

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870492

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における Np63を介した上皮-間葉転換の浸潤・転移における役割

研究課題名(英文) Epithelial mesenchymal transition induced invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma via delta-Np63.

研究代表者

後藤 雄一 (Goto, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00637902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、癌の浸潤・転移において上皮-間葉転換(epithelial mesenchymal transition: EMT)が重要な役割を担うことが明らかになってきた。最近では癌幹細胞マーカーである Np63がEMTに関連しているという報告が散見されるが、その詳細については不明である。今回われわれは、口腔扁平上皮癌(oral squamous cell carcinoma: OSCC)の浸潤・転移における Np63を介したEMTの関与について検討を行い、Np63発現減弱がEMTを誘導し、OSCCの浸潤転移に関与していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), an essential developmental program, is thought to be involved in tumor progression. Np63, a homologue of p53, is described the association with the EMT program, but the detail remains to be elucidate. In this study, we examined the roles of Np63 in the EMT during progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Downregulation of Np63 induced a mesenchymal cell-like phenotype and is possibly involved in invasion and metastasis in OSCC. Although further studies are needed to understand the complex roles of Np63, revealing the functions of Np63 in EMT during tumor progression will lead to new approaches for the treatment of OSCC.

研究分野：外科系歯学

キーワード： Np63 EMT 口腔扁平上皮癌 浸潤 転移

1. 研究開始当初の背景

近年、癌抑制遺伝子 p53 のホモログである Np63 が、器官発生に必須である上皮-間葉転換 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) に関与していることが報告され、EMT が誘導された細胞は間葉系細胞様の形質を示し、癌の浸潤・転移に寄与していることが示唆されている。しかしながら、その分子機構については明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) の浸潤・転移における Np63 を介した EMT の関与について検討を行い、OSCC の浸潤・転移の分子機構の解明を図るとともに、OSCC 患者における転移制御の可能性について追求することが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-2 (口底癌由来)、HSC-3 (舌癌由来)、SQUU-A (舌癌由来; 非転移株)、SQUU-B (舌癌由来; 高転移株)、SAS (低分化型舌癌由来) 細胞およびヒト胎児腎細胞をアデノウィルスの E1 遺伝子により形質転換して樹立された細胞株である human embryonic kidney (HEK) 293 細胞 (間葉系細胞) を用いた。培地には、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (Sigma-Aldrich, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich)、100 units/ml ペニシリン、および 100 units/ml ストレプトマイシン (P/S) を添加したものをを用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で細胞培養を行った。

(1) Np63 の発現制御による EMT 関連分子の同定

遺伝子レベルでの発現を RT-PCR および real-time PCR にて、タンパクレベルは western blot 法を用いて解析を行った。解析遺伝子は Np63、Np63 のバリエーション群、E-cadherin、CK5、CK14 などの上皮系マーカー、vimentin、N-cadherin、fibronectin などの間葉系マーカー、ZEB1、ZEB2、Snail、Slug などの EMT 関連因子について検索を行った。

(2) 高転移株 SQUU-B 細胞の細胞生物学的特性の検討

低転移株である HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SAS と細胞形態、増殖能、遊走能、分化能について検討を行った。

(3) OSCC 細胞における Np63 発現制御が細胞生物学的特性に与える影響の解明

Np63 が発現している HSC-2 細胞には Np63 の siRNA を Np63 が発現していない SQUU-B 細胞には Np63 ベクターを導入し、上記と同様の実験を行った。

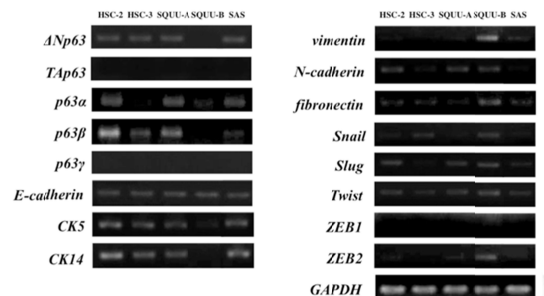
(4) ヒト OSCC 生検組織における Np63 および EMT 関連分子の局在の検討

