

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592337
 研究課題名（和文） 口腔癌の浸潤・転移を制御する上皮・間葉移行と p63 発現機構の解明
 研究課題名（英文） Functional Analysis of EMT and p63 in the invasiveness and metastasis of Oral cancer
 研究代表者
 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

研究成果の概要：

口腔癌の浸潤・転移において、EMT を誘導する Snail が重要な役割を果たしており、その Snail が転写制御する p63 依存的な浸潤能の解析をおこなった結果、p63 が正の発現調節をしている Id3 が MMP-2 の発現を誘導して浸潤能亢進に寄与していることがわかった。しかし p63 が生理的に制御する上皮構造形成と癌の浸潤に直接関わる分子機構はまだ明らかでないため、現在解析を継続している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌, 上皮・間葉移行, 癌の浸潤・転移, p63

1. 研究開始当初の背景

高度浸潤能を持つ口腔癌はしばしば上皮・間葉移行（EMT）が生じている。EMT が生じた癌から細胞株を樹立、さらには EMT を誘導する Snail を口腔癌細胞株に安定発現させ、高度浸潤能解析モデルを作成した。

2. 研究の目的

Snail が発現を抑制する p63 を安定発現させると EMT 細胞の浸潤能が抑制されたため、そのメカニズムを解析する。

3. 研究の方法

deltaNp63 α 安定発現EMT細胞, Id-3 安定発現EMT細胞および p63 ノックダウンさせた口腔扁平上皮癌細胞を樹立し、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤のメカニズムについて検討した。

4. 研究成果

p63 が転写抑制因子 Id3 の発現を制御しており、EMT 細胞に Id3 を安定発現させると浸潤能は抑制された。さらに Id3 は E-カドヘリンの発現を誘導することなく、また Snail

発現下でも MMP-2 の発現を抑制したことから、p63 依存的浸潤能の制御には Id3 が深く関与していることがわかった。

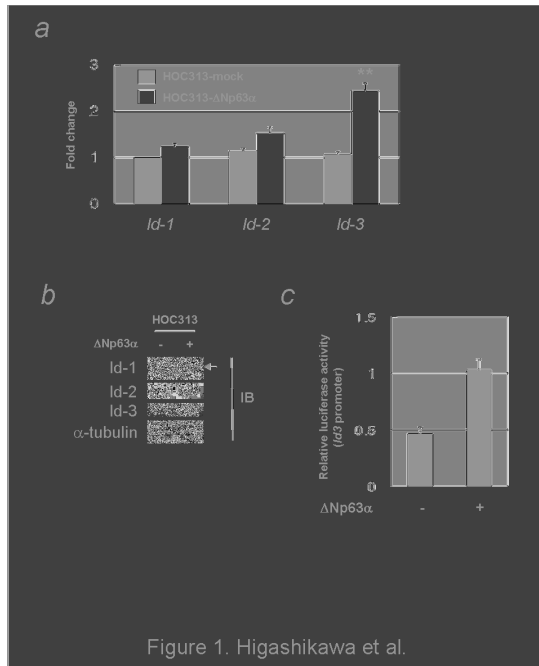


Figure 1. Higashikawa et al.

図 1. a) deltaNp63 α 安定発現させた EMT 細胞で Id-3 のみ mRNA 発現上昇している (real-time RT-PCR). b) 蛋白レベルでも Id-3 の発現上昇を認める (Immunoblot analysis). c) Id-3 プロモーターのルシフェラーゼアッセイにて deltaNp63 α による転写活性の上昇を認める.

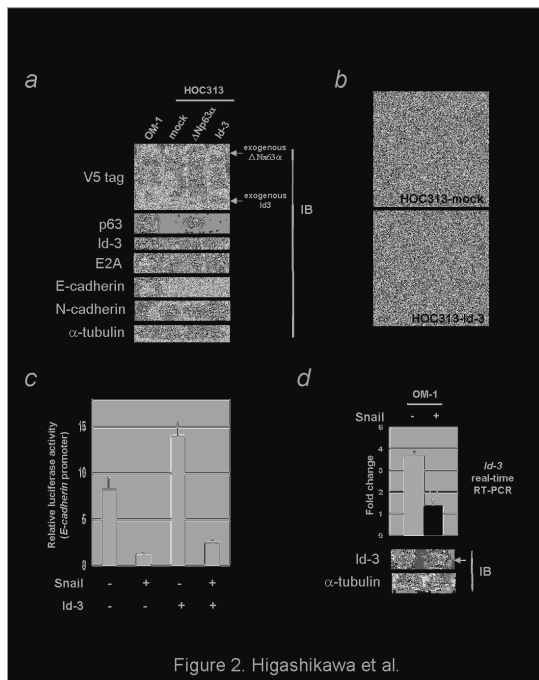


Figure 2. Higashikawa et al.

