

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5月 31日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792339
 研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌の浸潤転移阻止を目的とした Wnt シグナル伝達経路の解析
 研究課題名（英文） Study of Wnt signaling pathway for inhibition of invasion and Metastasis on oral squamous cell carcinoma.
 研究代表者
 米川 敦子 (YONEKAWA ATSUKO)
 大阪大学・歯学部附属病院・医員
 研究者番号：70600914

研究成果の概要（和文）： beta-catenin の細胞内集積は、TCF/Lef の転写活性の亢進を引き起こし、Rho family 分子である Cdc42 と Rac の活性化とアクチン細胞骨格の再構成によって、口腔扁平上皮癌細胞の遊走能を増強させた。この遊走能の亢進に Wnt5a が関与している可能性があり、 beta-catenin 経路と PCP 経路を結びつける因子の一つとして予想された。

研究成果の概要（英文）： Aberrant cytoplasmic accumulation of beta-catenin can induce TCF/Lef-mediated transcriptional activity and enhance the migration of OSCC through the elevation of active Rho family, Cdc42 and Rac, and the rearrangement of actin filaments. Wnt5a may be involved in this enhancement of migration in OSCC , and be one of factors to link beta-catenin pathway with PCP pathway.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

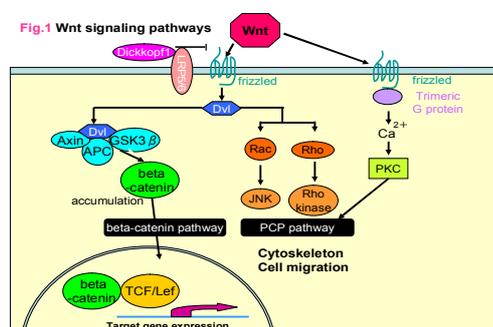
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、浸潤、転移、Wnt シグナル、beta-catenin

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル伝達経路は生物種を超えて広く保存されており、個体の初期発生や細胞の増殖、分化を制御し、様々な生命現象に重要な役割を示している。Wnt シグナル伝達経路 (Fig 1) には、beta-catenin の細胞内蓄積を介して転写制御する beta-catenin 経路、低分子量 G 蛋白質である Rho family を介して平面内細胞極性 (planar cell polarity) を制御する PCP 経路、3 量体 G 蛋白質を介して Ca²⁺ の動員をひき起こし、PKC (protein kinase C) や CaMK II (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II) などを活性化する Ca²⁺経路が存在する。



Wnt シグナルの破綻は発癌と深い関連があることが判明してきた。beta-catenin は細胞膜に存在する E-cadherin の裏打ち蛋白として細胞膜付近に局在するが、多くの癌細胞において Wnt シグナル等により安定化し細胞質

内に蓄積し核内へ移行する。Wnt 非存在下では beta-catenin は APC、Axin、GSK-3 β などと複合体を形成し、GSK-3 β によりリン酸化されユビキチン化を受け分解される。大腸癌や肝癌などでは beta-catenin、APC、Axin の遺伝子変異により複合体を形成することができなくなり、GSK-3 β による beta-catenin のリン酸化が抑制され、その結果 beta-catenin が安定化し細胞質内に集積、さらに核内へ移行、転写因子 TCF/Lef と結合し、cyclinD1 や c-myc 等の標的遺伝子の転写を亢進して発癌に関与するとされている。また、Wnt シグナルの PCP 経路を介して、細胞内の RhoA や Rac などを活性化させることによって、細胞運動に影響を及ぼすことが判明してきた。低分子量 G 蛋白質の Rho family (Rho、Rac、Cdc42) がアクチンの再構成を制御して細胞形態の維持、細胞接着、細胞運動に関与することが解明されつつある。すなわち、Wnt シグナル伝達系の異常が、癌細胞の周囲組織へ浸潤し、転移を引き起こす性質に深く関わっている可能性が高いと考えられる。

口腔扁平上皮癌においても、beta-catenin の細胞質、核への集積が認められることが、我々の研究グループを含め報告されるようになってきた。さらに、口腔扁平上皮癌の浸潤部位において特に beta-catenin の細胞質及び核への集積が見られる事実が報告されている。

