

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463002

研究課題名(和文) 頸部リンパ節転移モデルを用いた口腔癌転移とウイントシグナルの解析

研究課題名(英文) Analysis of metastasis and Wnt signaling in oral cancer using cervical lymph node metastasis model

研究代表者

岩井 聡一 (Iwai, Soichi)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：10362675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌の浸潤・転移機構の解明は、癌の制御に極めて重要である。口腔癌細胞株を用いてリンパ節高転移株を確立し、解析を進めた。細胞伝達シグナルの因子であるWnt5bが $\beta$ -カテニン非依存性経路を介して、Rho family分子の活性化、細胞骨格の再構成、に影響を及ぼし、細胞運動能を亢進させ、さらに上皮間葉転移や癌幹細胞様細胞に關与することを明らかにした。この結果は、分子標的治療薬の開発に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：It is very important for cancer therapy to analysis of tumor invasion and metasis.

We established highly lymph nodes metastatic cell line from oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells after in vivo selection, and investigated the involvement of Wnt signaling in metastasis using those OSCC cells with different metastatic potential. We demonstrated that Wnt5b is involved in cell motility through the activation of Cdc42 and RhoA via the non-canonical Wnt signaling pathway, and the elevated expression of Wnt5b may become an important index for the evaluation of OSCC invasion and metastasis. Furthermore, Wnt5b may become a promising therapeutic target for the prevention of OSCC metastasis

研究分野：口腔癌

キーワード：癌の浸潤・転移 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌の治療において、浸潤・転移を制御することが重要である。浸潤・転移の過程は多段階から成り立っているが、癌細胞の周囲組織への遊走及び浸潤の能力に関して、Wnt シグナル経路が関与していることが報告され、研究を進めてきた。

(2) Wnt シグナル経路は、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 シグナル経路は  $\beta$ -カテニンが遺伝子の発現を亢進させる  $\beta$ -カテニン経路と  $\beta$ -カテニン経路とは独立して、低分子量 G タンパク質 Rho family を介して細胞骨格や運動を制御する planar cell polarity(PCP)経路、細胞内の  $Ca^{2+}$  動員を介して protein kinase C(PKC) や calmodulin dependent protein kinase (CaMK) を活性化する  $Ca^{2+}$  経路の  $\beta$ -カテニン非依存性経路に大きく分けられる。

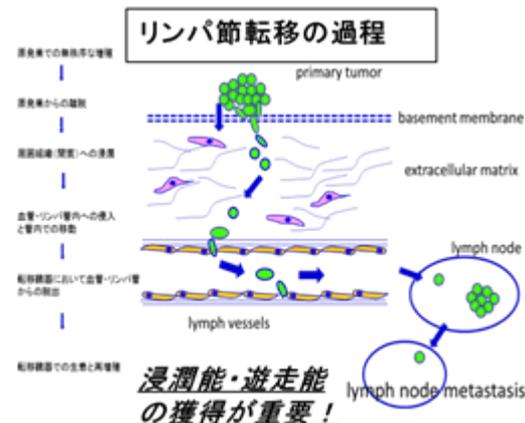
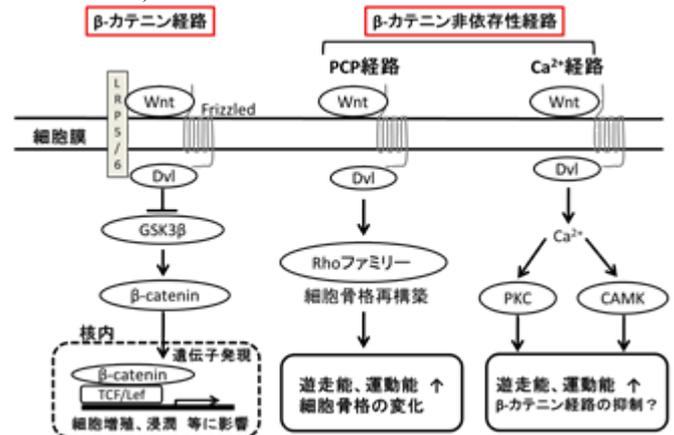
(3) ここ数年の研究により、Wnt シグナルの破綻は発癌と深い関連があることが判明した。beta-catenin は E-cadherin の裏打ち蛋白として細胞膜付近に局在するが、多くの癌細胞において Wnt シグナル等により安定化し細胞質内に蓄積し核内へ移行する。Wnt 非存在化で、 $\beta$ -カテニンは Axin 複合体を形成し、GSK-3 $\beta$  によりリン酸化されユビキチン化を受け分解される。大腸癌や肝癌などでは  $\beta$ -カテニン、APC、Axin の遺伝子変異により複合体を形成できなくなり GSK-3 $\beta$  による  $\beta$ -カテニンのリン酸化が抑制され、その結果  $\beta$ -カテニン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 等の標的遺伝子の発現を促進することによって細胞癌化の原因の 1 つとなっていることが明らかにされてきた。

