

令和元年6月19日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05018

研究課題名(和文)先駆的EMT分子マーカーによる口腔癌由来循環内腫瘍細胞の検出ならびに制御

研究課題名(英文)Identification of novel EMT molecular markers in oral cancer

研究代表者

齋藤 正夫 (SAITOH, Masao)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90345041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)はがんの進展に非常に重要な役割をもっている。EMTを獲得したがん細胞は運動性などが亢進し、がん細胞の悪性形質を高める。そこで、EMTを獲得した細胞を効率的に検出できる分子マーカーの同定を試みた。その結果、EMT獲得癌細胞のみを選択的に検出できる分子マーカーの同定できず、現在も継続して研究をおこなっている。しかし、EMTを実行する分子を制御する分子を新たに検出し、この分子をマーカーとして使用できる可能性を現在も行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞の分化度は、癌の予後を判断する上で非常に重要な因子のひとつである。その分化度を規定しているのがEMTとよばれる現象で、最近話題のがん幹細胞の発生にも寄与していると考えられている。しかしながらEMTを選択的に診断できるような分子マーカーは無く、もしEMTを獲得した細胞を効率良く診断できれば、画期的な診断法のみならず、革新的な治療法に展開できる。本研究では、EMT時におこる非常にユニークな選択的スプライシング変化に着目し、研究をおこなった。しかしながら、現時点まで、有効な分子マーカーは同定されておらず、現在も継続して、研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is an essential biological process during embryonic development, as well as during wound healing and tissue regeneration in adult tissues. The pathological significance of EMT in cancer remains controversial. It is clear, however, that ZEBs, representative EMT transcription factors, promote cancer progression by promoting invasion and drug resistance, but not tumorigenesis, as recently determined by numerous in vitro and in vivo studies using mouse cancer models.

ESE1, a member of the Ets transcription factor family, was repressed by activation of MEK-ERK pathway, resulting in induction of ZEBs through Ets1 upregulation. Conversely, Ets1 was repressed by inactivation of MEK-ERK pathway, resulting in reduction of ZEBs through ESE1 upregulation. These findings suggest that ESE1 and Ets1, whose expressions are reciprocally regulated by MEK-ERK pathway, define the EMT phenotype through controlling expression of ZEBs in cancer cells.

研究分野：分子病理学

キーワード：EMT 上皮間葉転換 がん細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition; EMT) は発生期の器官形成過程に必須なプロセスであるとともに、創傷治癒など生理学的にも重要なメカニズムである、またがん細胞の分化制御機構としても知られている。一般に EMT を獲得した癌細胞は、運動性、抗がん剤(ストレス)耐性能だけでなく、がん幹細胞や循環内腫瘍細胞へ効率良く分化させ、予後を非常に悪くしている。しかしながら、EMT を獲得した細胞を鑑別できる有用な分子マーカーが存在していなかった。そこで、本研究では、とくに癌細胞の EMT を選択的に診断できる分子マーカーの同定を試みた。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでの EMT に関する研究実績をもとに、EMT 時に発現制御される新規分子マーカーの同定に一部成功し、悪性度との相関性も明らかにした。本研究では、これらの分子マーカーならびに、申請者が見出した EMT 時のユニークな選択的スプライシング制御によって調節される分子をも指標とした、口腔癌由来の循環内腫瘍細胞(CTC)の同定を試みる。本研究を遂行することにより、診断技術の革新的な発展が見込まれるばかりでなく、脈管系は独自の閉鎖性の構造であることから、そこに迷入した腫瘍細胞を根絶できる治療法開発の基礎を築く研究をおこなう。