(5) OSCC の臨床病理組織学的所見と Np63 および EMT 関連分子との関連

対象患者は、2004 年 1 月から 2008 年 12 月に九州大学病院顎口腔外科を受診し、病理組織学的に OSCC と診断された 79 例 (男性: 58 例、女性: 23 例、平均年齢: 62.6 ± 15.1 歳 19 ~ 88 歳) である。これらの生検材料を採取し、直ちに 4% パラホルムアルデヒドに 24 ~ 48 時間浸漬固定後、パラフィン包埋を行った。マイクロトーム (Leica Microsystems, Japan) にて 5 μm の切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色および免疫組織化学的染色 (Np63、E-cadherin、Vimentin) に用いた。免疫科学的染色の結果と臨床病理組織学的所見との関連を検討した。

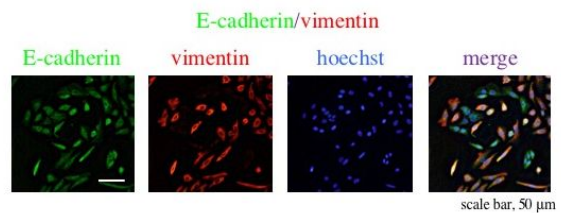
4. 研究成果

(1) Np63 の発現制御による EMT 関連分子の同定: Np63 はほぼすべての OSCC 細胞株で発現を認めしたが、高転移株である SQUU-B 細胞では Np63 の発現を認めず、vimentin の高発現を認めた。



(2) 高転移株 SQUU-B 細胞の細胞生物学的特性の検討と Np63 の発現制御による機能変化:

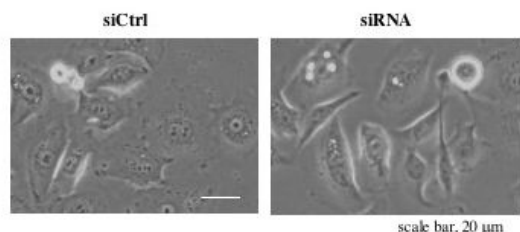
高転移株 SQUU-B は他の OSCC 細胞と比較し転移を起しやすいことが特徴である。同細胞は (1) より Np63 を発現しないことがわかっているが、蛍光免疫染色において、E-cadherin が減弱し Vimentin を発現している細胞がいることがわかった。



そこで Np63 の発現を制御することで、OSCC 細胞はどのように変化するかを確かめる為、機能実験を行った。

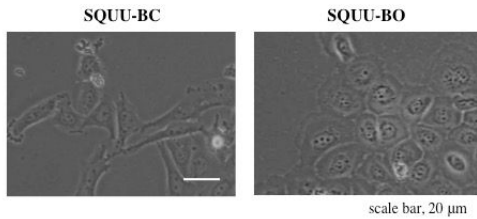
Np63 を発現している HSC-2 細胞に Np63 の siRNA を導入。

その結果、細胞形態は敷石状から紡錘形へ変化した。



また、細胞増殖能は低下し、遊走能は増加、分化能は上皮系マーカーが減弱し間葉系マーカーが増加していた。

反対に高転移株 SQUU-B 細胞にコントロールベクターを入れた SQUU-BC と Np63 ベクターを導入した SQUU-BO を作成。



SQUU-BC 細胞は紡錘形を示したが、SQUU-BO 細胞は多角形を示し、敷石状に増殖していた。SQUU-BO 細胞の遊走能は対照群と比較して低下していた。また、Np63 過剰発現により、SQUU-BO 細胞は SQUU-BC 細胞に比べ細胞増殖が有意に亢進し、上皮系マーカーの発現量増加、間葉系マーカーの発現量低下を認めた。E-cadherin の発現量は変化を認めなかった。(4) ヒト OSCC 生検組織における Np63 および EMT 関連分子の局在の検討：

OSCC の中心部において Np63 および E-cadherin はほぼすべての癌細胞に発現を認め、vimentin の発現は認めなかったが、浸潤先端部において Np63 および E-cadherin の発現は減弱し vimentin の発現が亢進していた。

(4) OSCC の臨床病理組織学的所見と Np63 および EMT 関連分子との関連：

浸潤先端部の腫瘍細胞における vimentin の発現と Np63 の発現減弱を検索し臨床病理組織学的所見と比較。vimentin 陽性群は陰性群に比べ頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高く、同様に Np63 の発現強度の減弱を認める群は認めない群に比べ頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高く認めた。

