

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861934

研究課題名(和文) TGF-beta/Smadシグナルを標的とした口腔扁平上皮癌転移メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of TGF-beta/Smad signal pathway involved in metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

米川 敦子 (ATSUKO, YONEKAWA)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：70600914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌頸部リンパ節高転移株であるSAS-LM8とその親株SAS-GFPにTGF- $\beta$ 刺激を行ったところ、両細胞の細胞形態や細胞間接着、細胞増殖能に変化はなかったが両細胞の遊走能及び浸潤能が亢進した。両細胞ともにN-cadherinとVimentinの発現が増強し、細胞周囲に仮足様突起の進展を認め、間葉移行の傾向を示した。またWnt5aの発現に変化はなかったが、Wnt5bの発現が増強した。TGF- $\beta$ は口腔扁平上皮癌頸部リンパ節高転移株に対して、EMTを介して遊走能及び浸潤能を亢進させ、その現象にはWnt5bが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of TGF- $\beta$  on the highly lymph nodes metastatic oral squamous cell carcinoma cell line, LM8 and its parental cell, SAS-GFP. We found that TGF- $\beta$  didn't mediate their morphological change, cell to cell contact and growth. But, TGF- $\beta$  induced increase in their migration and invasiveness. Epithelial-mesenchymal transition was inclined to be induced through up regulation of N-cadherin and Vimentin and elongation of actin fiber in TGF- $\beta$  stimulated cells. Additionally, the expression of Wnt5b was elevated, not Wnt5a. Over all, these results suggest that TGF- $\beta$  could increase migration and invasion of highly lymph nodes metastatic oral squamous cell carcinoma cell through EMT, in which Wnt5b could be involved.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 頸部リンパ節転移 TGF- $\beta$  運動能 EMT

1. 研究開始当初の背景

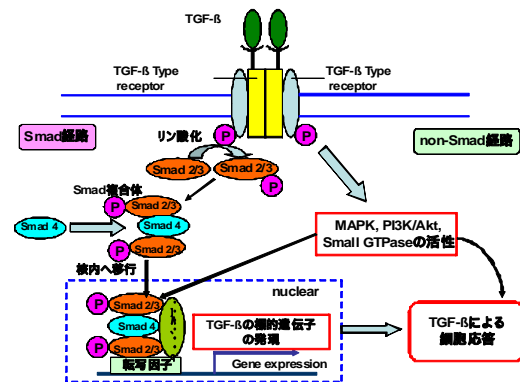
口腔扁平上皮癌は世界で6番目に多い癌であり、アメリカ合衆国では毎年36,540人が罹患している。現在までに口腔扁平上皮癌の診断や治療は進歩してきたにも関わらず、過去30年間で生存率は改善しておらず、その5年生存率は40-50%に過ぎない。口腔扁平上皮癌では頸部リンパ節への転移が多く認められるが、これがこの低い生存率の要因の一つである。しかしながら、口腔扁平上皮癌が頸部リンパ節へ転移するメカニズムはいまだ詳細に解明されていない。

一般的に癌細胞は、発生部位から基底膜を破って間質へ浸潤し、血管やリンパ管に侵入して全身に循環し、多臓器へ生着して転移巣を形成する。細胞間および基底膜間の接着により高分化な細胞集団を形成していた癌細胞は、それらの接着性を失い、細胞骨格を変化させることにより、運動能を獲得する。癌細胞の運動能の獲得には上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) が深く関連している。EMTは、上皮細胞が間葉系細胞の形質に転換するというプロセスであり、正常な発生時期に必須のメカニズムであるのみならず、腫瘍の浸潤性や転移能の獲得など、疾患でも重要な役割を果たしていると考えられている。EMTを獲得した癌細胞は、EMTの特徴であるE-cadherinなどの上皮系マーカーの発現低下や間葉系マーカーを上昇させ、細胞間接着の減弱、細胞形態の紡錘形変化や細胞極性の消失を引き起こすと同時にMMPなどを亢進させた結果、低分化型の形態となり、浸潤性の強い悪性度の高い癌細胞の特徴を持つようになる。実際、浸潤能が高い低分化型の癌細胞や、再発や転移した癌、また抗癌剤に耐性の癌細胞ではEMTを誘導する転写因子の発現が高く、高分化の癌ではこれらの転写因子の発現が低い。したがって、癌の悪性化とEMTを誘導する分子は非常に強い相関がある。これまでに研究代表者らは、口腔扁平上皮癌細胞におけるWnt/beta-catenin経路の活性がEMTを誘導し、口腔扁平上皮癌細胞の遊走能や浸潤能を亢進することを報告してきた。