図 2. a) Id-3 安定発現 EMT 細胞の樹立 (Immunoblot analysis). E-カドヘリンを発現抑制する E2A を Id は抑制する、つまり Id

によって E-カドヘリンの発現は誘導されるが、Id-3 安定発現細胞では E2A 存在下においても E-カドヘリンの発現は誘導されなかった。b) Id-3 によって細胞の形態は変化しない。c) ルシフェラーゼアッセイにて E-カドヘリンの Id-3 依存的転写活性が Snail によって抑制される。d) Snail 強制発現細胞で Id-3 発現低下 (real-time RT-PCR)。

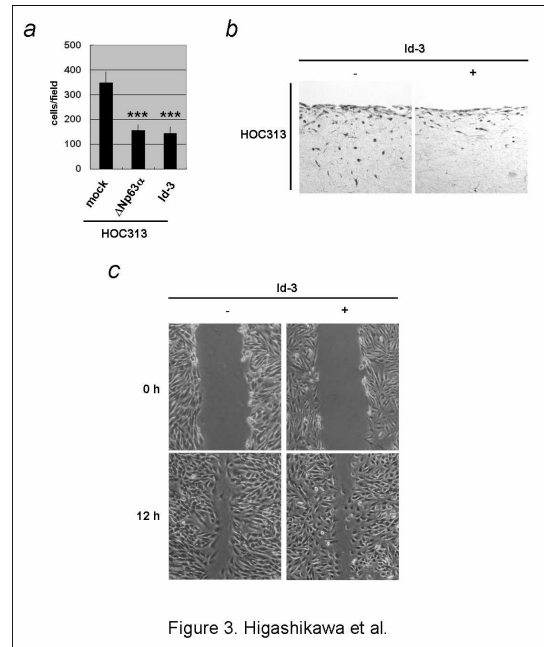


Figure 3. Higashikawa et al.

図 3. a) マトリゲルアッセイで Id-3 安定発現 EMT 細胞の浸潤能の低下を示す. b) 3次元再構成培養で、Id-3 安定発現 EMT 細胞の浸潤能の低下を示す. c) wound healing assay で細胞の走化性に変化はない.

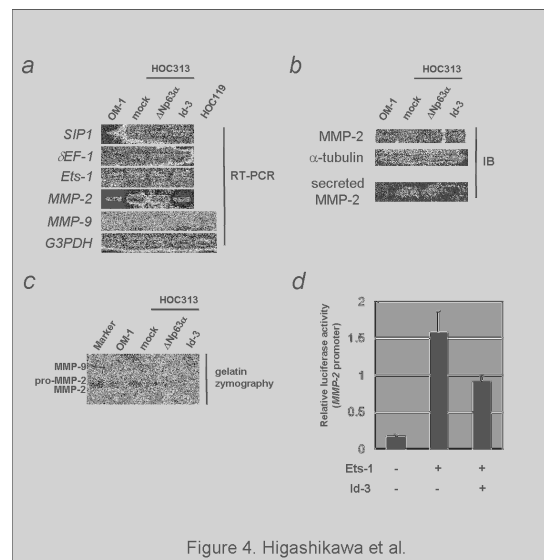


Figure 4. Higashikawa et al.

図 4. a) Id-3 安定発現 EMT 細胞における EMT 関連転写因子と MMP の発現 (RT-PCR). Ets-1 と MMP-2 の発現低下を認める. 過去に Ets-1 依存性 MMP-2 発現のメカニズムは報告済み. b) 蛋白レベルでも MMP-2 発現低下を示す. c)

ゲラチナーゼアッセイにおいても MMP-2 の活性低下を確認した. d) ルシフェラーゼアッセイで Ets-1 依存的 MMP-2 転写活性が Id-3 によって抑制されることを確認した.

