

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15740

研究課題名(和文) 口腔癌のEMTを制御するマスター遺伝子の探索と新規口腔癌治療戦略

研究課題名(英文) Explore for master regulator of EMT in oral cancer

研究代表者

常松 貴明 (TSUNEMATSU, Takaaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：70726752

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)：癌の浸潤・転移過程において、EMT(上皮間葉移行)と呼ばれる現象が重要なステップであることが明らかとなってきた。興味深いことに口腔扁平上皮癌には紡錘細胞癌という明らかにEMTの性質を有する癌が存在する。本研究では、我々が過去に樹立した紡錘細胞癌細胞株を用いて、EMTを誘導する強力な因子を探索することを目的として研究を行った。研究期間内には特定の遺伝子の道程には至らなかったものの、上皮様形質を獲得した際に蛍光タンパク質が光る紡錘細胞癌細胞株を樹立したため、今後、本細胞株を用いて特定の遺伝子の道程に取り組む予定である。

研究成果の概要(英文)：It is known that Epithelial Mesenchymal Transition, EMT is important step in cancer invasion and metastasis. Interestingly, there are spindle cell carcinoma with EMT phenotype known as the subtype of oral squamous cell carcinoma. In this study, we tried to explore the master regulator of EMT by using spindle cell carcinoma cell lines which we previously established. We could not identify the master regulator of EMT but established the spindle cell carcinoma cell line with reporter gene. In future, we try to identify the master regulator of EMT by using this reporter cell line.

研究分野：実験腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌 EMT

1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移は、口腔癌の予後を規定する最も重要な因子である。なかでも、上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal transition: EMT) と呼ばれる現象がその重要なステップであることが明らかとなった。EMTと癌細胞が上皮としての性質を喪失し、間葉系の形質を獲得する現象であり、運動能及び浸潤能亢進を介して、癌転移を促進し、結果的に予後の増悪につながる。

癌細胞がEMTを起こすと、細胞間接着因子であるE-cadherin 発現低下、間葉系マーカーである vimentin、N-cadherin 発現上昇などの細胞内遺伝子発現がダイナミックに変化することが報告されている。これまで EMTの誘導には、主にE-cadherin転写を抑制するSNAI1、NAI2,ZEB1,ZEB2, TWISTなど転写因子が関与することが知られている。しかしながら、他臓器の癌での報告と異なり、我々の予備検討では口腔癌細胞株にこれらの転写因子を過剰発現させても明らかなEMTの誘導は観察されなかった。

以前、我々は口腔扁平上皮癌 頸部リンパ節転移巣からMSCC1細胞を樹立し(*Oral Oncology*,2003)、*in vitro* invasion assay法を応用し、高浸潤能を有するMSCC1-inv1細胞を分離した(*Clin Cancer Res*,2004)。興味深いことに、親株であるMSCC-1細胞が上皮様形態を呈するのに対して、高浸潤能を有するMSCC1-inv1細胞は間葉様の形態を呈していた。これまでに、これら2つ細胞株の遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較することによって、口腔癌浸潤に関わる新規因子をいくつか同定してきたが(*Cancer Res*,2006; *Clin Cancer Res*,2007; *PLoS One*,2011; *J Biol Chem*,2012; *PLoS One*,2012)、これらの因子の過剰発現によっても、口腔癌細胞株にEMTを誘導させることはできなかった。

従って、口腔癌においてEMTを強力的に誘導するマスター遺伝子は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

上述のように、口腔癌においてEMTを強力的に誘導するマスター遺伝子は未だ明らかになっておらず、口腔癌患者の予後を規定する因子である浸潤・転移を標的とした新たな治療法確立のため、その遺伝子の同定は急務であると考えられる。

興味深いことに口腔扁平上皮癌の亜型に紡錘細胞癌と呼ばれる明らかなEMTの性質を有する癌が存在する。我々は以前に紡錘細胞癌細胞株を樹立しており、その細胞株が間葉様性質と高い浸潤性を有することから、この腫瘍型では何らかの因子がEMTを強力的に誘導していると考えている。

そこで本研究では、この紡錘細胞癌細胞株を用いて、EMTを強力的に誘導するマスター遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、我々が樹立したEMTの形質を有する紡錘細胞癌細胞株においてEMTを強力的に誘導するマスター遺伝子が働いていると仮定し、これら細胞株に対し、ゲノム規模のshRNA libraryをレンチウイルスによって遺伝子導入し、これらが間葉様の特徴を喪失し、上皮様の形質(E-cadherin発現の誘導)を再び取り戻すことを指標に EMTを強力的に誘導していたマスター遺伝子の同定を試みた。

