

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791764

研究課題名(和文) 頭頸部癌における ESRP 分子の発現と分子細胞学的意義と臨床応用

研究課題名(英文) Functional characterization of ESRP1 and 2 in HNSCC.

## 研究代表者

石井 裕貴 (ISHII, Hiroki)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：40568250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：ESRP1/2はEMT関連RNAスプライシングを調節する因子であり、今回我々は頭頸部扁平上皮癌における ESRP1/2の機能解析および発がんおよび浸潤・転移過程における発現プロファイルを調べた。ESRP1/2は頭頸部正常扁平上皮内ではほとんど発現していなかったが、異形成、浸潤癌において高発現していたが、間質への浸潤先端部分においてESRP1/2発現は低下しており、発現の可塑性が存在していた。さらに頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて機能解析を行ったところ、ESRP1はRac1b発現を抑制する事で運動能を抑制し、ESRP2はEMT関連転写因子の発現を抑制する事で運動能を抑制している事を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：ESRP1 (epithelial splicing regulatory protein 1) and ESRP2 regulate alternative splicing events associated with EMT, and these proteins are down-regulated during EMT. We examined that expression of both ESRP1 and ESRP2 is plastic. During HNSCC carcinogenesis, both are up-regulated relative to their levels in normal epithelium but down-regulated in invasive fronts into stroma. In HNSCC cell lines, ESRP1 and ESRP2 suppress cell motility of HNSCC via distinct mechanisms: knockdown of ESRP1 affects the dynamics of the actin cytoskeleton via inducing Rac1b, whereas knockdown of ESRP2 represses cell-cell adhesion through increased expression of EMT-associated transcription factors. Down-regulation of ESRP1 and ESRP2 is thus closely associated with a motile phenotype of cancer cells

研究分野：頭頸部外科、腫瘍生物学

キーワード：ESRP1/2 EMT RNA splicing Rac1b dEF1/SIP1

## 1. 研究開始当初の背景

EMT 過程には(1) 転写因子による調節機構、(2) RNA スプライシングによる調節機構、(3) non-coding RNA を介した調節機構、(4) 翻訳後調節機構の制御システムが提唱されている。これらの調節機構の中で、上皮細胞への EGF、TGF- $\beta$ 、FGF など増殖因子の刺激が Snail family や ZEB family、Twist といった EMT 関連転写因子が増加し、上皮形質を抑制し、間葉細胞様形質を獲得する。しかしながら転写因子以外の調節機構についてまだ解明されていない点が多い。

選択的 RNA スプライシングは、DNA の転写過程において intron を除去し特定の exon を挿入または除去して exon 同士を結合する過程のことであり、ヒトの遺伝子の 95%以上で選択的 RNA スプライシングが起こっている。この過程において生成される産物の構造や機能に多様性が生じる。頭頸部がん組織内において非常に多くの選択的 RNA スプライシングが行われていることが明らかになり、その中に EMT 関連の選択的 RNA スプライシングが存在することがわかってきた。EMT 過程を RNA スプライシング機能で調節する因子の中に ESRP1、ESRP2、RBFOX2 があり ESRP1/2 は上皮細胞特異的なスプライシングアイソフォームを維持することが明らかになっており、EMT の状態を決定づけることができる。ESRP1 および ESRP2 は RNA recognition motif family of protein である。ESRP1 および ESRP2 は UGGUGG rich モチーフに結合しやすく、FGFR2 はじめ CD44、MENA など 148 個の選択的 RNA スプライシングを調節している。乳がん細胞において ESRP1 発現抑制にて間葉系性質が強くなり EMT が維持されることを報告している<sup>(11)</sup>。ESRP1 には、がんの運動能を抑制する機能があることが示唆されている一方で、乳がんにおいて ESRP1 発現が CD44 variant アイソフォームを増加させてシスチン/グルタミン

酸トランスポーター依存的に活性酸素種に対しての抵抗性が生じ、肺転移を増加するという報告もある。

## 2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮がんの発がん過程および浸潤・転移過程における、ESRP1/2 の頭頸部扁平上皮組織内での発現プロファイルはほとんどわかっておらず、またその機能と臨床データとの関連について一定の見解が得られていない。さらに ESRP2 発現と気の解析については未だほとんど解明されていない。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株と培養条件

本研究では7種類のヒト頭頸部扁平上皮がん細胞株とヒト子宮頸がん細胞株 (HeLa 細胞) およびヒト乳腺がん細胞株 (T47D 細胞) をそれぞれ1つずつ使用した。頭頸部がん細胞株は SAS 細胞 (口腔がん由来)、HSC2 細胞 (口腔がん由来)、HSC3 細胞 (口腔がん由来)、HSC4 細胞 (口腔がん由来)、Ca9-22 細胞 (歯肉がん由来)、KUMA-1 細胞 (上顎がん由来)、Gun1 細胞 (下咽頭がん由来) である。