我々はヒト口腔扁平上皮癌組織について、大腸癌などでいわれるように、口腔扁平上皮癌において beta-catenin の細胞内集積を起こす主な原因が、beta-catenin、APC、Axin の遺伝子変異に起因するのかを調べたが、各因子に遺伝子変異が見られることは少ないことを報告した。さらに研究代表者らは、口腔扁平上皮癌細胞における beta-catenin の細胞内集積の役割について明らかにするために、beta-catenin が細胞膜にのみ限局する口腔扁平上皮癌細胞株に beta-catenin がリン酸化を受ける部位である Exon3 を欠失させた変異型 beta-catenin 遺伝子を Tet off system を使って遺伝子導入し発現させ、beta-catenin の細胞質や核へ集積を認める複数の細胞株を樹立した。そして、それら細胞株の細胞生物学的特性について解析したところ、細胞形態が紡錘形となり、E-cadherin の局在に変化がみられ、EMT (epithelial-mesenchymal transition) が認められた。さらに遊走能、浸潤能が亢進し、TCF/Lef の転写活性が増強し、beta-catenin 経路の標的遺伝子である MMP7 の遺伝子発現が上昇した。さらに細胞運動に関与する Rac、

Cdc42 の活性化が起き、細胞骨格の再構成が認められることが明らかになった。

2. 研究の目的

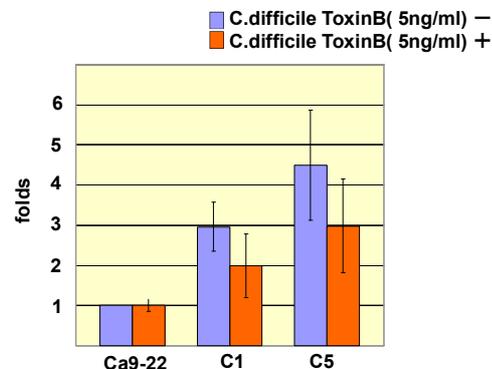
口腔癌の治療において、浸潤と転移を制御することが重要である。Wnt シグナル伝達経路の中心となるのが beta-catenin 経路である。大腸癌を始め多くの癌でこの経路の恒常的な活性化が癌化に寄与すると考えられている。一方、近年、beta-catenin 経路の標的遺伝子として、細胞の運動や浸潤に関わる遺伝子が報告されている。本研究の目的は、口腔扁平上皮癌における Wnt/beta-catenin 経路と浸潤や転移との関連性を解析し、Wnt シグナルをターゲットとした新たな分子標的治療の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

細胞は beta-catenin が細胞膜にのみ局在する Ca9-22 とこの細胞に変異型 beta-catenin を遺伝子導入し、細胞質及び核に beta-catenin が集積する C1、C5 を使用した。細胞遊走能は transwell chamber assay、wound healing assay で、TCF/Lef の転写活性は luciferase reporter gene assay で、Rho family 分子の活性化は Rho family GTPase activation assay で評価した。遺伝子の発現を定量 PCR と半定量 RT-PCR で測定した。細胞蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察した。Rho family 分子の阻害剤 C. difficile Toxin B、recombinant wnt5a、Wnt シグナルの阻害剤 sFRP2 を作用させあわ、細胞遊走能を測定した。

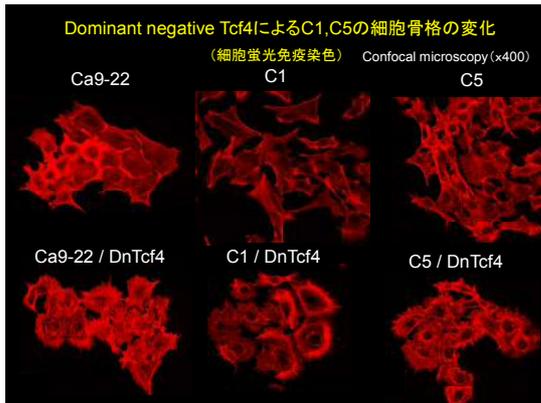
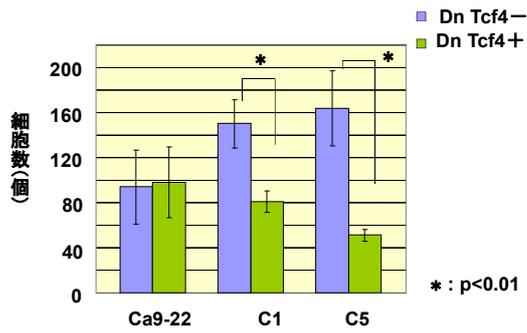
4. 研究成果

Rho family 分子の阻害剤 C. difficile toxin B を使用して、transwell chamber assay を行ったところ、C1、C5 の遊走能の亢進が抑制された。