OSCC 浸潤先端部における vimentin の発現と転移との関連

| 頸部リンパ節転移 | vimentin の発現 |       | p-value |
|----------|--------------|-------|---------|
|          | 症例数 (%)      | 陽性 陰性 |         |
| 無        | 41 (52.6)    | 15 26 | *p<0.01 |
| 有        | 37 (47.4)    | 28 9  |         |
| 遠隔転移     |              |       | *p<0.01 |
| 無        | 70 (89.7)    | 35 35 |         |
| 有        | 8 (10.3)     | 8 0   |         |

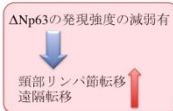
\*χ<sup>2</sup> test, Fisher's exact test  
vimentin 陽性率 50% 以上：陽性  
50% 未満：陰性



OSCC 浸潤先端部における ΔNp63 発現強度の減弱の有無と転移との関連

| 頸部リンパ節転移 | ΔNp63 発現強度の減弱 |       | p-value |
|----------|---------------|-------|---------|
|          | 症例数 (%)       | 有 無   |         |
| 無        | 41 (52.6)     | 11 30 | *p<0.01 |
| 有        | 37 (47.4)     | 26 11 |         |
| 遠隔転移     |               |       | *p<0.05 |
| 無        | 70 (89.7)     | 30 40 |         |
| 有        | 8 (10.3)      | 7 1   |         |

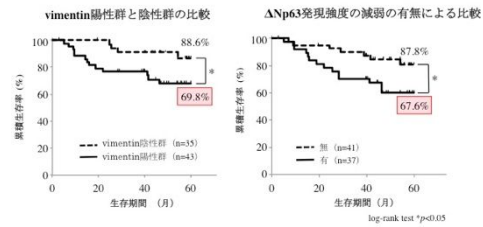
\*χ<sup>2</sup> test, Fisher's exact test



疾患特異的累積 5 年生存率は、vimentin 陽性群で 69.8% と陰性群と比較し有意に低く、同様に浸潤先端部における Np63 発現強度の

減弱を有する群の生存率は 67.6% と認めない群にくらべ有意に低く予後が不良であった。

疾患特異的累積 5 年生存率



vimentin 陽性群  
ΔNp63 発現強度の減弱を有する群 → 生存率低く予後不良

本研究により、OSCC 細胞における Np63 の発現減弱が EMT を誘導していることが示された。また、生検材料の浸潤先端部で Np63 および E-cadherin の発現が減弱し、vimentin の発現が亢進している癌細胞を認めたことから、*in vivo* においても EMT が誘導されている可能性が示された。さらに、浸潤先端部の癌細胞での vimentin の発現および Np63 の発現強度の減弱の有無は、頸部リンパ節転移や遠隔転移と強い関連を示した。以上より、Np63 を介した EMT は OSCC の浸潤・転移に関与することが示唆された。

上記成果は 2014 年 Clin Exp Metastasis 誌に Possible involvement of Np63 downregulation in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype. として掲載された。Np63 は癌発生のキーとなる遺伝子あることは以前から知られていたが、同遺伝子の発現減弱が、口腔癌の浸潤・転移に重要な役割を示すことを *in vitro*, *in vivo* 双方で証明した報告はなく、全容が未だ不明な癌の浸潤・転移の分野で、足掛かりとなる結果を得ることができた。

## 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 11 件)

A case of mantle cell lymphoma presenting as IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease. Hayashi Y, Moriyama M, Maehara T, Goto Y, Kawano S, Ohta M, Tanaka A, Furukawa S, Hayashida JN, Kiyoshima T, Shimizu M, Chikui T, Nakamura S.

World J Surg Oncol. 査読あり 13:225.2015

A case of marginal zone B cell lymphoma mimicking IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis.

Ohta M, Moriyama M, Goto Y, Kawano S, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Hayashida JN, Kiyoshima T, Shimizu M, Arinobu Y, Nakamura S. World J Surg Oncol. 査読あり 21(13):67.2015

Case of mucoepidermoid carcinoma of the sublingual gland accompanied with extensive dystrophic calcification and intratumoral bone formation.

Maruse Y, Kawano S, Kiyoshima T, Goto Y, Matsubara R, Chikui T, Yoshiga D, Nakamura S.

Head & Neck. 査読あり Mar 17.2015

Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. Jinno T, Kawano S, Maruse Y, Matsubara R, Goto Y, Sakamoto T, Hashiguchi Y, Kaneko N, Tanaka H, Kitamura R, Toyoshima T, Jinno A, Moriyama M, Oobu K, Kiyoshima T, Nakamura S.