このWntシグナル伝達経路とクロストークを持つと報告されているTGF-βもEMTを強力に誘導する因子の一つである。TGF-βは、発癌初期では強力な細胞増殖抑制作用によって癌抑制的に働くが、癌の進展とともに後期では逆に癌促進的に働き、癌の浸潤・転移に関与することが知られている。TGF-βシグナルの細胞内伝達経路は、Smad経路とnon-Smad経路がある(図1)。Smad経路では、TGF-βリガンドが細胞表面のⅡ型受容体・

Ⅱ型受容体に作用すると、Ⅱ型受容体によってⅡ型受容体がリン酸化され、その結果、Ⅱ型受容体上のセリン/スレオニンキナーゼが活性化され、細胞内伝達分子Smad2, Smad3がリン酸化される。リン酸化されたSmad2, Smad3はSmad4と結合して核内に移行し、その他の転写因子・転写共役因子と複合体を形成して標的遺伝子のプロモーター上に作用する。non-Smad経路では、TGF-βリガンドが受容体に作用すると、Smadを介さず、MAPK, PI3K/Akt, small GTPaseなどの経路が活性化することが知られている。TGF-βはSmad依存性、Smad非依存性シグナルを介して、E-cadherinの転写抑制因子の発現を誘導し、E-cadherinの発現を減弱させてEMTを引き起こすと考えられている。

(図1)



最近、口腔扁平上皮癌の病理組織学的検索において、リンパ節転移をおこした症例群やStage Ⅲ以上の病期が進んだ症例群で有意にTGF-βの発現が認められたと報告されており、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移やその進展にもTGF-βが寄与していることが考えられる。しかし、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移におけるTGF-βの影響についての研究は少ない。そこで、本研究では、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移におけるTGF-βの影響を解明するために口腔扁平上皮頸部リンパ節高転移株とその親株にTGF-βを添加して、実験を行った。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の予後や生存率の改善には頸部リンパ節転移を制御することが重要である。しかし口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移の分子生物学的メカニズムは未だ詳細に明らかとなっていない。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌頸部リンパ節高転移株を使用し、浸潤・転移を司る運動能に注目し、強力なEMT誘導因子であるTGF-βがその運動能に与える影響について検討する。TGF-βは様々な進行癌において癌促進因子

として働いており、口腔扁平上皮癌の転移にも寄与することが予想される。その点について解明することにより、TGF- $\beta$  シグナルを標的とした転移制御の治療の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

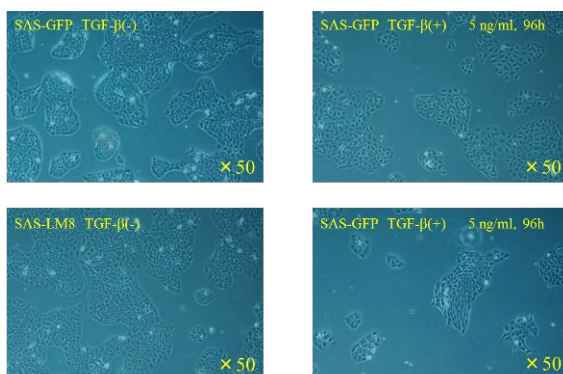
使用した細胞は森田らによって樹立されたヒト低分化型舌扁平上皮癌由来細胞株 SAS に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現ベクターを導入することによって得た SAS-GFP と、それを使用し、in vivo selection を 8 回繰り返すことで樹立された頸部リンパ節高転移株 SAS-LM8 である。竹下、岩井らは SAS-GFP と SAS-LM8 の細胞生物学的特性の解析を行い、SAS-LM8 が SAS-GFP より運動能が亢進していることを明らかにした。

さらに本研究では両細胞に TGF- $\beta$  刺激を行い、細胞形態、細胞増殖能、遊走能、浸潤能、EMT 関連遺伝子の発現について検討した。TGF- $\beta$  (Recombinant Human TGF- $\beta$  1, R&D) を 5ng/ml の濃度で培地に添加することにより細胞に作用させた。細胞増殖能は MTT assay で、細胞遊走能は transwell chamber assay, wound healing assay で、細胞浸潤能は matrigel transwell chamber assay で評価した。EMT 関連遺伝子の発現を RT-PCR で測定した。細胞免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

