

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791589

研究課題名（和文） ESCRT 小胞輸送系による頭頸部癌悪性化制御の解析

研究課題名（英文） Role of ESCRT proteins in the malignant phenotype control of Head and Neck Cancer Cells

研究代表者 加藤 健吾（KATO KENGO）

東北大学・病院・助教

研究者番号：40455788

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌は咽頭・喉頭等に発生し、咀嚼、呼吸、嚥下等を損なうため予後と QOL の両観点から克服が急務である。頭頸部癌の浸潤・転移には EMT が必須である。EMT の過程は細胞内輸送系によって制御されている可能性が高い。本研究では VPS4 等から構成される ESCRT 系を介した悪性形質制御を解析した。不活型 VPS4 を発現する癌細胞株樹立に成功したが、形態変化、運動性の亢進に大きな変化はなかった。EMT 関連 3 遺伝子の mRNA を解析したが有意差はなかったが、ALDH1 を指標としたがん幹細胞特性減少が認められた。以上の結果から、ESCRT は頭頸部癌の悪性度を制御しうることを示された。

研究成果の概要（英文）：Head and Neck Cancer (HNC) originates from the pharynx, and larynx. Improvement in the management, as well as targeted therapy, is required to maintain patients' quality of life and survival. In this study, we investigated how HNC which is linked to EMT is regulated by the ESCRT vesicular transport system. Forced expression of the dominant negative ESCRT regulator, the dominant negative VPS4, in HNC cell lines reduced the cancer stemness phenotype, such as ALDH1 activity. In contrast, cell morphology and motility was not altered. Our results suggest that ESCRT system may control the malignant phenotypes of HNC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉学

キーワード：酵素、蛋白質、ユビキチン、小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は咽頭・喉頭等に発生し、咀嚼、呼吸、嚥下等の生体機能を損なうことから、単に生命予後のみならず **Quality of Life** の観点からもその克服が急務である。頭頸部癌の大部分を占める扁平上皮癌は、強い角化傾向を呈し、原発部位と転移部位に硬い腫瘤を形成しながら頭部・頸部さらに体幹へとリンパ管・静脈に沿って浸潤・転移する。一方、最近になって癌の浸潤・転移には上皮-間葉転換 (**EMT**; **endothelial-mesenchymal transition**) という多段階の細胞生物学的過程が必須であることが判明した。一方、癌細胞表面分子は **ESCRT** 小胞輸送複合体と呼ばれる蛋白質群によって輸送・分解され、量的調節を受けることで癌細胞の悪性を誘導している可能性が高い。従前の知見では細胞内タンパク質のうち **EGFR** をはじめとする多くの増殖因子受容体はユビキチン化酵素 (**E3**) により細胞質内領域の受けると **ESCRT** によって認識されエンドソーム等の細胞内小胞膜上に濃縮され、最終的にエンドソーム内腔に陥入しライソゾーム依存性に分解される。一方、がんとの関連性については、**ESCRT** 蛋白質のひとつである **Hrs** の発現を人為的に抑制したところ、親細胞では認められない足場非依存性増殖が認められた。さらに、**ESCRT** に含まれる **Tsg101** は当初、がん抑制遺伝子として同定されその欠損ないし発現低下は発がんに関連があるとされた。一方、多くの癌では **ESCRT** の発現があるが、その発現量の多寡はがんによって異なっている。以上の知見から、**ESCRT** 輸送系が癌関連表面分子群の輸送・分解を担っており、その異常が頭頸部癌 **EMT** 等の悪性化形質獲得の原因となっている可能性を考え、本研究ではこの仮説の検証を試みた。**ESCRT** と頭頸部癌の関連性は、頭頸部癌の悪性形質獲得・維持の新たな制御機構を示唆するものと考えられる。

2. 研究の目的

ヒト頭頸部癌細胞において **ESCRT** 分子群のうち **Hrs** の発現を人為的に抑制すると細胞内小胞の形態・機能に異常が認められた。癌の悪性化と小胞輸送の関係を示唆する実験結果が報告されており、ヒト頭頸部癌の悪性化において小胞輸送系は重要な役割を果たす可能性が高い。本研究では、頭頸部癌の悪性化における **ESCRT** の役割を明らかにするため **ESCRT** 系の最終段階を制御するマスターレギュレーターである **VPS4A** に焦点を当てる。①癌細胞株を用いた *in vitro* 実験系、②ヒト頭頸部癌を用

いた *in vitro*, *in vivo* 実験系、の両面から解析することで、小胞輸送による頭頸部癌制御を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