3. 研究の方法

がん細胞が産生する TGF- β と間質細胞の産生する液性因子が協調し劇的に EMT を促進した結果、新たに「発現変動」と「選択的スプライシング変動」する遺伝子のスクリーニングを、すでに行い、候補遺伝子の絞り込みを乳癌細胞や膀胱癌細胞でおこなってきた。そこで、本研究では、口腔がん細胞に応用し、複数ある口腔癌細胞を EMT の観点から characterize する。さらに、これまで絞り込んだ候補遺伝子と口腔癌の EMT とを比較検討を分子生物学的・細胞生物学的に検討する。また必要に応じて、病理学的にも検討を加える。CTC が血小板に付着することが知られており、EMT を獲得させた癌細胞と血小板との相互作用などを in vitro またはマウス組織をつかって解析する。

4. 研究成果

本研究では、申請者が見出した EMT 時のユニークな選択的スプライシング制御によって調節される分子をも指標とした、EMT 獲得口腔癌の新規な分化マーカーの探索をおこなった。複数の選択的スプライシング制御によって調節される分子を解析した結果、EMT を強力に誘導する TGF- β 誘導性 EMT 時に変動する分子は検出できず、また悪性分化度の異なる乳癌細胞での検索でも正の相関をしめさなかった。そこで、さらに遺伝子を増やし、解析を現在も継続して研究している。

一方、EMT は EMT-TF(EMT 転写因子)と呼ばれる 2-3 種類の転写因子で制御されている。その中で、乳癌細胞では ZEBs(ZEB1 と ZEB2)がもっとも悪性度と正の相関を示していることをすでに報告

している。本研究で口腔癌の悪性度や EMT phenotype と比較すると、乳癌細胞と同様に ZEB1 が最も正の相関を示した(図 1)。そこで、ZEB1 の発現を制御するような転写因子を検索したところ、ETS1 が ZEB1 のプロモータ活性を強力に増強することがわかった。ETS1 は ETS ファミリーのプロトタイプであり、その他の因子でも同様に検討すると、上皮細胞に比較的特異的に発現する ESE1 は逆に ZEB1 プロモータ活性を抑制した。ETS1 が ERK の活性化に依存して発現が上昇するのに対し、ESE1 は ERK 阻害剤 (U0126) で発現が低下した(図 2)。したがって、図 3 のような分子機構で ZEB の発現が制御されていることが明らかとなった。さらに未分化性の癌細胞ではこのような ERK シグナル系が恒常的に活性化されており ZEB などの発現が高く維持されて

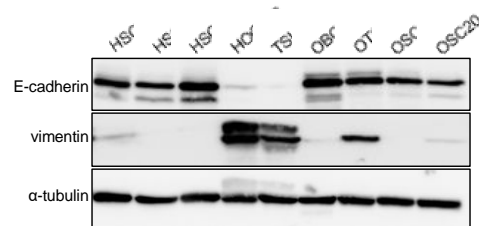


図1: 口腔癌細胞におけるZEBの発現

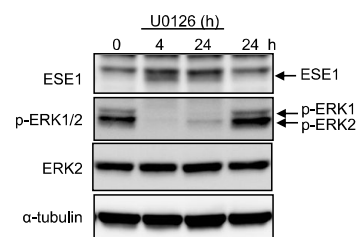


図2: ERKによるESE1発現制御

いることもわかった。またその高発現維持には FGF 受容体の選択的スプライシング isoform の FGFRc が高く発現していることがわかった。ごく最近 c-isoform のみを検出できる抗体が、論文で発表され、それを入手し、EMT 分化マーカーとして機能するかどうか、また、ZEB の発現に対する影響などを今後調べる予定である。さらにこれらの分子の病理学的な検証を継続して研究している。

一方、EMT 獲得細胞と血小板との相互作用を検討する実験の pilot study として、肉腫細胞を用い、転移能と血小板との関連性を検討した。中和抗体などで、マウスの血小板数を劇的に減少させると、転移能は低下した。そこで、現在肉腫細胞と血小板の相互作用を分子レベルで解析するとともに、EMT 獲得癌細胞や EMT 非獲得癌細胞などと血小板との相互作用にかんしても研究をすすめている。