TGF- $\beta$  (Recombinant Human TGF- $\beta$  1, R&D) を 5ng/ml の濃度で 96 時間作用させ細胞形態の変化を観察した。SAS-GFP, SAS-LM8 はともに TGF- $\beta$  の有無による細胞形態の変化はなく、細胞間の接着も密を保っていた (図 2)。

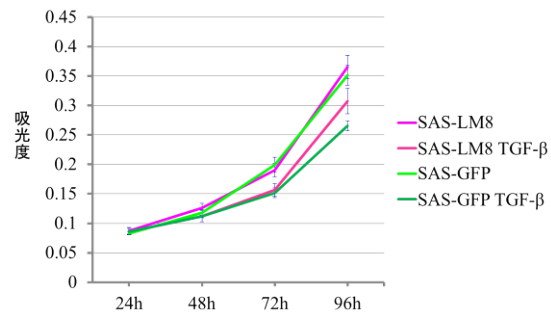
(図 2)



TGF- $\beta$  (Recombinant Human TGF- $\beta$  1, R&D) を 5ng/ml の濃度で 96 時間作用させ MTT assay により細胞増殖能の変化を評価した。TGF- $\beta$  による刺激により SAS-GFP, SAS-LM8 ともに 48 時間までは増殖能に差は認めない

が、それ以降は両細胞ともに増殖が抑制される傾向がみられた (図 3)。

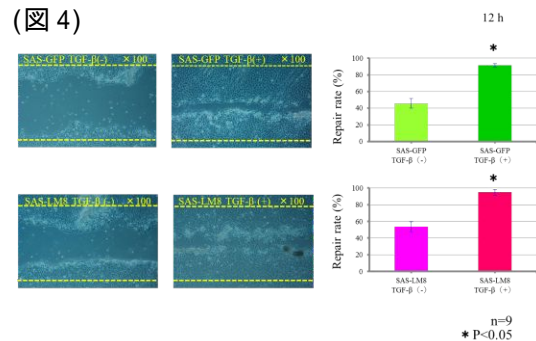
(図 3)



TGF- $\beta$  による両細胞の遊走能への関与を検討するため TGF- $\beta$  を 5ng/ml の濃度で 96 h 作用させ Wound healing assay と transwell chamber assay により検討した。

Wound healing assay では Wound 形成後 12 時間後の観察では、SAS-GFP, SAS-LM8 ともに TGF- $\beta$  で処理した細胞では細胞欠損部は辺縁から遊走した細胞でほぼ完全に修復されたが、TGF- $\beta$  で処理していない SAS-GFP では半分以上、TGF- $\beta$  で処理していない SAS-LM8 では半分程度、Wound の残存を認めた。Wound 形成後 12 時間の修復率の平均をグラフに表すと、TGF- $\beta$  で処理した SAS-GFP は 91.7%、TGF- $\beta$  で処理した SAS-LM8 は 94.9% の修復であったが、TGF- $\beta$  で処理していない SAS-GFP は 45.9%、TGF- $\beta$  で処理していない SAS-LM8 は 53.5% の修復しかみられず、TGF- $\beta$  処理より有意に修復率の亢進が認められた (図 4)。

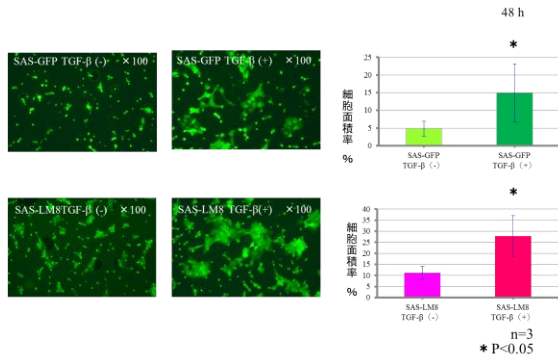
(図 4)



Wound migration assay では、実験開始から 48 時間後にメンブレンを通過した細胞のメンブレンに占める面積を計測し評価した。100 倍蛍光顕微鏡下にて 1 メンブレンに対し、無作為に選んだ 7 視野のメンブレンを通過した細胞の占める面積の平均を評価すると、TGF- $\beta$  未処理の SAS-GFP は 4.9%、TGF- $\beta$  処理した SAS-GFP は 14.9%、TGF- $\beta$  未処理の SAS-LM8 は 11.2%、TGF- $\beta$  処理した SAS-LM8 は 27.9%、と SAS-GFP, SAS-LM8 ともに TGF- $\beta$  により有意に遊走能の亢進を認めた (図 5)。