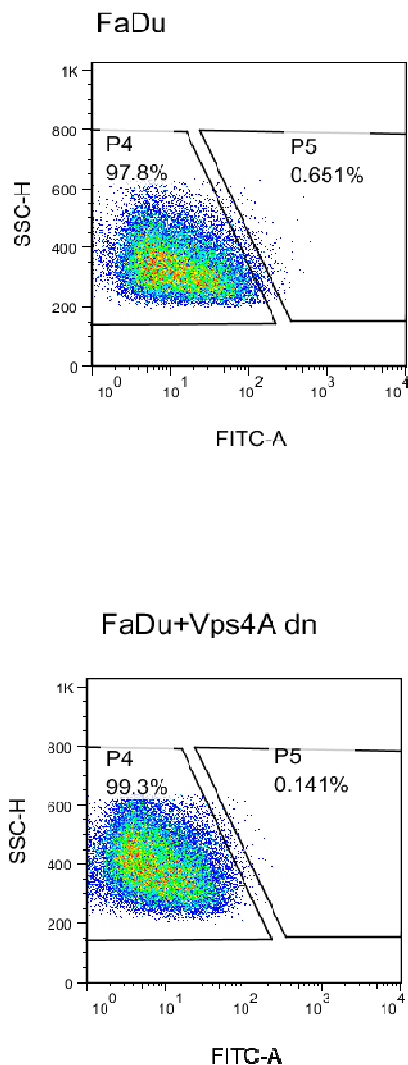
(1) ドキシサイクリン誘導性癌細胞を用いた *in vitro* 悪性化の解析: 癌における **ESCRT** 小胞輸送系の役割を解析するため、ドキシサイクリン誘導系頭頸部癌細胞株を樹立し、輸送系異常による悪性を検証する。乳がん細胞株 **MCF-7** に対してまず **Tet-on** ベクターをレトロウイルスを用いて導入した。次いで、同じくレトロウイルスを用い不活性型 **VPS4A** をドキシサイクリン依存性に発現する発現ベクターを導入した。得られた細胞株 (**MCF-7/Tet-onVPS4Adn**) は、実際にドキシサイクリン依存性に **VPS4A** 変異体 (不活性型) を発現しすることを確認した。不活性型 **VPS4A** 発現させ、人為的に輸送系蛋白質の発現量を変化させた。この細胞を用いて共焦点顕微鏡を用いた細胞形態の変化、特に **EMT** に類似した紡錘状態への誘導、遊走能、細胞増殖能の変化などを検証した。さらに **EMT** 関連遺伝子として *twist1*, *snail*, *slug* について mRNA を定量 PCR (Roche) にて検討した。

(2) 不活性型 **VPS4** を発現する頭頸部癌細胞株を用いた *in vivo* 悪性化の解析: 上記とは別に頭頸部癌 **FaDu** 細胞を用いてレトロウイルスベクターを導入した細胞株 (**FaDu-VPS4dn**) を調整する。この細胞を用いて上記と同様に細胞形態、増殖、増腫瘍性を解析する。さらに、**FaDu** を用いて **Hrs** のノックダウンを行い、細胞形態や悪性化に変化がないか調べた。

4. 研究成果

(1) 誘導性癌細胞を用いた *in vitro* 悪性化解析: 一般的細胞株として知られている **MCF7** を対象として **ESCRT** 系を阻害する実験系を構築した。レトロウイルスベクター (*pRetroX*) によって不活性型 **Vps4** をドキシサイクリン依存性に発現する細胞株 **MCF-7/Tet-onVPS4dn** の樹立に成功した。この細胞株を用いて増殖能を調べたところ明らかな差異はなかった。そこで **EMT**、形態変化、運動性の亢進、の変化を検討した。**EMT** に関する遺伝子として *twist1*, *snail*, *slug* の mRNA を検討したが有意な差はなかった。

(2) FaDu を用いて、ESCRT 輸送系タンパク質 Hrs をノックダウンした細胞 (FaDu-HrsRNAi)、および Vps4 を発現する細胞株 (FaDu-Vps4dn) を作成した。これらの細胞はいずれも細胞増殖に変化がなかった。一方、細胞形態はやや紡錘形を帯びていた。EMT 誘導を疑い、関連分子の mRNA 量を定量したが大きな差異はなかった。一方、FaDu-VPS4dn を NOG マウスに移植すると造腫瘍能が変化した。特に腫瘍形成が明らかに現弱した。がん幹細胞について調べるため、ALDH1 アッセイを行った。その結果、VPS4dn によって ALDH1⁺細胞は減少していた。以上の結果から、頭頸部癌では EMT とは異なる機序により ESCRT による腫瘍増殖制御がなされている可能性が示唆された。



(図1) ドキシサイクリン誘導性癌細胞を用

いた悪性化解析：不活性型 VPS4A を遺伝子導入した FaDu 細胞 (FaDu+Vps4Adn) ではコントロールに比べて ALDH1 陽性細胞が減少した。ALDH1⁺細胞を P5 で示す。

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. Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 384-390 (2010) 査読有
2. Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Juliana FM, Tanaka N, Asano H. Regulation of interleukin-21 receptor expression and its signal transduction by WSB-2. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 171-177 (2010) 査読有
3. Yamada K, Tsukahara T, Yoshino K, Kojima K, Agawa H, Yamashita Y, Amano Y, Hatta M, Matsuzaki Y, Kurotori N, Wakui K, Fukushima Y, Osada R, Shiozawa T, Sakashita K, Koike K, Kumaki S, Tanaka N, Takeshita T. Identification of a high incidence region for retroviral vector integration near exon 1 of the LM02 locus. *Retrovirology* 6, 79 (2009) 査読有

[学会発表] (計3件)

- 1 加藤健吾 間接熱量計による頭頸部癌化学放射線療法の安静時エネルギー消費量 (REE) の測定 第26回日本静脈経腸栄養学会 2011年2月18日 名古屋市
- 2 加藤健吾 間接熱量計による頭頸部癌化学放射線療法の安静時エネルギー消費量 (REE) の測定 第48回日本癌治療学会学術集会 2010年10月28日 京都府

3 加藤健吾 TPF 同時併用化学放射線療法に関連した間質性肺炎の検討 第 34 回日本頭頸部癌学会 2010 年 6 月 11 日 東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 健吾 (KATO KENGO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40455788

(2) 研究分担者

()

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

田中 伸幸 (TANAKA NOBUYUKI)

宮城県立がんセンター（研究所）・免疫学

部・部長

研究者番号：60280872