

平成22年 5月 27日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19791528  
 研究課題名 (和文) 扁平上皮癌の Eph-Ephrin シグナルを介する浸潤・転移機構の解析

研究課題名 (英文) The involvement of Eph-Ephrin signaling in the invasion and metastasis of squamous cell carcinoma cells

研究代表者  
 笹部 衣里 (SASABE ERI)  
 高知大学・教育研究部医療学系・助教  
 研究者番号：40363288

研究成果の概要(和文)：EphB/EphrinB は mRNA および蛋白レベルで口腔扁平上皮癌細胞株 (OSC 細胞) において高発現し、中でも EphrinB2 は高浸潤能の細胞株で強く発現し、正常口腔粘膜上皮と比較して口腔扁平上皮癌組織においても有意に高発現していた。EphrinB2 をノックダウンした OSC 細胞の増殖能は抑制され、接着、浸潤細胞数も低下した。EphB/Fc キメラ存在下ではノックダウン細胞の接着は促進されたが、浸潤は抑制され、EphrinB2 は OSC 細胞の増殖、接着、浸潤能に寄与する因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : Eph/Ephrin mRNA and protein were expressed in oral squamous cell carcinoma (OSC) cells. EphrinB2 was especially overexpressed in oral squamous cell carcinoma and high invasive OSC cells. The proliferation, attachment, and invasion were suppressed in EphrinB2 knock-downed cells as compared with control cells. The treatment with EphB/Fc chimera promoted the attachment, but inhibited the invasion of EphrinB2 knock-downed cells. These results suggest that EphrinB2 contributes to the proliferation, attachment, and invasion of OSC cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	0	0	0
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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：癌・遺伝子・細胞・組織・発現制御・シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼである Eph とそのリガンドである Ephrin の相互作用は、神経細胞の軸作誘導や血管の動静脈分化などを通じて発生期の組織・器官形成に重要な役割を演じていることが知られている。それとともに、近年、この Eph/Ephrin システムが

乳癌、卵巣癌、肝癌、大腸癌、前立腺癌などにおいても高発現しており、血管新生誘導や浸潤・転移の促進などを制御して癌の進展に関与することが知られるようになってきている。しかしながら、その発現意義については未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌における Eph および Ephrin の発現の意義を臨床病理組織学的観点より検討するとともに、口腔扁平上皮癌細胞の遊走・浸潤能の活性化への Eph/Ephrin の関与の有無について検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔扁平上皮癌組織における

Eph/Ephrin の発現について免疫組織化学染色法を用いて調べ、腫瘍の浸潤様式、頸部リンパ節および遠隔転移の有無との関連でもって検討した。

### (2) 株化口腔扁平上皮癌細胞における

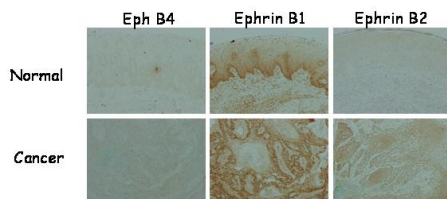
Eph/Ephrin の発現について RT-PCR および Western blotting 法にて調べ、これらの分子の発現と各 OSC 細胞の特性との関連を比較検討した。

(3) (1) (2) の結果より、Eph/Ephrin ファミリーの中で口腔扁平上皮癌組織および OSC 細胞で高発現していた EphrinB2 の siRNA を OSC4 細胞に導入し、細胞増殖能、In vitro における浸潤能、接着能への影響についてコントロール細胞における結果と比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 口腔扁平上皮癌組織における Eph/Ephrin の発現 (図 1)

正常口腔粘膜 5 例および口腔扁平上皮癌 5 2 例における EphB4 および EphrinB1、EphrinB2 の発現について免疫組織学的検討を行った結果、EphB4 の発現は正常口腔粘膜および口腔扁平上皮癌組織いずれにおいても、ほとんど発現が認められなかったのに対し、Ephrin B1 は正常口腔粘膜、口腔扁平上皮癌組織いずれにおいても強く発現されていた。これに対し、Ephrin B2 は正常口腔粘膜では弱い発現しか認められないのに対し、口腔扁平上皮癌組織では強い発現が認められた。EphrinB1 および EphrinB2 の発現と腫瘍の浸潤様式、頸部リンパ節および遠隔転移の有無との関連について検討したが、それらとの相関は認められなかった。



	Normal (n=5)			Cancer (n=52)		
	(-)	(±)	(+)	(-)	(±)	(+)
Eph B4	3	2	0	47	5	0
Ephrin B1	0	0	5	0	5	47
Ephrin B2	3	2	0	2	11	39

図 1 : 正常口腔粘膜および口腔扁平上皮癌組織における EphB4 および EphrinB1, B2 の発現

### (2) 株化口腔扁平上皮癌細胞における Eph/Ephrin の発現 (図 2)

EphB2 ~ 4、EphrinB1 ~ 3 の mRNA の発現は用いた全ての細胞株において認められ、細胞間に若干の発現差が認められた。蛋白レベルにおいても発現が認められ、細胞間に発現差が認められたが、mRNA レベルとの間に相関は認められなかった。口腔扁平上皮癌組織で高発現していた EphrinB2 は高浸潤能細胞株 OSC1、OSC4 で高発現しており、一方低浸潤能細胞株 OSC5、OSC7 では低発現であった。またそのリガンドである EphB2、B4 も同様の発現パターンを示した。