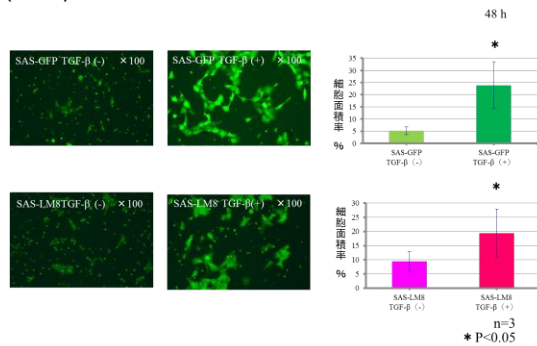
(図 5)





migration assay と同様に, invasion assay では, 実験開始から 48 時間後にメンブレンを通過した細胞のメンブレンに占める面積を計測し評価した. 100 倍蛍光顕微鏡下にて 1メンブレンに対し, 無作為に選んだ 7 視野のメンブレンを通過した細胞の占める面積の平均を評価すると, TGF- 未処理の SAS-GFP は 5.2%, TGF- 処理した SAS-GFP は 23.9%, TGF- 未処理の SAS-LM8 は 9.5%, TGF- 処理した SAS-LM8 は 19.5%, と SAS-GFP, SAS-LM8 とともに TGF- により有意に浸潤能の亢進を認めた (図 6).

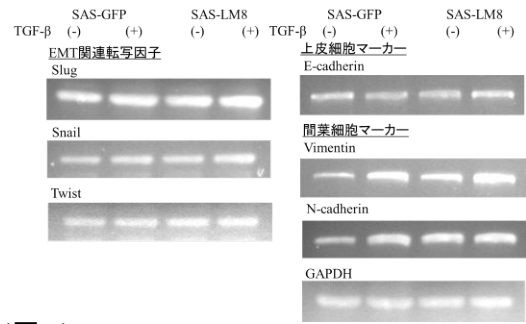
(図 6)



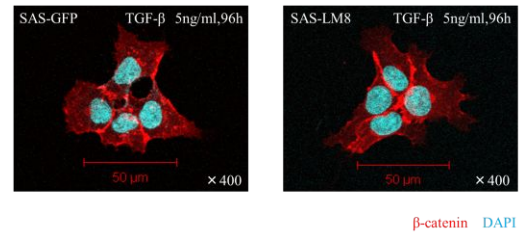
TGF- は EMT を誘導する代表的な因子の 1 つであり, Smad 依存的に E-カドヘリンの転写を抑制し, 細胞接着を低下させ運動性を亢進させるとされている. そこで TGF- を 5ng/ml の濃度で 96 時間作用させ EMT 関連遺伝子の発現変化につき RT-PCR により評価した. EMT 関連転写因子である Slug, Snail, Twist は TGF- 処理により大きな発現の変化は認めなかった. 上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現にも大きな変化はみられなかった. 間葉系細胞マーカーである N-cadherin, Vimentin の発現は TGF- 処理により, SAS-GFP, SAS-LM8 とともに亢進し間葉移行の傾向を認めた (図 7).

TGF- 処理による  $\beta$ -catenin の局在の変化の関与を検討するため, TGF- を 5ng/ml の濃度で 96 時間作用させ,  $\beta$ -カテニンの局在の変化をローダミンによる蛍光染色にて観察した.  $\beta$ -カテニンは細胞膜周囲と細胞質にみられ, TGF- による  $\beta$ -カテニンの局在に変化はみられなかった (図 8).

(図 7)

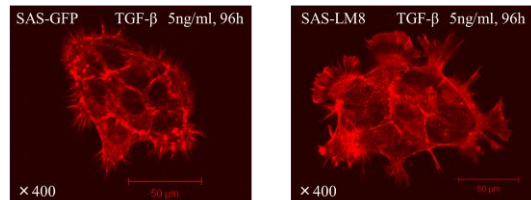


(図 8)



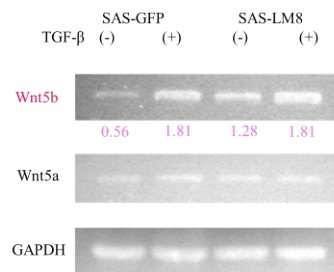
TGF- 処理により, SAS-GFP, SAS-LM8 とともに細胞遊走能, 浸潤能の亢進がみられた. そこで, TGF- を 5ng/ml の濃度で 96 時間作用させアクチン細胞骨格の変化をファロイジンによる蛍光染色にて観察した. TGF- 処理により SAS-LM8, SAS-GFP とともに細胞周囲の仮足様突起が大きく伸展しているのが観察された (図 10).

