

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592958

研究課題名(和文) 上皮間葉間の移行阻害による癌の悪性放棄の機序解明

研究課題名(英文) Investigation of waiver of malignancy via loss of epithelial-to-mesenchymal transition.

研究代表者

新中 康史(Niinaka, Yasufumi)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：80361715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：AMF単量体を過剰分泌させると癌細胞と線維芽細胞の遊走を誘導する。AMF単量体を過剰分泌させると一部は二量体を形成する。分子量は非還元で55キロダルトンと110キロダルトンの二種類のバンドが確認され、還元では65キロダルトンの単一バンドとなる。N末端側の一カ所に点変異を加えるとアミノ酸の置換が生じ、二量体形成しなくなる。二量体形成をしないAMFを過剰分泌させると細胞遊走は誘導するが、上皮間葉移行を誘導しなくなる。AMFは高親和性受容体を介して細胞遊走を誘導することから、低親和性受容体は上皮間葉移行に関わっていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Over-expression of AMF monomer induces motility of tumor cells and fibroblasts, at the same time forms homodimers in part. Molecular weight of AMF is 55 kD and 110 kD under non-reduced condition, and 65 kD under reduced condition. A point mutation of cDNA in the N terminal causes a replacement of amino acid, which results in loss of formation of homodimer. Over-expression of point-mutated AMF induced cell motility via high affinity receptors, however, waives ability to induce epithelial-to-mesenchymal transition. Thus, formation of homodimers of AMF is strongly suggested to be critical to induce epithelial-to-mesenchymal transition by way of low affinity receptors.

研究分野：外科系歯学

キーワード：遊走

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の悪性獲得には EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition: 上皮間葉移行もしくは上皮間葉転換) が必須とされる。本研究ではこの Transition を阻害して癌細胞に悪性放棄させることを主目的とする。さらにこの悪性放棄の過程でみられるシグナル伝達物質や転写因子の量的、質的变化を解明し、そこで得られた知見や技術を診断や遺伝子治療などへ臨床応用することを最終目的とする。

癌は早期発見・早期治療により完治しうる病気と言われるようになって久しいが、未だにがんは日本人の死因のトップである。それは癌治療の難しさでもあり癌の悪性たる所以でもある。仮に癌の悪性度を制御することができれば癌治療の選択枝は広がり、担癌状態での延命も可能となる。そのため癌の悪性獲得の機序解明の中に悪性制御に関わるヒントを求めて多くの研究がなされてきた。一方、癌では上皮マーカーの E-cadherin が減少し間葉マーカーの Vimentin が増加すると癌の悪性度が増し患者は予後不良となることは古くから知られていたが、この本質については長らく不明であった。通常上皮は体表を覆い体の外形を形成・維持し間葉は体の中の支持組織を形成しこれらは容易には入れ替わったりしないが、1980 年代後半、胚の発生分化において上皮系細胞が間葉系細胞へと変化する過程が発見され、EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition: 上皮間葉移行) と名付けられた。21 世紀には癌での同様な現象も EMT であり、癌細胞の悪性獲得にはこの EMT が不可欠であることが証明され、EMT の研究が世界的に行われるようになった(1)。

これに対し逆の MET (Mesenchymal to

Epithelial Transition: 間葉上皮移行) は EMT の概念の浸透とともに広く受け入れられてきたが、MET の事象自体が少ないことに加えて MET の実験的誘導もできなかった (例えば EMT を誘導する転写因子の発現を RNAi などの手法で抑制しても MET を引き起こさない) ことから MET の研究はほとんど進展しなかった。そのような中で我々が安定した実験的 MET の誘導に成功したこと、さらに MET により骨肉腫細胞は種を超えて低悪性化もしくは悪性放棄を誘導したことからその世界に与えたインパクトは非常に強かった(1)。

本研究の背景には間葉細胞の特徴の一つである遊走能の一連の研究があった(2)。転移能の異なる複数の扁平上皮癌細胞を比較すると転移能の違いは遊走能の違いに一致したことに始まった(3)。転移能、Autocrine Motility Factor (AMF: 遊走能は自己分泌型遊走因子) の発現・分泌の違いに相関し(3)、同相関は胃癌や大腸癌などの腺癌でも認められた(4)。AMF のクローニングから AMF は細胞内では糖代謝に関わる酵素と同一遺伝子産物であり(5)、AMF 受容体のクローニングから受容体は 7 回膜貫通型 G タンパクであることが明らかとなった(6)。AMF 受容体には既知の高親和性受容体と未知の低親和性受容体があることを指摘した(7)。AMF 分泌は癌細胞では異常発現に続く 185 番目のセリン残基が選択的にリン酸化されて分泌され(8)、扁平上皮癌細胞に AMF を過剰発現させると EMT が起きることを明らかにした(9)。扁平上皮癌細胞の遊走様式には AMF への感受性からいくつかのタイプに分けられることを示し(10)、アポトーシスに抵抗性を示すようになるなど(11)、扁平上皮癌細胞の EMT はいくつかの段階を経ていることを示した(12)。また骨肉腫細胞の AMF mRNA を +364 位の G