(4) 口腔扁平上皮癌においても、 $\beta$ -カテニンの細胞質、核への集積が認められることを、我々のグループを含め明らかにしてきた。(Lo Muzio et al. Anti-cancer Res 1999, 19:3817-3821, Iwai S et al. J Cancer Res Clin Oncol 2005, 131:773-782.) しかしながら、大腸癌などのように、口腔扁平上皮癌において  $\beta$ -カテニンの細胞質集積を起こす主な原因は、 $\beta$ -カテニン、APC、Axin 等の遺伝子変異に起因するのかが調べたが、有意な遺伝子変異が見られなかった。(Iwai S et al. J Cancer Res Clin Oncol 2005, 131:773-782.)

(5) さらに我々は、Wnt シグナル伝達系が、遊走能、浸潤能等の癌細胞の特性にどのように関与しているのかを解析した。変異型  $\beta$ -カテニンのトランスフェタントを作成し、 $\beta$ -カテニンの細胞質及び核への集積によって、転写因子 TCF/Lef を介した転写活性が大幅に増大した。それと共に細胞骨格系に影響を及ぼし細胞形態の維持、細胞接着、細胞運動に関与する Rho family (Rho、Rac、Cdc42) の顕著な活性化が見られ、細胞の遊走能及び浸潤能が促進し、アクチンフィラメントの再構成も促進した。これらの結果より  $\beta$ -カテニン経路

以外に、Rho family を介して細胞運動に影響を及ぼす PCP 経路、PKC や CaMKII など活性化する  $Ca^{2+}$  経路が細胞の遊走・浸潤に関与することを明らかにした。(Iwai S, Yonekawa-Niki A et al. Int J Oncol 2010, 37:1095-1103.)

(5) 最近、ヒトの悪性腫瘍においても、Wnt5a をはじめとしたいくつかの Wnt が  $\beta$ -カテニン非依存性経路の活性化を生じさせることが報告され、beta-catenin 非依存性経路の異常活性化が癌の悪性化に関与することも報告されている。(Kikuchi A, et al Cancer Sci 2008, 99:202-208.)



2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の浸潤・転移のメカニズムを解明することは、口腔癌治療における基礎となり、治療薬の開発に繋がる重要な研究である。上記のように癌細胞の遊走及び浸潤の能力に、Wnt シグナル経路が関与していることが明らかにしてきた。しかしながら、Wnt シグナル経路のどの因子が、癌細胞の浸潤能・転移能を制御しているのかは、まだ詳細に明らかにはされていない。

そこで、口腔扁平上皮癌細胞から、頸部リンパ節転移モデルを作成し、Wnt シグナル経路を中心に解析することによって、頸部リンパ節転移のメカニズムを明らかにする。これにより分子標的治療薬などの開発に寄与する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト低分化型舌扁平上皮癌由来細胞株 SAS 由来頸部リンパ節高転移株 SAS-LMX の確立

SAS-GFP から SAS-GFP をヌードマウスの舌に接種し、リンパ節転移形成後、再び *in vitro* に分離する *in vivo* selection を X 回(5 回以上) 繰り返すことにより、SAS-LM3 より転移能の高い頸部リンパ節高転移株 SAS-LMX を獲得する。この SAS-LMX 及び SAS-GFP をマウス舌に接種して、頸部リンパ節転移率の顕著な差を確認する。