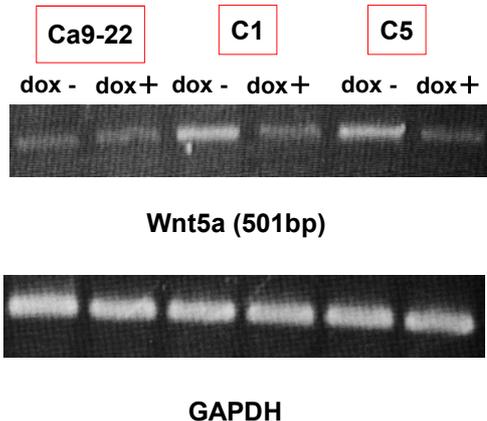
Dominant negative Tcf4 を遺伝子導入し、C1、C5 の TCF/Lef の転写活性は抑制すると、C1、C5 の遊走能の亢進は減弱し、細胞形態は

丸みを帯び、ストレスファイバーの伸展が抑制された。



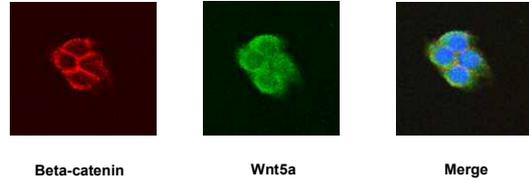
以上より、beta-catenin の細胞内集積による遊走能の亢進はbeta-catenin経路のTCF/Lefの転写活性化とPCP経路のRho family分子の活性化が寄与していることが明らかとなった。

これまでにbeta-catenin経路とPCP経路にクロストークがあることは報告されていない。そこでbeta-cateninの細胞内集積によりWnt自身の発現が増強し、frizzledやLRP5/6を介した経路からRho familyの活性化が起きた可能性を検討するためにC1、C5における各Wntの発現を半定量RT-PCRで検討したところ、Ca9-22に比してWnt5aの発現増強が認められた。またC1、C5にドキシサイクリンを作用させ、変異型beta-catenin遺伝子の発現を抑制すると、Wnt5aの発現量は減少した。



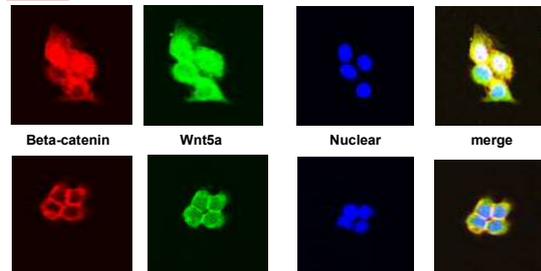
細胞蛍光免疫染色でもC1,C5におけるWnt5aの発現が亢進し、ドキシサイクリンを作用させると、その発現は抑制された。

Ca9-22



Confocal microscopy (x200)

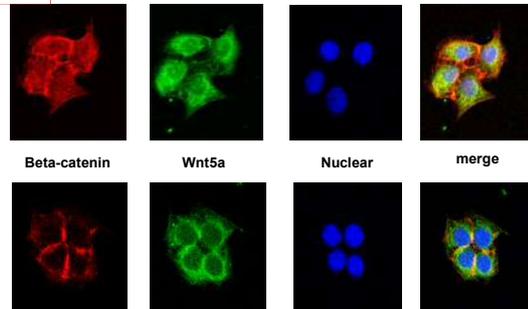
C1



C1 Dox +

Confocal microscopy (x200)

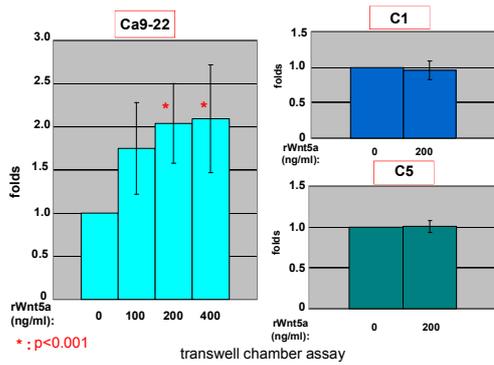
C5



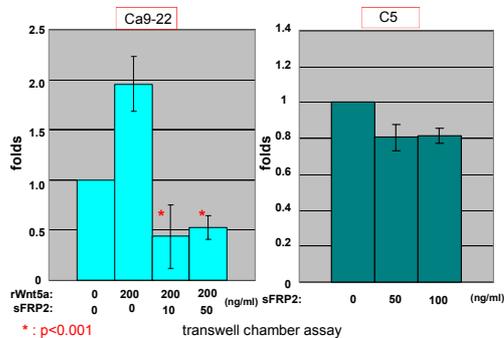
C5 Dox +

Confocal microscopy (x200)

以上よりC1、C5ではWnt5aの発現が増強していることが明らかとなった。このWnt5aは、FrizzledからDvlへのシグナルを介してPCP経路やPKC経路を活性化し、胃癌細胞の遊走能を亢進させることが報告されている。そこでWnt5aがC1、C5の遊走能の亢進に関与しているかを検討するために、Ca9-22、C1、C5にrWnt5aを作用させ、transwell chamber assayを行ったところ、Ca9-22はrWnt5aの濃度依存性に遊走能が亢進したが、C1、C5では遊走能の亢進は認められなかった。