### (2) 免疫組織染色

ヒト手術検体をホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切してスライドガラスを作製する。抗原賦活に関しては 10 mM クエン酸バッファ (pH6) にて 120 分、10-15 分オートクレーブした。次に 3% 過酸化水素水で内在性ペルオキシダーゼ活性の除去を行った後、1% BSA でブロッキング、一晩 4℃ で一次抗体を反応させた。2次抗体 (ChemMate EnVision kit/HRP DAB) を室温で 4 時間反応させて DAB 基質で発色。その後 1% PBS で 2 回洗浄した後ヘマトキシリン染色にて対比染色し、脱水、封入して検鏡した。ヒト手術検体の使用は山梨大学倫理委員会の承認を受けた。

### (3) ウェスタンブロット法

細胞を lysis buffer (20mM Tris-HCl pH 7.4 + 5 mM EDTA + 150 mM NaCl+1 % NP-40+1% aprotinin+1 mM PMSF)にて氷上融解、SDS-PAGE にてタンパク分離を行い、PVDF 膜にプロットングし、TBS-T 溶液で希釈した 5 %スキムミルクにてブロッキングした。その後一次抗体を一晩 4 下で反応させて、二次抗体 ( mouse-IgG-HRP, rabbit-IgG-HRP ) を室温 1 時間反応させてバンドを検出した。

### (4) siRNA を用いたノックダウンアッセイ

6 ウェルに  $5 \times 10^5$  個の細胞を接着させて後に Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (invitrogen)を使って siRNA を導入した。siRNA の使用濃度は 5nM とした。

### (5) Conventional RT-PCR 法および Realtime RT-PCR 法

Total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて細胞株から抽出した。Total RNA 2 $\mu$ g を SuperScript VILO cDNA synthesis Kit (Invitrogen)を用いて逆転写反応させた。

#### 半定量 RT-PCR 法

LA Taq polymerase (Takara)を用いて行った。PCR 反応条件は使用説明書で推奨されている条件を用いた。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルを用いて分離した。Internal control として $\beta$ -actin 遺伝子を使用した。

#### 定量 RT-PCR 法

SYBR Green を用いて ABI7300 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) にて RT-PCR を行った。GAPDH 遺伝子を housekeeping gene として  $\Delta\Delta C_t$  法で解析を行った。

### (6) Wound-healing assay

6 ウェルプレートに細胞を培養し、コンフルエントにする。10 $\mu$ l チップを用いてスクラッチし、10 カ所でスクラッチ幅を測定し、スクラッチ直後と 12 時間後の距離を比較した。

## 4 . 研究成果

### <頭頸部扁平上皮がん組織中の ESRP1 および ESRP2 の発現プロファイル>

頭頸部がんの発がん過程における ESRP1/2 発現プロファイルをヒト正常口腔扁平上皮、異形上皮、進行口腔がん組織を用いて免疫組織染色にて調べた。ヒト口腔正常扁平上皮において、ESRP1/2タンパクともに非常に弱く発現し(図1A)、異型度が軽度から高度になるにつれて陽性細胞の割合が多くなっていった(図1B)。

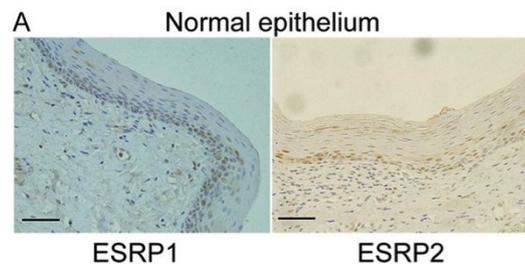


図1A

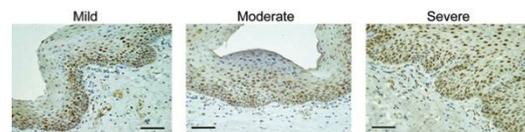


図1B

進行口腔扁平上皮がん組織における ESRP2 発現に関しても、ESRP1と同様の染色結果であった(Fig. 1C)。

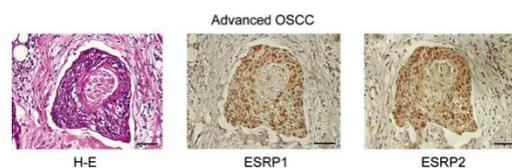


図1C

以上より、頭頸部がんにおいて正常扁平上皮から浸潤がん組織への発がん過程において ESRP1および ESRP2発現は上昇してることがわかった。続いて間質組織に浸潤傾向を示すがん細胞において ESRP1および ESRP2 発現および E-cadherin がどのように変化するのか明らかにするために、今回口腔扁平上皮がん浸潤先端における各タンパク質の発現を調べた。ESRP1および ESRP2発現が低下している浸潤先端において、細胞間ジャンクシヨ

