

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 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792399

研究課題名（和文） 口腔癌細胞における EMT マーカーとしての Zyxin の発現および機能について

研究課題名（英文） Functional analysis of Zyxin in cell migration and invasive potential of oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

瀬川 英美 (SEGAWA EMI)

兵庫医科大学・医学部・研究生（研究員）

研究者番号：00553778

研究成果の概要（和文）：Actin 重合促進タンパクである Zyxin は、アクチン重合と再構成を促進することにより、癌細胞自身の形態や運動性を変化させることから EMT への関与が示唆されている。本研究は 8 種類の口腔ヒト扁平上皮癌培養細胞を形態別に分類し、EMT 関連遺伝子および Zyxin の発現と細胞増殖能、運動能および浸潤能の関連について解析することを目的とした。

研究成果の概要（英文）：Zyxin is an evolutionarily conserved protein that has been implicated in the regulation of actin assembly and is mainly located at focal adhesions. However, the biological roles of Zyxin in cancer cells are incompletely understood. We analyzed the functions of Zyxin in cell migration and the invasive potential of OSCC.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

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：zyxin

1. 研究開始当初の背景

(1) Zyxin は、アクチン重合および再構成を促進することにより細胞の形態を変化させることから EMT との関与が示唆されている。

(2) 口腔ヒト扁平上皮培養癌細胞 8 種類を形態別に分類し、EMT 関連遺伝子および Zyxin の発現について検討したところ、細胞の形態が敷石状から紡錘形に変化するにつれて、上皮系マーカーである E-cadherin の発現が抑制され、間葉系マーカーである N-cadherin の発現が上昇することが確認された。

(3) さらに、形態が紡錘形に移行するにつれて Zyxin の発現が上昇することを確認した。

2. 研究の目的

(1) 上皮・間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) は、密に結合している上皮細胞が極性を失って運動性の高い間葉系細胞の形質を獲得する現象であり、癌細胞の浸潤、転移との関連性が注目されている。

(2) 上皮細胞は、tight junction、adherence junction および desmosome などの細胞間接着構造を介して互いに結合しており、このうち adherence junction では cadherin が互いに結合して actin と共に接着構造を構成している。

(3) Actin 重合促進タンパクである Zyxin

は、アクチン重合と再構成を促進することにより、癌細胞自身の形態や運動性を変化させることから、EMT への関与が示唆されている。

(4) 本研究は8種類の口腔扁平上皮癌培養細胞を形態別に分類し、EMT 関連遺伝子および Zyxin の発現と細胞増殖能、運動能、浸潤能の関連について解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 8種類の浸潤様式の異なる口腔扁平上皮癌由来培養細胞株（上皮型：SCCKN, HSC-2, OSC-20, HSC-3, SCC25, OSC-19, 紡錘型：HOC-313, TSU）を使用し、各細胞における E-cadherin, N-cadherin, Zyxin の発現を western blot 法にて検討した。

(2) Zyxin 高発現株である紡錘型形態である HOC-313 を用いて Zyxin の siRNA 処理を行い、Zyxin family members (lipoma preferred partner, LPP; thyroid receptor-interacting protein-6, TRIP-6) の発現を western blot 法、細胞増殖能を cell count 法、運動能を scratch assay, 浸潤能を invasion assay にてそれぞれ検討した。さらに、siRNA 処理による Zyxin 発現の変化を免疫細胞染色にて観察した。

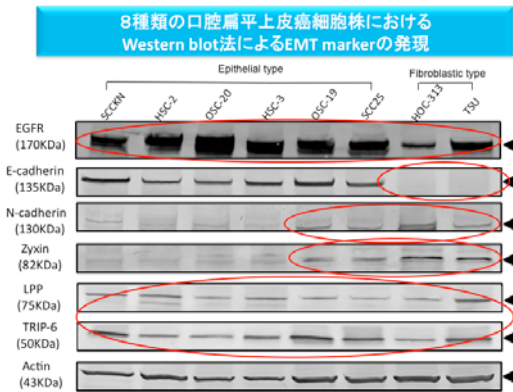
(3) siRNA 処理した HOC-313 における apoptosis の有無を ssDNA Apoptosis ELISA Kit を用いて検討し、細胞周期をフローサイトメーターにて検討した。

(4) siRNA 処理した HOC-313 において、actin 再構成による細胞骨格の変化に強く関与する Rho family (RhoA, Rac-1, CDC42) の発現を western blot 法にて検討した。

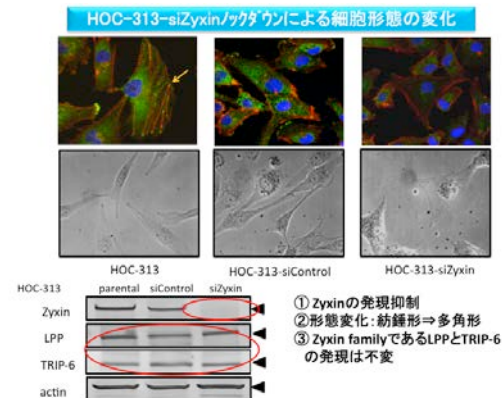
(5) Rac inhibitor (EHT1864) 処理後の Zyxin の発現量を western blot 法および RT-PCR にて検討した。

