様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ５ 月　 ８ 日現在

機関番号： １３３０１
研究種目： 基盤研究(C)（一般）
研究期間： 2014～2017
課題番号： ２６４６３０３８

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌の浸潤・転移におけるInvadopodiaのメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of invadopodia in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者
加藤　広禄（Kato, Koroku）

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：３０４４４２０１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：NOFまたはCAFとの共培養は、低浸潤性のH357細胞および高浸潤性のSCC4細胞の遊走および浸潤を有意に亢進させた。Tks5およびMT1-MMPタンパク質の両方の発現レベルおよびTks5の発現スポットの数は、H357およびSCC4両細胞ともに、SFMとの培養と比較し、NOF-CMまたはCAF-CMとの培養によって有意に増加した。 さらに、OSCC細胞の遊走能および浸潤能は、Tks5の抑制によって減少した。
これらの結果は、侵略馬の形成は、OSCC細胞の移動および浸潤にとって重要な機構であり、OSCC細胞と線維芽細胞との相互作用によって調節されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Co-culture with NOF or CAF significantly increased the migration and invasion of both the low-invasive H357 and high-invasive SCC4 cells . The expression level of both Tks5 and MT1-MMP protein and the number of expression spots of Tks5 was significantly increased by culture with NOF-CM or CAF-CM compared with culture with SFM in both H357 and SCC4 cells. Moreover, the migrating and invasive abilities of OSCC cells decreased by inhibition of Tks5.
These results were suggested that invadopodia formation is important mechanism for migration and invasion of OSCC cells and it is regulated by interaction between OSCC cells and fibroblast.

研究分野： 口腔癌

キーワード： 口腔扁平上皮癌　Invadopodia　Tks5　MT1-MMP　浸潤能　遊走能　予後

１．研究開始当初の背景

すべての多細胞生物は、細胞と細胞および細胞と細胞外基質が細胞表面の接着分子を介してつながりあった構造的ネットワークによって組織を形成する。正常組織では、このネットワーク構造を介して組織構造の維持、細胞の増殖や機能を制御している。一方、癌細胞の接着は浸潤・転移における重要な特性の一つとなっている。癌細胞は、細胞表面の接着分子を介してつながりあったネットワーク構造の制御から逃れることにより、自由に動き回ることができ、転移がはじまる。“がん”が致命的な病である大きな理由としてこの“転移”をすることにある。よってこの転移を抑えることにより治療成績が大きく改善すると期待できる。

一般的に癌細胞の浸潤・転移過程は、⑴原発巣からの離脱、⑵周囲組織への浸潤、⑶脈管への侵入、運搬、⑷臓器脈管へのトラップと脈管外脱出、⑸２次臓器への浸潤と再増殖である。このうち初期の転移過程に接着分子が大きく関与しているとされている。癌細胞が浸潤をしていく際、細胞の進行方向に浸潤突起と呼ばれる突起を形成し、その突起を延ばすことによってそこを足場としてその方向に細胞は運動し、移動する。その足場となる浸潤突起のことを Invadopodia と呼ぶ。この invadopodia の形成には細胞骨格であるアクチンフィラメントが重要な働きをしており、何らかの原因により細胞外基質（ECM）分解酵素が細胞局所に集中し、分解方向に細胞体を押し出す、精密な制御メカニズムによって Rho-GTPase による細胞骨格のアクチンフィラメントの再構成が生じて突起が延び、MMP による ECM 分解が協調的に働く。そして接着タンパクが剥離して癌細胞が自由になって浸潤する。このことより Invadopodia が癌細胞の浸潤や転移の機序に重要であると考えられている。

癌細胞の細胞膜上にある脂質ラフトは Invadopodia の形成に必要であり、細胞内に取り込まれ輸送される。脂質ラフト構成タンパク質の一つであり、接着因子の一つである Caveolin-1（Cav-1）は、細胞膜の Caveolae に存在する膜蛋白であり、細胞接着因子であるインテグリンや各種サイトカインレセプターを介したシグナル伝達を修飾することが知られている（Arpaia E、 et al。 Oncogene。2012）。さらには細胞外基質分解酵素（MT1-MMP）の輸送や局在を制御し、Invadopodia を介した癌細胞の浸潤活性に関与すると考えられている。

臨床的には胃がん（Nam KH、 et al。Pathobiology。2013）や肺がん（Ma X、 et al。Breast。2013）、前立腺がん（Ayala G、 et al。J Pathol。 2013）など多くのがんにおいて、Cav-1 や腫瘍の足場非依存性に関わる Src の基質 CDCP1 などの Invadopodia 関連因子と臨床病理学的因子との関係を検討した報告はあるものの、口腔扁平上皮癌においての報告はみられない。