Oncol Rep. 査読あり 33(5):2161-8.2015

Possible involvement of Np63 downregulation in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype. Goto Y, Kawano S, Matsubara R, Kiyosue T, Hirano M, Jinno T, Maruse Y, Toyoshima T, Kitamura R, Tanaka H, Oobu K, Nakamura S. Clin Exp Metastasis. 査読あり 31(3):293-306.2014

Apoptotic function of tumor-associated antigen RCAS1 in oral squamous cell carcinoma.

Tanaka H, Toyoshima T, Sonoda K, Kitamura R, Sasaguri M, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Nakamura S. J Transl Med. 査読あり 6(12):112.2014

The diagnostic utility of biopsies from the submandibular and labial salivary glands in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis, so-called Mikulicz's disease.

Moriyama M, Furukawa S, Kawano S, Goto Y, Kiyoshima T, Tanaka A, Maehara T, Hayashida JN, Ohta M, Nakamura S.

Int J Oral Maxillofac Surg. 査読あり 43(10):1276-81.2014

Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma.

Kanda S, Mitsuyasu T, Nakao Y, Kawano S, Goto Y, Matsubara R, Nakamura S.

Int J Oncol. 査読あり 43(3):695-702.2014

Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the upper lip: a case of an unusual malignant component of squamous cell carcinoma.

Mitate E, Kawano S, Kiyoshima T, Kawazu T, Chikui T, Goto Y, Matsubara R, Nakamura S.

World J Surg Oncol. 査読あり 11:234.2013  
10. Concurrence of autoantibodies to both laminin 1 and 2 subunits in a patient with kidney rejection response.

Mitate E, Kawano S, Nakao Y, Goto Y, Kobayashi I, Onozawa K, Hashimoto T, Nakamura S.

Acta Derm Venereol. 査読あり 93(1):114-5.2013

11. Immunohistochemical location of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma.

Kiyosue T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Hirano M, Jinno T, Toyoshima T, Kitamura R, Oobu K, Nakamura S.

Int J Clin Oncol. 査読あり 18(1):154-63.2013

〔学会発表〕(計4件)

Yuichi Goto, Shintaro Kawano, Koudai Nakamura, Tomofumi Hamada, Seiji Nakamura, Tsuyoshi Sugiura

Downregulation of delta-Np63 induces a mesenchymal cell phenotype, possibly involving invasion and metastasis of OSCC

第74回日本癌学会学術総会

2015年10月10日

愛知県名古屋市名古屋国際会議場

後藤雄一、川野真太郎、松原良太、神野哲平、丸瀬靖之、橋口有真、金子直樹、坂本泰基、豊嶋健史、北村亮二、田中秀明、大部一成、杉浦剛、中村誠司

口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における Np63 を介した上皮-間葉転換の関与

第69回日本口腔科学会学術総会

2015年5月13日

大阪府大阪市大阪国際会議場

後藤雄一、大部一成、星野亜紀、金子直樹、今利一寿、三上友理恵、森悦秀、中村誠司

口腔癌手術後に経口にて栄養摂取できなかった症例についての検討

第20回日本摂食嚥下リハビリテーション学会

2014年9月6日

東京都新宿区京王プラザホテル

Yuichi Goto, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Takahiro Kiyosue, Mitsuhiro Hirano, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Takeshi Toyoshima, Ryoji Kitamura, Hideaki Tanaka, Kazunari Oobu, and Seiji Nakamura

Down-regulation of Np63 possibly involves in the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing mesenchymal phenotype

6th International p63/p73 Workshop

2013年9月11日

Kazusa Akademia Park, Chiba, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 雄一 (Goto Yuichi)  
鹿児島大学医歯学域医学部・歯学部附属病院  
助教

研究者番号：00637902

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

川野 真太郎 (Kawano Shintaro)  
九州大学病院 講師

研究者番号：26463014

松原 良太 (Matsubara Ryota)

九州大学病院 助教

研究者番号：60615798

杉浦 剛 (Sugiura Tsuyoshi)

鹿児島大学医歯学域歯学系 教授

研究者番号：40322292

中村 誠司 (Nakamura Seiji)

九州大学大学院歯学研究院 教授

研究者番号：60189040