さらに Wnt シグナルの阻害剤である sFRP2 を作用させ transwell chamber assay を行ったところ、rWnt5a の作用によって亢進した Ca9-22 の遊走能は抑制された。同様に sFRP2 は C5 の遊走能を抑制する傾向を示した。



つまり、beta-catenin の細胞内集積は beta-catenin 経路の TCF/Lef の転写活性化と PCP 経路の Rho family 分子の活性化を引き起こし、口腔扁平上皮癌の遊走能を亢進させた。Wnt5a は、この遊走能の亢進に関与し、2 つの経路を結びつける可能性の因子の一つであることが予想された。

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 2 件)

① Masakazu Hamada, Tetsuei Miki, Ken Wakabayashi, Soichi Iwai, Atsuko Yonekawa, Yoshiaki Yura. Combinational effect of a geranylgeranyltransferase-I inhibitor and PKC inhibitor on human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol.* 印刷中, 2013.

② 岩井聡一, 米川敦子, 原田知恵, 濱田正和, 片桐渉, 由良義明 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能と遊走能における Wnt-beta-catenin 経路の関与. *日本口腔外科学会雑誌* 57(10): 533-541, 2011. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① Atsuko Niki-Yonekawa, Soichi Iwai, Yoshihiro Morita, Yoshiaki Yura The role of Wnt signaling pathway in the migration of oral squamous cell carcinoma cells. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. February 23, 2013. Hyatt Regency Maui Maui, HI.

② 森田祥弘, 米川敦子, 岩井聡一, 大亦哲司, 森田展雄, 由良義明 腫瘍リンパ管新生における細胞外マトリックスの役割. 第 30 回 日本口腔腫瘍学会 2013. 1. 19-20 東京

③ 竹下彰範, 岩井聡一, 仁木敦子, 森田祥弘, 濱田正和, 奥長秀介, 由良義明 口腔扁平上皮癌の細胞運動能に対する TGF-beta の影響. 第 49 回 日本口腔組織培養学会学術大会 2012. 11. 17 広島

④ 森田祥弘, 米川敦子, 岩井聡一, 小林和代, 森田展男, 由良義明 Fibronectin は VEGF-C の発現を介してリンパ節転移を制御する. 第 57 回 日本口腔外科学会総会学術大会 2012. 10. 20 横浜

⑤ 竹下彰範, 岩井聡一, 仁木敦子, 森田祥弘, 濱田正和, 飯井孝年, 奥長秀介, 中澤光博, 由良義明 口腔扁平上皮癌の転移を司る細胞運動能に対する TGF-beta の影響. 第 57 回 日本口腔外科学会総会学術大会 2012. 10. 19 横浜

⑥ 森田祥弘, 竹下彰範, 米川敦子, 新谷素子, 岩井聡一, 由良義明 ヒト口腔扁平上皮癌のリンパ節転移における上皮間葉転換マーカーの検討. 第 66 回 日本口腔科学会学術集会 2012. 5. 17 広島

⑦ 竹下彰範, 岩井聡一, 米川敦子, 森田祥弘, 濱田正和, 若林健, 飯井孝年, 奥長秀介, 由良義明 口腔扁平上皮癌の運動能における Wnt5b の関与. 第 66 回 日本口腔科学会学術集会 2012. 5. 17 広島

⑧ Masakazu Hamada, Ken Wakabayashi, Soichi Iwai, Atsuko Yonekawa, Yoshiaki Yura Involvement of ROS in endonuclease G-mediated death of oral squamous cell carcinoma cells by PKC inhibitor safinol. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012. 9. 20 札幌

⑨ Masakazu Hamada, Soichi Iwai, Atsuko Yonekawa, Yoshihiro Morita, Yoshiaki Yura Combinational effect of Geranylgeranyl Transferase-I inhibitor GGTI-298 and PKC Inhibitor Safinol on Human Oral Squamous Cell Carcinoma. 第 70 回 日本癌学会学術集会 2011. 10. 3 名古屋

⑩ 飯井孝年, 高橋元, 若林健, 奥長秀介, 濱田正和, 米川敦子, 岩井聡一, 由良義明

マウス扁平上皮癌に対する変異型単純ヘルペスウイルスの抗腫瘍効果. 第 48 回日本口腔組織培養学会学術集会 2011. 11. 19 浦安

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米川 敦子 (YONEKAWA ATSUKO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：70600914