直後で切断しても(13)、+390位のG直後で切断してもAMFの発現抑制とそれに引き続くAMFの分泌抑制とMETを誘導した。その結果、低悪性化を生じることを示し(14)、さらに動物実験を加えて骨肉腫細胞の悪性放棄を実証した(1)。悪性放棄の機序が分子生物学的に解明されれば、EMT/METの解明のみならず、今後臨床応用も期待される。そこで、本研究では上述の研究結果を踏まえて、悪性放棄の機序解明を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では悪性放棄の機序解明にさしあたり、AMFのダイマー形成と悪性度の関係についてまず焦点を当て、ダイマー形成能と浸潤転移能の相関について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

転移型ヒト扁平上皮癌細胞株 HSC-3 細胞から抽出した RNA から逆転化酵素-PCR 法にてヒト AMFcDNA を作製した。これを TA クローニングベクターに組み込み増幅させた。増幅させたヒト AMFcDNA を制限酵素で切り出し、遺伝子配列明らかにするためシーケンス分析を行い、発現ベクター-pCDNA3.1へ組み込み、これをリポフェクション法にて HSC-3 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した HSC-3 細胞は細胞増殖、形態、遊走能、浸潤能について検索した。間葉細胞として線維肉腫細胞株 HT1080 を用いた。細胞増殖や細胞形態は位相差顕微鏡にて経時的にカウントし観察し、遊走能はポイデンチャンパー法にて計測し、浸潤能はマトリゲルコートしたポイデンチャンパー変法にて計測した。また遺伝子導入した各細胞から RNA、DNA、蛋白質および培養上清を抽出し、PCR にて mRNA の発現、DNA の存在、ウエスタンブロット法にて蛋白質の発現、分泌物の発現を検索した。さらに AMF のサイレンシングのため AMF のライボザイム AMFsilencerRZ を AMFcDNA を導入した HSC-3 細胞に遺伝子導入し、同様に細胞増殖、細胞形態、細胞遊走能、細胞浸潤能、PCR、ウエスタンブロットを行った。上皮マーカーとしてサイトケラチン、間葉マーカーとしてビメンチンを用いた。

4. 研究成果

ヒト AMFcDNA の塩基配列 550 位の G から 583 位の C までは種を超えてよく保存されており、アミノ酸配列は VSNI DGTHIAKT となりヒト、マウスなどで完全に一致する。そこで塩基配列 561 位の T を G に置換する点変異を加えるとアミノ酸配列は I から M となり、潜在的リン酸化部位 (SNID) が消失し単量体 AMF のみ分泌され、二量体 AMF は分泌されなくなる (図-1)。親株 HSC-3 細胞を P、単量体のみを分泌する株を M、二量体も分泌する株 (点変異を加えていない) を D、間葉のコントロールとして HT1080 細胞を H としてこれらと比較した (図-1)。AMF 単量体を過剰分泌させると一部は二量体を形成する。分子量は非還元 (NR) で 55kD と 110kD の二種類のバンドが確認され、還元 (R) では 65kD の単一バンドとなる。RT-PCR で RNA レベルでの発現をみると図-2 の如く、親株よりも単量体産生細胞は AMF の発現が上昇しており、同時に高親和性 AMF 受容体の発現も上昇していた (図-2)。単量体 AMF 発現細胞の自己細胞遊走能は二量体 AMF 発現細胞や線維肉腫細胞の自己細胞遊走能とほぼ同レベルに上昇した (図-3)。

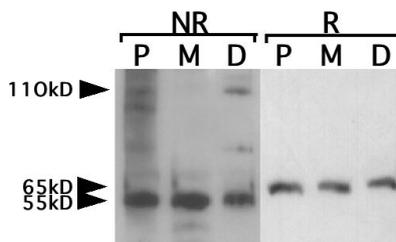


図-1. 培養上清のウエスタンブロット

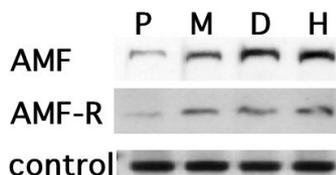


図-2. RT-PCR

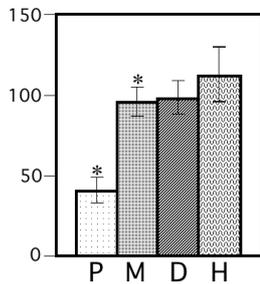


図-3. 自己細胞遊走

ところが単量体 AMF を過剰分泌する細胞もマトリゲルコートしたポイデンチャンバーアッセーでは親株と同程度の浸潤能しか示さず、浸潤能を上げるには AMF 単量体の分泌だけでは不十分であることが示唆された(図-4)。細胞抽出液をサイトケラチン(上皮マーカー)、ビメンチン(間葉マーカー)の各抗体を用いたウエスタンブロットでは、単量体 AMF 細胞はサイトケラチンの発現は親株とほぼ同等でビメンチン発現も同様であった。これに対し二量体 AMF 細胞ではサイトケラチンの発現低下と同時にビメンチン発現上昇が生じていた(図-5)。AMF のサイレンシングを行うとこれらの変化は消失し、親株と同様の性格に復帰した。これらの結果から単量体 AMF は細胞遊走は誘導するが、上皮間葉移行を誘導しない。AMF は高親和性受容体を介して細胞遊走を誘導することから、二量体 AMF のシグナル伝達には低親和性受容体を介して上皮間葉移行に関わっていることが強く示唆された。