(2) 高転移株 SAS-LMX の生物学的特性の解析

SAS-LMX 及び SAS-GFP について、細胞形態、増殖能、遊走能 (migration assay: Wound healing assay 及び transwell chamber assay)、浸潤能 (invasion assay) などの生物学的特性に関して評価する。遊走能及び浸潤能の顕著な亢進を認められた場合、アクチン細胞骨格の形態観察 (蛍光標識ファロイジンなど使用) を行う。また、アクチン細胞骨格の再構成に関与する低分子量 G タンパク質である Rho family 分子 (Cdc42, Rac1, RhoA) の活性をウエスタンブロッティングにより検出する。

(3) 両細胞株(SAS-LMX 及び SAS-GFP)の転移能・運動能の差に関する Wnt シグナルの関与を検討

両細胞株について、蛍光免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡により  $\beta$ -カテニン、E カドヘリンの細胞内局在の変化を調べる。

(4) 両細胞株(SAS-LMX 及び SAS-GFP)の転移能・運動能の差に関する Wnt シグナル関連因子を同定した段階において

同定した因子に対する siRNA によるノックダウンによる遊走能、浸潤能の変化を評価し、逆に同定因子での刺激による遊走能、浸潤能の変化を評価する。また、同時に細胞形態の変化や、アクチン細胞骨格の変化、低分子量 G タンパク質 Rho family 分子 (Cdc42, Rac1, RhoA) の活性を検討する。

(5) ヒト口腔癌細胞組織における、浸潤・転移に関する Wnt シグナル関連因子の発現解析

ヒト口腔扁平上皮癌組織において、頸部リンパ節転移の有無と原発巣組織における同定した因子の発現に相関関係が存在するのかが検討する。

(6) 転移に関与する Wnt シグナル関連因子を SAS-GFP/SAS-LMX に遺伝子導入して強制発現させ、浸潤能及び転移能の変化及び *in vivo* における転移率の変化の有無を検討する。

Wnt シグナル関連因子が浸潤能及び転移能を正に制御する因子である場合; SAS-GFP に導入した細胞は細胞浸潤能及び細胞遊走能が亢進し、マウス舌に接種すると頸部リンパ節転移の転移率が向上するのかが解析する。Wnt シグナル関連因子が浸潤能及び転移能を負に制御する因子である場合; SAS-LMX に導入した細胞は細胞浸潤能及び細胞遊走能

が低下し、マウス舌に接種すると頸部リンパ節転移の転移率が低下するのかが解析する。  
(7) Wnt5b が sphere 形成能へ及ぼす影響を検討する

Wnt5b を 48 時間処理した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞を播種し、癌幹細胞増殖培地で培養した。培養後 3 日目および 10 日目に無作為に選出した 10 視野にて sphere の長径の平均と、その中で 75  $\mu\text{m}$  以上の大きさを有する sphere 数を播種した細胞数 500 個に対する割合で算出する。

(8) Wnt5b が CSC マーカーの発現に及ぼす影響を検討する

Wnt5b で 48 時間処理した細胞を、APC 標識抗ヒト CD44 抗体および抗 CD133 抗体に反応させ、flow cytometer にて解析する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト低分化型舌扁平上皮癌由来細胞株 SAS を用いて *in vivo* selection を 8 回繰り返し、頸部リンパ節高転移株 SAS-LM8 を確立した。

(2) この SAS-LM8 及び SAS-GFP について、細胞形態、増殖能、遊走能などの生物学的特性に関して評価した。SAS-LM8 は、SAS-GFP に比較して、細胞形態は伸張化し、遊走能及び浸潤能の顕著な亢進を認めた。アクチン細胞骨格の形態観察を行った。また、アクチン細胞骨格の再構成に関する低分子量 G タンパク質である Rho family 分子 (Cdc42, Rac1, RhoA) の活性をウエスタンブロッティングにて解析し、それらの活性化を認めた。