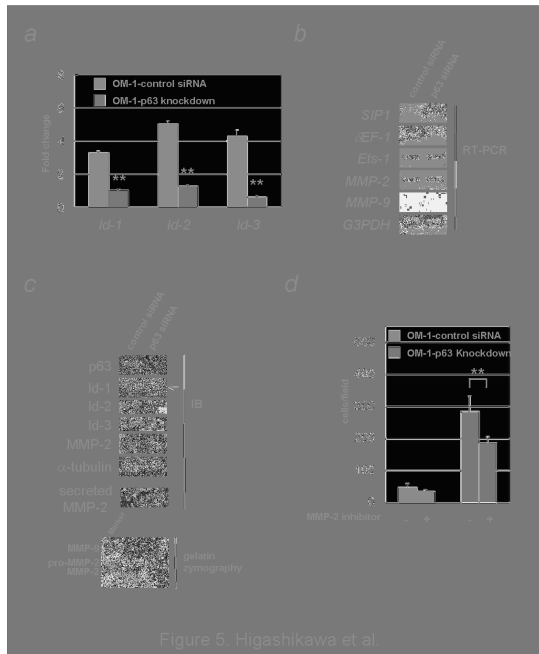


図5. a) p63 ノックダウン細胞における Id の発現変化 (real-time RT-PCR). Id-1-3 まですべての発現低下を認めた. b) Ets-1 依存的 MMP-2 発現上昇を認めた. c) Immunoblot analysis およびゲラチナーゼアッセイにおいても MMP-2 の発現と活性上昇を確認した. d) マトリゲルアッセイにおいて p63 ノックダウン細胞の浸潤能亢進は MMP-2 インヒビターで抑制された.

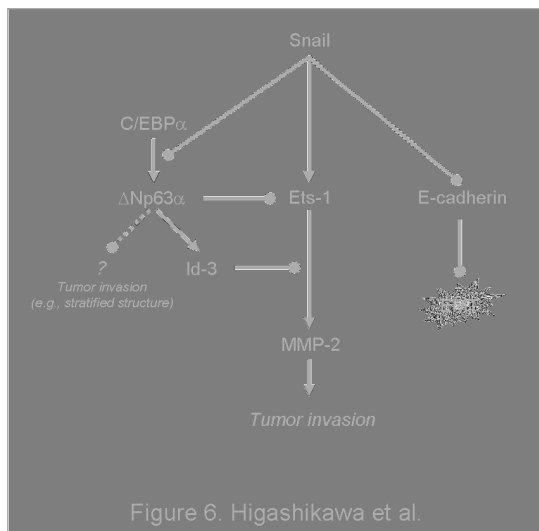


図6. Id-3 による Ets-1 依存的 MMP-2 発現制御で口腔癌の浸潤能をコントロールしている一方で, E2A 依存的 E-カドヘリンの発現制御は Id-3 よりも Snail が優位にコントロールしている.

p63 依存性浸潤能制御において我々はパイオニアであり, 生理的に p63 は Epithelial integrity (上皮構造構築) を制御するが, 癌細胞においてその崩壊が細胞遊走能を与えるという新しい概念を提唱した. 今回の解析で Id-3 が口腔癌の浸潤能制御に重要な役割を果たしていることが分かったが, さらに Epithelial integrity の崩壊と癌細胞の浸潤能の本質を追求すべく解析をおこなっている.

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)
1. 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. (査読あり)

2. 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. (査読あり)

3. 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 巻, 4 号, 359-362, 2008. (依頼総説) (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)
1. 東川晃一郎, 米田進吾, 飛梅 圭, 瀧雅行, 三谷佳嗣, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之: EMT 型口腔扁平上皮癌の浸潤を Id3 は抑制する, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28-30 日, 名古屋市.

2. 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 回日本口腔外科学会総会, 2008 年 10 月 20-21 日, 徳島市.

3. 米田進吾, 東川晃一郎, 瀧 雅行, 重石英夫, 小野重弘, 三谷佳嗣, 鎌田伸之: 上皮・間葉移行を介した扁平上皮癌細胞における ΔNp63α の発現依存的な浸潤能の変化, 第 80

回日本組織培養学会，2007年5月14-15日，
大阪市。

4. 米田進吾，東川晃一郎，瀧 雅行，重石
英夫，小野重弘，三谷佳嗣，鎌田伸之：扁平
上皮癌細胞における EMT 標的遺伝子の 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 年 4 月
20 日，神戸市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：8 0 3 6 3 0 8 4

(2) 研究分担者

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：7 0 2 4 2 2 1 1

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：7 0 3 7 9 8 8 2

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：9 0 3 9 7 9 4 3

三谷 佳嗣 (MITANI YOSHITSUGU)
広島大学・病院・歯科診療医
研究者番号：3 0 4 3 2 6 7 8

(3) 連携研究者

飛梅 圭 (TOBIUME KEI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教
授
研究者番号：4 0 3 5 0 0 3 7

(4) 研究協力者

米田 進吾 (YONEDA SHINGO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学
院生