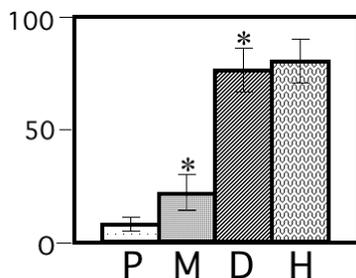


図-4. 細胞浸潤能(マトリゲル)

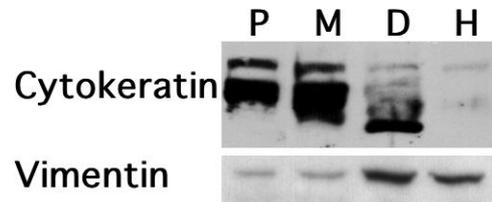


図-5. 細胞抽出液のウエスタンブロット

<引用文献>

- (1) Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, et al. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal to epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis. Cancer Research 2010 in press (70(22); 0F1-11[Epub ahead of print])
- (2) Niinaka Y, Haga A, Raz A: Quantification of Cell Motility: Gold colloidal phagokinetic track assay and wound healing assay. Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Analysis of Cell Behavior In Vitro and In Vivo, Human Press Inc., Totawa, NJ, USA, published on 20 Jul 2001, Methods in Molecular Medicine, vol. 58: 55-60. 2002.
- (3) Niinaka Y, Oida S, Ishisaki A, et al: Autocrine motility factor and its receptor expressions in oral squamous cell carcinoma (SCC) cells. Int J Oncol 9: 433-438, 1996.
- (4) Niinaka Y, Raz A. Tumor Cell Motility and Its Receptor. Gastroenterological Carcinogenesis 2: 153-160, 1996
- (5) Niinaka Y, Paku S, Haga A, Watanabe H and Raz A: Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/muturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. Cancer Research 58: 2667-2674, 1998
- (6) Shimizu K, Tani M, Watanabe H, Nagamachi Y, Niinaka Y, et al: The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. FEBS Letter 456: 295-300, 1999
- (7) Niinaka Y, Haga A, Negishi A, Yoshimasu H, Raz A, Amagasa T. Regulation of cell motility via high and low affinity autocrine motility factor (AMF) receptor in human oral squamous carcinoma cells. Oral Oncol 38:49-55 2002
- (8) Haga A, Niinaka Y, Raz A: Phosphohexose isomerase/autocrine

motility factor/ neroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein. Biochimica et Biophysica Acta 1480: 235-244, 2000.

- (9) 新中康史、新井直也、山口 聰、天笠光雄：口腔扁平上皮癌細胞における Autocrine Motility Factor (AMF) による Vimentin の発現誘導．日本口腔組織培養学会雑誌 10: 35-43, 2001.
- (10) 新中康史、新井直也、山口 聰、天笠光雄．口腔扁平上皮癌細胞の遊走様式についての研究．口腔組織培養学会誌、11: 19-20, 2002.
- (11) Haga A, Funasaka T, Niinaka Y, Raz A: Autocrine motility factor signaling induces tumor apoptotic resistance by regulations Apf-1 and Caspase-9 apoptosome expression. Int J Cancer. 107:707-14 2003.
- (12) 新中康史、中野佳央、宗像源博、樋口雅俊、岩淵大珠、松田健男、藤田叔宏、原田清：口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉移行．口腔組織培養学会誌 17: 25-26 2008．
- (13) 新中康史、中野佳央、樋口雅俊、岩淵大珠、松田健男、小田充匡、宗像源博、原田清：骨肉腫細胞の間葉上皮移行．口腔組織培養学会誌 18: 23-24 2009.
- (14) 新中康史、小田充匡、中野佳央、樋口雅俊、中澤龍一、吉田智映子、宗像源博、原田清：骨肉腫細胞 MG-63 への Ribozyme の応用－間葉上皮移行と骨芽細胞への分化－口腔組織培養学会誌 19: 7-8 2010.

5. 主な発表論文等

投稿準備中のため非公表

(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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

出願年月日：

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

新中 康史 (Niinaka, Yasufumi)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：80361715

(2) 研究分担者

なし

(4) 研究協力者

Raz, Avraham

Wayne State University, Karmanos

Cancer Institute, Michigan, USA. 教授

和気 創 (WAKE, Sou)

東京医科歯科大学・歯学部・大学院生