基礎的研究においては、これまでに膵臓がんでは、Cav-1 が FoxM1 に発現誘導され、浸潤や転移を促進すると報告している(Huang C、et al。 Cancer Res。 2012)。また、癌転移促進因子である Twist-1 によって誘導された Invadopodia の形成が腫瘍の転移を調整しているとの報告もある（Eckert MA、 et al。Cancer Cell。 2011）。さらに CDCP1 が、MT1-MMP の機能や Invadopodia による浸潤を調節していると報告している（Miyazawa T、et al。 Mol Cancer Res。 2013）。このように最近になり Invadopodia のメカニズムが少しずつ解明されてきてはいるが、いまだ詳細はわかっていないのが現状である。

２．研究の目的

今回の研究によって、口腔扁平上皮癌細胞の遊走・浸潤における Invadopodia の重要性について検討し、口腔扁平上皮癌細胞の遊

走・浸潤のメカニズムを解明するとともに、癌細胞と線維芽細胞、特にCAFとの相互作用のInvadopodia形成に与える影響について検討することを目的とした。それにより、Invadopodiaの制御による浸潤・転移の抑制が可能となり、さらにInvadopodiaをターゲットとした新たな治療法の開発も期待できるのではないかと考えた。

３．研究の方法

細胞株

口腔扁平上皮癌由来細胞株であり、浸潤様相の異なる細胞株２種類（高浸潤性；SCC4、低浸潤性；H357）ならびに正常口腔線維芽細胞株（NOF）を使用した。

CAF

TGF-β1を用いてNOFを刺激することによりCAF様線維芽細胞を作成した。

細胞培養

各細胞株は10%ウシ胎児血清と1%ペニシリン−ストレプトマイシンを添加した最小必要培地MEM®(Sigma-Aldrich)にて37°C、5%CO_2の条件下で培養した。

また、SCC4ならびにH357をNOFならびにCAFの培養液で培養することにより、間質からの刺激による癌細胞の形態学的、生物学的変化を検討した。

qPCR法

各細胞のInvadopodia関連因子であるTks5、CAV1ならびにMT1-MMPのmRNA発現レベルをqPCR法にて検討した。RNAの抽出は時間の節約からRNeasy kit®(QIAGEN)を用いて抽出した。

Western Blotting法

各細胞のInvadopodia関連因子であるTks5、CAV1ならびにMT1-MMPのタンパク発現レベルをWestern blotting法にて検討した。ただし、細胞内の全タンパク質の抽出はRIPA bufferを用いて行った。

siRNA抑制実験

Tks5のmRNAを標的とした21塩基のsiRNAを合成、精製し、実験に供した。導入にはOligofectamine (Life Technologies)を使用し、siRNA導入後にWestern Blotting法にてTks5の抑制を確認した。抑制実験のコントロールとしてはnonsense RNAを用い、いずれもinternal controlとしてß-actinを用いた。

Migration assay法

まず、浸潤性の異なる2種類の細胞の遊走能の違いを検討するためにMigration assayを行った。さらに高浸潤性を示すSCC4へのTks5のsiRNA導入に伴う遊走抑制効果を検討するためにMigration assayを行った。siRNAを導入した細胞とnonsense RNAを導入した細胞を各々のチャンバー内に一定数播種し、24時間培養。光学顕微鏡にてメンブレン下面の細胞を遊走細胞とし、細胞数を計測した。これによりsiRNA導入による遊走率の相違を検討した。

Invasion assay法

まず、浸潤性の異なる2種類の細胞の浸潤能の違いを検討するためにInvasion assayを行った。さらに高浸潤性を示すSCC4へのTks5のsiRNA導入に伴う浸潤抑制効果を検討するためにInvasion assayを行った。チャンバー内にコーティングされたコラーゲンゲル上にsiRNAを導入した細胞とnonsense RNAを導入した細胞を各々一定数播種し、24時間培養。光学顕微鏡にてメンブレン下面の細胞を浸潤細胞とし、細胞数を計測した。これによりsiRNA導入による浸潤率の相違を検討した。

蛍光免疫染色法

SCC4ならびにH357細胞を、無血清培地ならびにNOF培地、CAF培地で培養することにより、Tks5の培養細胞内の発現局在の変化を検討することを目的に蛍光免疫染色を行った。

免疫組織化学染色法

口腔扁平上皮癌組織切片60例において、

Tks5 の免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的因子と比較検討することによりInvadopodia と予後との関連を検討した。

4．研究成果

NOF または CAF の培養上清（NOF-CM、CAF-CM）で SCC4 および H357 細胞を培養したところ、間葉系の形態を呈した。さらに NOF-CM または CAF-CM での共培養により、低浸潤性の H357 細胞および高浸潤性の SCC4 細胞ともにさらなる遊走性ならびに浸潤性を獲得した（p <0。05）。しかも SCC4 細胞においては、CAF-CM との共培養により浸潤性の更新がより顕著となった（p <0。05）。一方、NOF-CM または CAF-CM による培養はいずれの細胞株の増殖にも影響を与えなかった。