4. 研究成果

(1) 8種類の口腔扁平上皮癌細胞株における EMT マーカーの検討では、上皮系マーカーである E-cadherin の発現は上皮型の細胞では認められたが、紡錘型の細胞では認められなかった。一方、間葉系マーカーである N-cadherin の発現は紡錘型の細胞において上昇が認められ細胞接着が減少し上皮としての性質が失われることが確認された。また、形態が紡錘型の細胞に移行するにつれて Zyxin の発現が上昇したが Zyxin family である LPP, TRIP-6 の発現は変化しなかった。

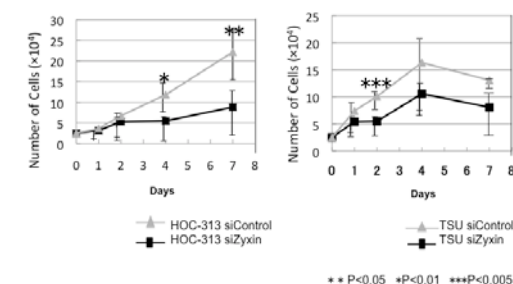


(2) Zyxin 高発現株である HOC-313 に siRNA 処理したところ、細胞の形態が紡錘形から多角形へと変化し、adhesion plaques に局在していた Zyxin の発現が低下した。さらに、紡錘型扁平上皮癌細胞の増殖能、運動能および浸潤能のすべてが siRNA 処理により有意に抑制された。

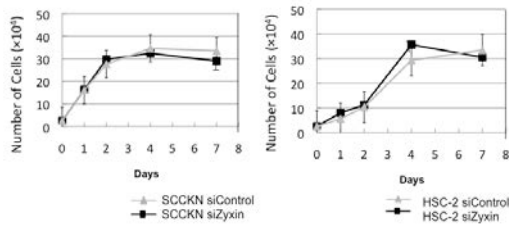


(3) siRNA 処理した HOC-313 において、apoptosis の増加および細胞周期の変化は認められなかった。

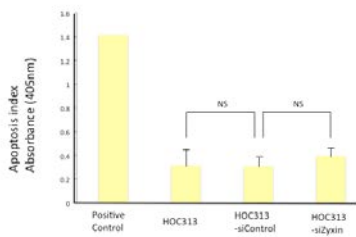
siZyxinノックダウン後のFibroblastic typeの増殖曲線



siZyxinノックダウン後のEpithelial typeの増殖曲線

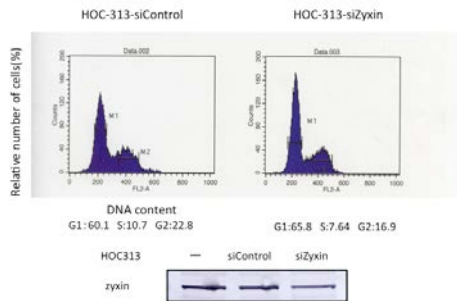


HOC-313-siZyxinノックダウン後のApoptosis



siRNA処理したHOC-313において、apoptosisは認められなかった。

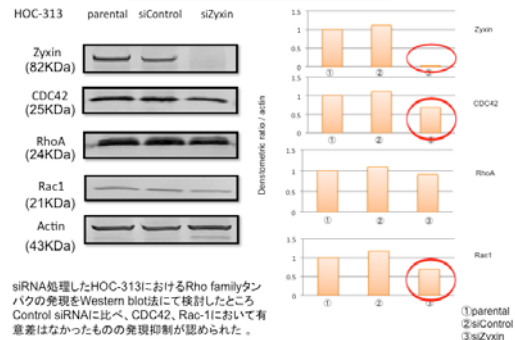
HOC-313-siZyxinノックダウン後のCell cycle



siRNA処理したHOC-313において、細胞周期は止まっていなかった。

(4) siRNA 処理した HOC-313 における Rho family タンパクの発現を検討したところ Control siRNA に比べ、CDC42, Rac-1 において有意差はなかったものの発現抑制が認められた。

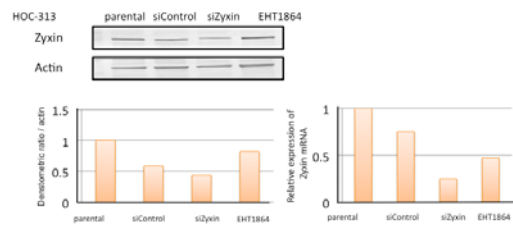
Western blot法による Rho familyの発現



siRNA処理したHOC-313におけるRho familyタンパクの発現をWestern blot法にて検討したところ Control siRNAに比べ、CDC42, Rac-1において有意差はなかったものの発現抑制が認められた。

(5) HOC-313 に Rac-1 inhibitor を作用させると、Zyxin の発現量が western blot で軽度減少し RT-PCR では 1/2 に減少していることが確認された。

HOC-313に Rac-1 inhibitor (EHT1864)作用後の Zyxinの発現



HOC-313にRac-1 inhibitorを作用させると、Zyxinの発現量がwestern blotで軽度減少した。RT-PCRでは1/2に減少していることが確認された。

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1件)

1. Functional analysis of Zyxin in cell migration and invasive potential of oral squamous cell carcinoma cells. Yamamura M, Noguchi K, Nakano Y, Segawa E et al. Int J Oncol 査読有, 2013 Mar;42(3):873-80. DOI: 10.3892/ijo.2013.1761.

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 口腔扁平上皮癌細胞における EMTmaker
としての Zyxin の発現 日本癌学会学術総会
2011 年 10 月 5 日 名古屋国際会議場(愛知)
瀬川英美

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川 英美 (SEGAWA EMI)

兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)

研究者番号：00553778