ンに位置するE-cadherin発現は低下していた(図1D)。

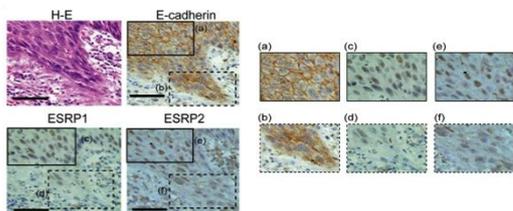


図1D

図1のすべての図はHiroki Ishii et al. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(40):27386-99.より引用

頭頸部がん浸潤先端におけるがん細胞の運動能獲得過程において、ESRP1およびESRP2によるEMT調節が、がん細胞の運動能獲得を抑制している可能性が示唆された。また頭頸部がん細胞の浸潤・転移過程におけるESRP1/2発現は可塑的であることが示唆された。

<頭頸部がん細胞株を用いたESRP1/2の機能解析>

ヒト頭頸部扁平上皮がん細胞株を用いてin vitroでのESRP1およびESRP2の運動能抑制作用を調べた。はじめにSAS細胞、HSC2細胞、HSC3細胞、HSC4細胞、Ca9-22細胞、Gun1細胞およびKUMA1細胞の7種類の頭頸部扁平上皮がん細胞株におけるESRP1およびESRP2発現プロファイルをmRNAレベルおよびタンパクレベルで調べた(図2A, B)。ESRP1またはESRP2に対するsiRNAを2種類ずつ用いて、ESRP1/2高発現株であるSAS細胞とHSC4細胞においてそれぞれの遺伝子をノックダウンした(図2C)。

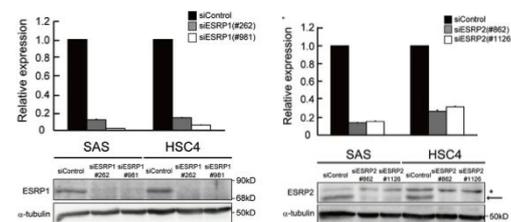
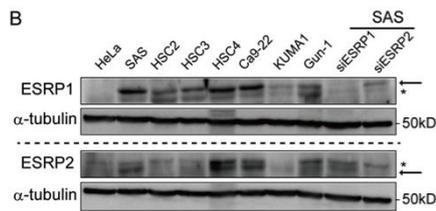
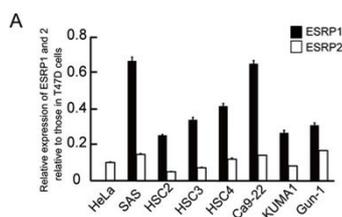


図2C

図2のすべての図はHiroki Ishii et al. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(40):27386-99.より引用

wound healing assayで、コントロールに比べてESRP1とESRP2それぞれ、または両方を発現抑制した細胞では運動能が有意に上昇した。これらの結果からESRP1またはESRP2は頭頸部がん細胞の運動能抑制作用があることが示唆された(図3A)。

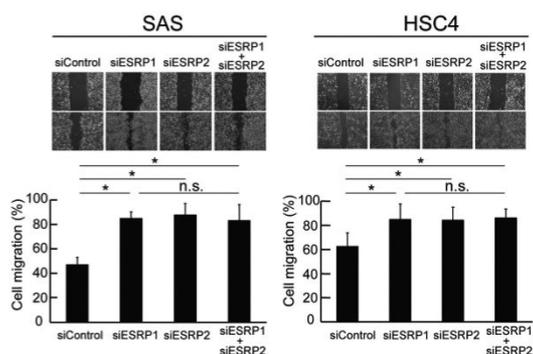


図3A

続いて運動能を制御するメカニズムについて解析を進めたところ、SAS細胞およびHSC4細胞においてESRP1発現を抑制することでRac1b isoformの増加が見られた(図3B)。Wound healing assayにて運動能を調べたところ、SAS細胞およびHSC4細胞におい

て ESRP1 発現抑制によって有意に上昇した運動能は Rac1b 発現を抑制することでキャンセルされた(図 3C)。以上から ESRP1 は RNA スプライシングを介して Rac1b によるアクチン動態の変化を抑制し、頭頸部がん細胞の運動能を低下させていることがわかった。