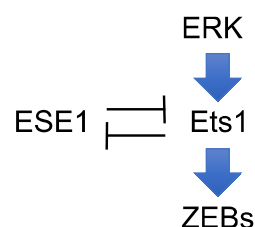


図3：ESE1によるZEBs発現制御

現在、原発巣のがん細胞は均一細胞群ではなく、形質の異なる細胞が混在する不均一 (heterogeneity) 細胞群であることが明らかとなり、的確な診断や治療を困難にしている。これら heterogeneity を形成するメカニズムのひとつとして EMT があり、本研究をさらに進展させることで、EMT の制御法の開発や、EMT 獲得癌細胞の検出などに応用できる。したがって、EMT によって悪性形質を獲得した一部のがん細胞を的確に診断し、制御できれば画期的な治療法として期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. J Biochem. 2018 Oct 1;164(4):257-264 doi: 10.1093/jb/mvy047. 査読有り
2. Suzuki K, Kawataki T, Endo K, Miyazawa K, Kinouchi H, Saitoh M. Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade. Oncol Lett. 2018 16:1758-1764 doi: 10.3892/ol.2018.8852. 査読有り
3. Nakamura R, Ishii H, Endo K, Hotta A, Fujii E, Miyazawa K, Saitoh M. Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells. PLoS One. 2018 Jul 3;13(7):e019944 doi: 10.1371/journal.pone.0199442. 査読有り
4. Furuya S, Endo K, Takahashi A, Miyazawa K, Saitoh M. Snail suppresses cellular senescence and promotes fibroblast-led cancer cell invasion Febs OpenBio 2017 7:1586-1597 doi: 10.1002/2211-5463.12300. 査読有り
5. Sinh ND, Endo K, Miyazawa K, Saitoh M. Ets1 and ESE1 reciprocally regulate expression of ZEB1/ZEB2, dependent on ERK1/2 activity, in breast cancer cells. Cancer Sci. 2017 108:952-960 doi: 10.1111/cas.13214. 査読有り
6. Saitoh M., Endo K, Furuya S, Minami M, Fukasawa A, Imamura K, Miyazawa K. STAT3 integrates cooperative Ras and TGF- β signals that induce Snail expression Oncogene 2016 35:1049-1057 doi: 10.1038/onc.2015.161. 査読有り
7. Hoshi Y, Endo K, Shirakihara T, Fukagawa A, Miyazawa K, Saitoh M. The potential role of regulator of G-protein signaling 16 in cell motility mediated by δ EF1 family proteins. FEBS Lett. 2016 590:270-278 doi: 10.1002/1873-3468.12042. 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1 . 坂本要、宮澤恵二、斉藤正夫 頭頸部癌細胞における ZEB と ETS ファミリー分子の機能解析 第 77 回日本癌学会総会 2018 年 9 月 28 日 大阪

- 2 . 斉藤正夫 がんの heterogeneity と EMT シグナル 日本口腔外科学会関東地方会 2018年 5月 26日 甲府
- 3 . Masao Saitoh Ets1 and ESE1 reciprocally regulate expression of ZEB1/ZEB2, dependently on ERK1/2 activity, in breast cancer cells The 8th International EMT Meeting Houston, Texas, USA - December 7-10, 2017
- 4 . 斉藤正夫 がんの heterogeneity と EMT シグナル 第 54 回日本口腔組織培養学会学術大会 2017 年 11 月 4 日 盛岡
- 5 . 斉藤正夫 癌における Ets1 ファミリー分子の機能解析 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 2017 年 9 月 18 日 松本
- 6 . 斉藤正夫、宮澤恵二 乳癌細胞における ZEB1/ZEB2 の発現調節機構 第 21 回 日本がん分子標的治療学会学術集会 2017 年 6 月 15 日 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石井 裕貴

ローマ字氏名：Hiroki Ishii

研究協力者氏名：坂本 啓

ローマ字氏名：Kei Sakamoto