(3) 両細胞株 (SAS-LM8 及び SAS-GFP) の転移能・運動能の差に関する Wnt シグナルの関与を検討した。両細胞株について、蛍光免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡により  $\beta$ -カテニン、E カドヘリンの細胞内局在の変化を調べた結果、局在変化は認めなかった。 $\beta$ -カテニン標的遺伝子の発現にも差は認めなかった。しかしながら、Wnt 関連遺伝子の発現変化を解析した結果、その発現に差が見られた。すなわち、 $\beta$ -カテニン非依存性経路を活性化する Wnt の 1 つである Wnt5b の発現の亢進を認めた。

(4) さらに、Wnt5b の siRNA によるノックダウンにより、SAS-GFP、SAS-LM8 とともに遊走能が低下し、細胞周囲の仮足様突起の減退を認めた。また、Wnt5b を作用させると、SAS-GFP、SAS-LM8 とともに運動能の亢進と細胞周囲の仮足様突起および Cdc42、RhoA の亢進を認めた。以上より Wnt5b は Wnt シグナル伝達経路のうち、 $\beta$ -カテニン非依存性経路を介して、Cdc42 と RhoA の活性化、細胞骨格の再構成、に影響を及ぼし、その結果口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能を亢進することが明らかとなった。

(5) SAS 以外の口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 においても、*In vitro* selection のシステムにより、高転移株を確立した。高転移株 HSC-LM3 及び親株 HSC-GFP を SAS-LM8 及び SAS-GFP

と同様に比較実験を行い結果はほぼ一致した。この結果より細胞特異的ではなく、より普遍的に浸潤能転移能に関するメカニズムを明らかにすることができた。

(6) Wnt5b を作用させると、SAS-GFP 細胞は、対照群と比較して、間葉細胞マーカーである vimentin および N-cadherin の発現上昇を認め、HSC3-GFP 細胞では、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現低下傾向を認めた。

(7) Wnt5b を作用させると SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞は、対照群と比較して、sphere formation assay にて、sphere 形成能の有意な亢進を認めた。

(8) さらに、flow cytometry にて、CD44 および CD133 陽性細胞の増加を認めた。この結果から、Wnt5b により、上皮間葉転移 (EMT) や癌幹細胞様細胞 (CSC) に影響を及ぼすことが示された。

これらの結果より、口腔癌細胞の浸潤・転移に關与する Wnt シグナル因子と伝達経路の解明が進み、分子標的治療薬の開発などに大いに寄与すると期待される。

#### 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. 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 RhoA. International Journal of Oncology 査読有 2014;44:59-68.. doi: 10.3892/ijo.2013.2172.

2. 竹下彰範, 岩井聡一, 仁木敦子, 森田祥弘, 濱田正和, 岩上隆起, 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雑誌 査読無、 2014;23(1):116-117.

[学会発表](計 5 件)

1. 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 回日本口腔科学会学術集会 2015 年 5 月 15 日 大阪国際会議場 大阪府

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

Wnt5b promotes the cell invasion and migration essential to the metastasis of oral squamous cell carcinoma cell through activation of Cdc42 and RhoA. European Cancer Congress (ECC) 27th, September, 2015, Vienna, Austria

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, 濱田正和, 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 日本口腔外科学会学術大会 2015 年  
10 月 16 日名古屋国際会議場 愛知県

4. 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

5. 岩井聡一, 岸本聡子, 竹下彰範, 濱田正和, 西山今日子, 今井智章, 加藤逸郎, 中澤光博

新しい 3 次元組織体による口腔扁平上皮癌の遊走能・浸潤能及びリンパ管浸潤能の解析 第 61 回日本口腔外科学会学術大会 2016 年 11 月 25 日 幕張メッセ 千葉県

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井聡一 (IWAI Soichi)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号: 10362675

(2)連携研究者

由良義明 (YURA Yoshiaki)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号: 00136277

(3)連携研究者

仁木-米川敦子 (NIKI-YONEKAWA Atsuko)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号: 70600914