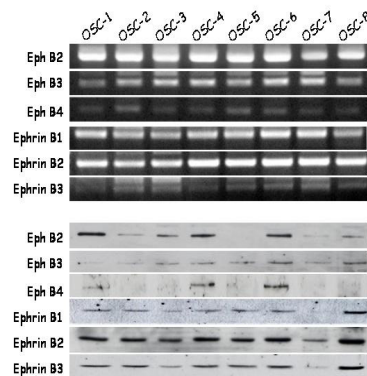


図 2 : 株化口腔扁平上皮癌細胞 (OSC) 細胞における EphB2-4 および EphrinB1-B3 の mRNA および蛋白の発現

### (3) OSC4 細胞の細胞生物学的特性に対する EphrinB2 のノックダウンの影響

①細胞密度と EphB/EphrinB 発現との相関  
密度を変えて OSC4 細胞を播種すると、細胞密度が高くなるにつれて EphrinB2 およびその受容体である EphB2、B3、B4 の発現が亢進した。(図 3)

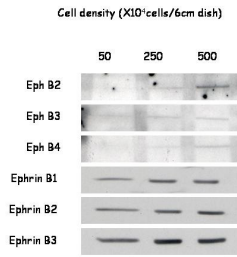


図 3: OSC4 細胞における細胞密度と EphB2-4 および EphrinB1-B3 発現との相関

#### ②増殖への影響

EphrinB2 の siRNA を OSC4 細胞にトランスフェクションし、細胞増殖への影響を MTT assay 法にて解析した。その結果、経時的に EphrinB2 ノックダウン細胞の増殖はコントロール細胞と比較して有意に抑制された。(図 4)

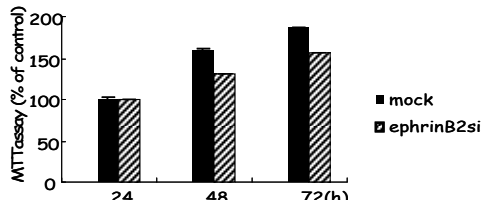


図 4: OSC4 細胞の増殖能に対する EphrinB2 ノックダウンの影響

#### ③浸潤能への影響

EphrinB2 の siRNA を OSC4 細胞にトランスフェクションし、浸潤能への影響を Invasion chamber assay 法にて解析した。その結果、EphrinB2 ノックダウン細胞の浸潤細胞数は有意に低下した。また同時に、EphB2-B4/Fc キメラで処理すると、両細胞の浸潤細胞数は低下した。(図 5)

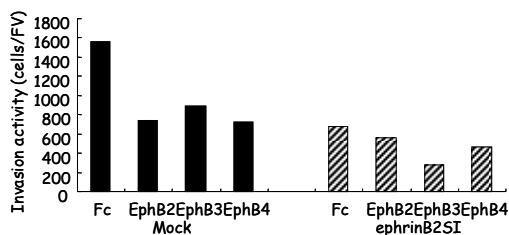


図 5: OSC4 細胞の浸潤能に対する EphrinB2 ノックダウンの影響

#### ④接着能への影響

EphrinB2 ノックダウン OSC4 細胞の接着能は、コントロール細胞の約 50%まで低下しており、EphB2-B4/Fc キメラであらかじめ 96 穴プレートにコーティングしておく、両細胞の接着活性は亢進した。(図 6)

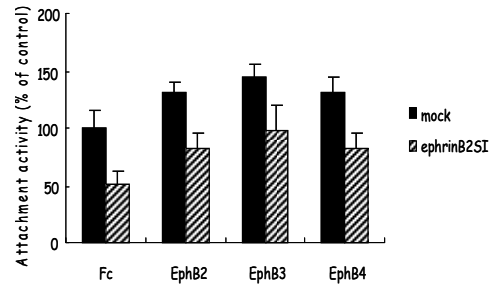


図 6: OSC4 細胞の接着能に対する EphrinB2 ノックダウンの影響

#### 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 10 件)

① Reactive oxygen species produced by the knockdown of manganese-superoxide

dismutase up-regulate hypoxia-inducible factor-1alpha expression in oral squamous

cell carcinoma cells. Sasabe E, Yang Z, Ohno S, Yamamoto T. Free Radic Biol Med.

査読有 2010;48(10):1321-9.

② Enhancement of apoptotic damage of squamous cell carcinoma cells by

inhibition of the mitochondrial DNA repairing system. Ueta E, Sasabe E, Yang

Z, Osaki T, Yamamoto T. Cancer Sci. 査読有 2008;99(11):2230-7.

③ Ionizing irradiation induces apoptotic damage of salivary gland acinar cells via

NADPH oxidase 1-dependent superoxide generation. Tateishi Y, Sasabe E, Ueta E,

Yamamoto T. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2008;366(2):301-7.

④ 笹部衣里, 大野清二, 立本行宏, 山本哲也:  
口腔扁平上皮癌細胞における Eph/Ephrin の発  
現とその意義. 口腔組織培養学会誌 査読無  
17(1): 41-42, 2008.

[学会発表] (計 26 件)

- ① 笹部衣里, 大野清二, 立本行宏, 山本哲  
也 : 口腔扁平上皮癌細胞における  
Eph/Ephrin の発現とその意義、第 44 回日  
本口腔組織培養学会 (2007 年 12 月 1 日、  
愛媛)
- ② 大野清二, 笹部衣里, 谷脇史人, 森下慶  
子, 山本哲也 : 口腔扁平上皮癌細胞にお  
ける Eph/Ephrin シグナルの関わり、第 62  
回日本口腔科学会学術集会 (2008 年 4 月  
17, 18 日、福岡)

[その他]

ホームページ等

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_dntst/index.htm](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笹部 衣里 (SASABE ERI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号 : 40363288