(図 9)



TGF- により EMT 関連遺伝子の発現に大きな変化は認められなかったが, 有意な運動能の亢進, アクチン染色による細胞周囲への仮足様突起の伸展亢進を認めたため, TGF- を 5ng/ml の濃度で 96 時間作用させ Wnt5b, Wnt5a の発現変化につき RT-PCR により評価した. TGF- 処理により SAS-GFP, SAS-LM8 とともに Wnt5b の発現の亢進を認めた. Wnt5a の発現には変化はみられなかった (図 11).

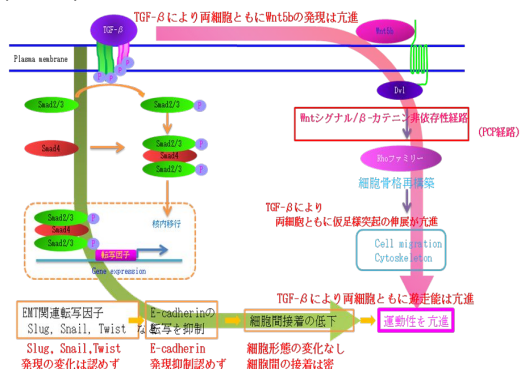
(図 10)



TGF- による, SAS-GFP, SAS-LM8 の細胞運動能の亢進には, Slug, Snail, Twist の発現

亢進により, E-cadherin の発現抑制を誘導し細胞間接着の低下による運動能の亢進の関与は低いと考えられ, 何らかの経路により TGF- $\beta$  が直接的, あるいは間接的に Wnt5b の発現を亢進し, その結果, Wnt シグナル/ $\beta$ -カテニン非依存経路を介して, 細胞運動能を亢進させている可能性が示唆された(図 11)。

(図 11)



## 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. Takeshita A, Iwai S, Morita Y, Niki-Yonekawa A, Hamada M, Yura Y.

Wnt5b promotes the cell motility essential for metastasis of oral squamous cell carcinoma through active Cdc42 and Rho A. International Journal of Oncology 査読有 2014; 44: 59-68. doi: 10.3892/ijo.2013.2172

[学会発表](計 7 件)

1. 岸本聡子、森田祥弘、竹下彰範、仁木敦子、多田晋也、濱田正和、岩井聡一

Wnt5b を介する口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換ならびに癌幹細胞様形質の誘導 第 61 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 2016 年 11 月 25 日-27 日 幕張メッセ 千葉県千葉市

2. 岸本聡子、岩井聡一、竹下彰範、仁木敦子、多田晋也、濱田正和、由良義明

Wnt シグナルを介する口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換ならびに癌幹細胞様形質の誘導 第 52 回 口腔組織培養学会 2015 年 11 月 21 日 九州大学 福岡県福岡市

3. 岸本聡子、岩井聡一、森田祥弘、竹下彰範、仁木敦子、多田晋也、由良義明

Wnt5b によるヒト口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換ならびに癌幹細胞様形質の誘導 第 60 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学

術大会 2015 年 10 月 16 日-18 日 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市

4. 森田祥弘、岩上隆紀、仁木敦子、楠山友紀子、岩井聡一、大亦哲司、森田展雄、由良義明

Fibronectin は Focal adhesion kinase のリン酸化を介して腫瘍リンパ管新生を促進する 第 60 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 2015 年 10 月 16 日-18 日 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市

5. 岸本聡子、岩井聡一、森田祥弘、竹下彰範、仁木敦子、多田晋也、由良義明

ヒト口腔扁平上皮癌における Wnt と上皮間葉転換の関連についての検討 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2015 年 5 月 13 日-15 日 大阪国際会議場 大阪府大阪市

6. 竹下彰範、岩井聡一、仁木-米川敦子、森田祥弘、濱田正和、岩上隆紀、由良義明

Wnt5b は口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能を亢進する 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会 2015 年 11 月 23 日-24 日 日本歯科大学生命歯学部 東京都千代田区

7. 竹下彰範、岩井聡一、仁木-米川敦子、森田祥弘、濱田正和、奥長秀介、由良義明

Wnt5b は Cdc42 と RhoA を介して口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能を亢進する 第 58 回 日本口腔外科学会総会・学術大会 2013 年 10 月 11 日-13 日 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡 福岡県博多市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

米川敦子 (YONEKAWA Atsuko )

大阪大学・歯学研究科・招聘教員

研究者番号: 70600914