OSCC 細胞における Tks5 および MT1-MMP の mRNA 発現レベルを qPCR により評価した。SCC4 における Tks5 遺伝子の発現は、H357 より高かった。NOF-CM または CAF-CM での培養後、OSCC 細胞における Tks5 mRNA の発現の亢進を認めた。一方、Tks5 および MT1-MMP タンパク質の両方の発現レベルは、NOF-CM ならびに CAF-CM による共培養により有意に増加した。Tks5 は H357 ではほとんど検出されなかったが、H357 および SCC4 細胞の両方で SFM との培養と比較して NOF-CM または CAF-CM との培養によって増加した。MT1-MMP の発現は、CAF-CM と共培養するだけでなく、NOF5-CM との共培養においても有意に増加した。

蛍光免疫染色による Tks5 の発現は、スポット状に検出でき、SCC4 細胞においては多くの Tks5 スポットを検出した。癌細胞を NOF-CM または CAF-CM で培養することにより、Tks5 の発現スポット数が増加した。

siRNA を用いて Tks5 発現を抑制したところ、SCC4 細胞における Tks5 のタンパク発現の減少を確認した。Tks5 siRNA をトランスフェクトした細胞の遊走能、浸潤能の変化を検討したところ、対照群と比較して遊走能、浸潤能ともに有意に減少した（p <0。01）。

切除標本における Tks5 の免疫組織化学染色の結果、Tks5 は癌細胞の細胞質において主に観察された。Tks5 発現と T 分類、N 分類、浸潤の段階および様式との間に有意な相関があった（それぞれ p <0。05）。5 年生存率において、Tks5 陽性例は Tks5 陰性例より予後が悪かった（陰性、78。4%、陽性、48。7%、p <0。001）。単変量解析では、浸潤様式および Tks5 発現が有意な予後因子であり、さらに多変量解析により、浸潤様式および Tks5 発現が独立した予後因子であることが示された。

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 4 件）

① Nagai H, Hasegawa S,Uchida F, Terabe T, Ishibashi Kanno N, <u>Kato K</u>, Yamagata K, Sakai S, Kawashiri S, Sato H, Yanagawa T, Bukawa H. MicroRNA-205-5p suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP-2 expression. Int J Oncol. 52(3):841-850, 2018.

② Hirai M, Kitahara H, Kobayashi Y, <u>Kato K</u>, Bou-Gharios G, Nakamura H, Kawashiri S. Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment. Int J Oncol. 50(1):41-48, 2017.

③ Kitahara H, Hirai M, <u>Kato K</u>, Bou-Gharios G, Nakamura H, Kawashiri S. Eribulin sensitizes oral squamous cell carcinoma cells

to cetuximab via induction of mesenchymal-to-epithelial transition. Oncol Rep. 36(6):3139-3144, 2016.

④ Kimura I, Kitahara H, Ooi K, Kato K, Noguchi N, Yoshizawa K, Nakamura H, Kawashiri S. Loss of epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition. Oncol Lett. 11(1):201-207, 2016.

〔学会発表〕（計 5 件）

① 加藤広禄、北原寛子、野口夏代、中村博幸、川尻秀一
口腔扁平上皮癌細胞の Invadopodia 形成と癌関連線維芽細胞（CAF）との関連
第 41 回頭頸部癌学会　2017 年 6 月 8 日～6 月 9 日（京都）

② 吉本泰祐、小林泰、北原寛子、野口夏代、加藤広禄、川尻秀一
Vinculin negatively regulates transcription of MT1-MMP through MEK/ERKpathway
第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会 2017 年 1 月 26 日～1 月 27 日（福岡）

③ 加藤広禄、宮澤広樹、加藤阿希、平井真理子、吉本泰祐、木村依世、北原寛子、野口夏代、中村博幸、川尻秀一
口腔扁平上皮癌細胞の Invadopodia 形成と癌関連線維芽細胞（CAF）との関連
第 61 回日本口腔外科学会総会・学術集会 2016 年 11 月 25 日～11 月 27 日（千葉）

④ 北原寛子、中村博幸、平井真理子、加藤広禄、川尻秀一
エリブリンのセツキシマブ非感受性口腔癌細胞での作用検討
第 40 回頭頸部癌学会　2016 年 6 月 9 日～6 月 10 日（埼玉）

⑤ 北原寛子、中村博幸、平井真理子、加藤広禄、川尻秀一
セツキシマブ非感受性口腔癌細胞でのエリブリンの作用検討
第 70 回日本口腔科学会学術集会　2016 年 4 月 16 日～4 月 17 日（福岡）

６．研究組織

(1)研究代表者
加藤 広禄(KATO KOROKU)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号 : 30444201

(2)研究分担者
吉澤　邦夫（YOSHIZAWA KUNIO）
山梨大学・医学部・講師
研究者番号：60452108