2006. 10. 12 北九州

27) 小野重弘, 重石英生, 米田進吾, 瀧雅行, 東川晃一郎, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌におけるEMT標的遺伝子VEGF-C発現の臨床病理学的意義に関する検討 第65回日本癌学会学術総会 2006. 9. 30横浜

28) 三谷佳嗣, 重石英生, 小野重弘, 米田進吾, 瀧雅行, 東川晃一郎, 鎌田伸之 口腔癌におけるh-pruneの発現と浸潤・転移との関連 第65回日本癌学会学術総会 2006. 9. 30 横浜

29) 中川貴之, 横井左奈, 井上純, 鈴木江美奈 PimkhaokhamAtiphan, 鎌田伸之 口腔癌におけるBAC-arrayを用いたDNAメチル化領域の網羅的探索 第65回日本癌学会学術総会 2006. 9. 30横浜

30) 東川晃一郎, 米田進吾, 瀧雅行, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之 上皮・間葉移行を介したp63の発現消失による扁平上皮癌の高度浸潤能の獲得第65回日本癌学会学術総会2006. 9. 30 横浜

31) 重石英生, 東川晃一郎, 小野重弘, 瀧雅行, 鎌田伸之 口腔扁平上皮癌におけるCENP-Hの発現解析 第65回日本癌学会学術総会 2006. 9. 30 横浜

32) 太田耕司, 重石英生, 瀧雅行, 西裕美, 鎌田伸之 口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞における炎症性ケモカイン発現の検討 第16回日本口腔粘膜学会総会・学術集会 2006. 6. 30 新潟

33) 東川晃一郎, 瀧雅行, 米田進吾, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之 扁平上皮癌における上皮・間葉移行を介したp63の発現消失 第51回(社)日本口腔外科学会総会2006. 5. 12名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 伸之 (KAMATA NOBUYUKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70242211

(2) 研究分担者

東川 晃一郎 (HIGASHIKAWA KOICHIRO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80363084

小野 重弘 (ONO SHIGEHIRO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70379882

重石 英生 (SHIGEISHI HIDEO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90397943

瀧 雅行 (TAKI MASAYUKI)
広島大学・病院・助教
研究者番号：00403551
(H18→20)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：