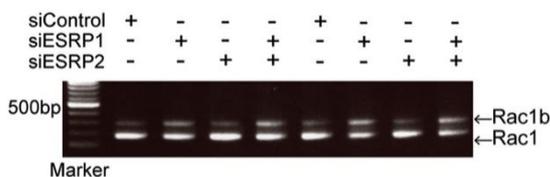


図 3B

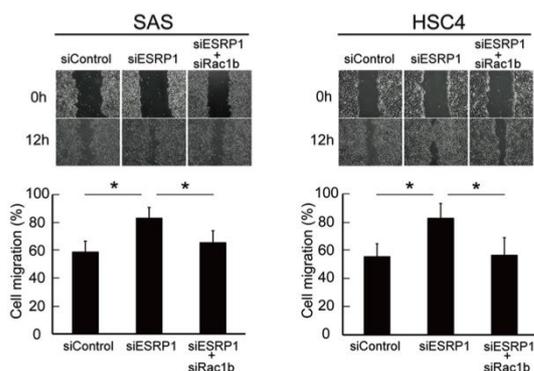


図 3C

図3のすべての図はHiroki Ishii et al. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(40):27386-99.より引用  
ESRP2 発現抑制によってこれらの転写因子の発現が変化するかどうかを調べた。図 4A に示すように ESRP2 発現抑制された SAS 細胞においては $\delta$ EF1 と SIP1 mRNA が、HSC4 細胞においては SIP1 mRNA が有意に上昇しており、ESRP2 発現抑制による E-cadherin 低下に $\delta$ EF1 と SIP1 発現変化が関与していることがわかった。

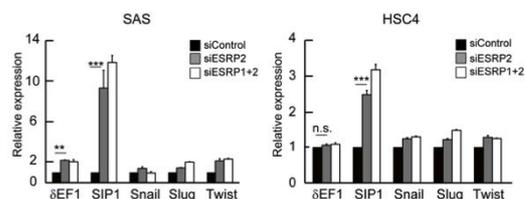


図 4A

続いて ESRP2 発現抑制にて上昇した運動能は $\delta$ EF1/SIP1 発現抑制することで運動能が有意にキャンセルされた(図 4B)。

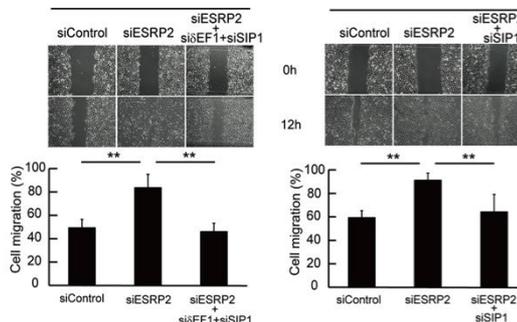


図4B

図4のすべての図はHiroki Ishii et al. *J. Biol.*

*Chem.* 2014; 289(40):27386-99.より引用

これらから ESRP2 は EMT 関連転写因子を抑制することでがん細胞の運動能を抑制していることを解明できた。

## 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 5 件)

1. Fukagawa, A, Ishii H., Miyazawa K., Saitoh M.  $\delta$ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Med.* 2015; 4(1): 125-35 (査読あり)
2. Ishii H., Saitoh M., Sakamoto K., Kondo T., Katoh R., Motizuki M., Tanaka S., Masuyama K., Miyazawa K. Epithelial splicing regulatory protein 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) suppress cancer cell motility via different mechanisms. *J Biol Chem.* 2014; 289(40): 27386-99. (査読あり)
3. Tanaka S., Hirota T., Kamijo A., Ishii H., Hatsushika K., Fujieda S., Ishitoya J., Masuyama K., Tamari M. Lung functions of Japanese patients with chronic rhinosinusitis who underwent endoscopic sinus surgery. *Allergol. Int.* 2014 63(1):27-35. (査読あり)
4. Chikamatsu K., Ishii H., Murata T., Sakakura K., Shino M., Toyoda M., Takahashi K., Masuyama K. Alternation of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.* 2013 104(11):1468-75. (査読あり)
5. Chikamatsu K., Ishii H., Takahashi G.,

Okamoto A., Moriyama M., Sakakura K., Masuyama K. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck*. 2012 34(3):336-43. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. AHNS Translational Research Meeting 2015, ESRP1 suppresses tumor initiation by down-regulation of Rac1b in HNSCC. Ishii H., Ashizawa K., Masuyama K. ボストン USA、ポスター発表、2015/4/21-23
2. 5<sup>th</sup> IFHNOS World Congress 2014, Down-regulation of ESRP1 triggers cell invasion through de-repression of Rac1b in HNSCC. Ishii H., Masuyama K. ニューヨーク USA、ポスター発表、2014/7/26-30
3. TGF- $\beta$  meeting 2014、RNA splicing factors, ESRP1 and ESRP2, differently suppress a cell motile phenotype of cancer. Ishii H., Saitoh M., Miyazawa K. ライデン オランダ、ポスター発表 2014/5/8-10
4. TGF- $\beta$  meeting 2013、Regulation of ESRP expression in head and neck squamous cell carcinoma. Ishii H., Saitoh M., Miyazawa K. ウプサラ スウェーデン、ポスター発表 2013/5/30-6/1

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

石井 裕貴 (ISHII, Hiroki)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：40568250