具体的には、紡錘細胞癌細胞株が上皮様の形質(E-cadherin発現の誘導)を再び取り戻した場合にそれを検出するための細胞株の改変を行ってきた。

4. 研究成果

(1)EMT形質を有する紡錘細胞癌細胞株

紡錘細胞癌は、口腔扁平上皮癌の稀な亜型であり、病理学的に多形性に富む紡錘形細胞びまん性増殖よりなる肉腫様腫瘍であるが、真の肉腫でなく上皮性マーカーであるサイトケラチンを発現していることなどから口腔粘膜上皮に由来すると考えられている。

我々は全身性に多発転移をきたした高悪性度の紡錘細胞癌2症例より、それぞれ細胞株を樹立した。興味深いことに、これら細胞はその臨床病態に一致して、明らかな間葉様形質と高い浸潤能を示した(図1)。

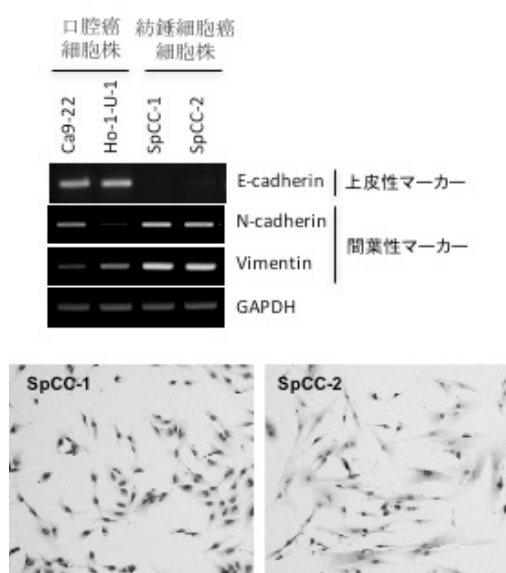


図1:SpCC(紡錘細胞癌細胞株)は紡錘形を呈する。遺伝子発現は、上皮性マーカーであるE-cadherinの喪失と間葉性マーカーの上昇を示す。

(2)紡錘細胞癌細胞株の改変

我々は、近年注目を集めているゲノム編集技術であるCRISPRに着目し、上皮性マーカーとして最も研究で使用されているE-cadherin遺伝子の染色体上の下流に、IRES(internal ribosomal entry site)とGFP cDNAを挿入し、上皮様形質を獲得した際に、GFPが発現し、蛍光を発する用に改変することを試みた。

CRISPRによるE-cadherin遺伝子の下流の切断の確認やIRES(internal ribosomal entry site)とGFP cDNAを挿入するための相同組み換えを

誘導するTargeting vectorの作成に成功したが、実際に紡錘細胞癌細胞株で実験を行なったが、目的の改変細胞は得られなかった。最近の知見として、細胞株によって相同組み換えを起こす頻度が大きく異なっていることが報告されており、頻度の低い細胞株ではゲノム編集技術を用いた遺伝子改変が困難である可能性が考えられている。我々が使用した紡錘細胞癌細胞株も相同組み換えの頻度が極めて低い可能性があり、その原因で改変細胞が得られなかった可能性を考えた。

そこで、ゲノム編集による染色体上への遺伝子の挿入が困難と考え、改変の方法を変更した。具体的な方法としては、約3kbpのE-cadherin promoter領域を同細胞株からクローニングし、pGreenFire Lenti-Reporterベクター(SBI社)に挿入し、promoterの下流にGFP cDNAが連結されたレンチウイルスベクターを作成した。このベクターを用いて、レンチウイルスを作成し、E-cadherinを発現する293細胞に感染させたところ、GFPの発現を認め、レポーターベクターの作成に成功した。レンチウイルスをベースとした遺伝子導入を用いているため、E-cadherin promoter領域とGFP cDNAが染色体上にランダムに挿入されると考えられる。さらにウイルスを作成し、紡錘細胞癌細胞株にも遺伝子導入を行ない、レポーター細胞株を得た。紡錘細胞癌細胞株はE-cadherinの発現を有さないため、遺伝子導入によってGFPの発現は認めなかった。

研究期間中に、当初の目的であるshRNA libraryを用いた口腔癌のEMTを誘導するマスター遺伝子のスクリーニングには至らなかったものの、スクリーニングに用いるためのレポーター細胞を樹立したため、今後スクリーニングを実施する予定である。

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 4 件)

1. Kujiraoka S, Tsunematsu T, Sato Y, Yoshida M, Ishikawa A, Tohyama R, Tanaka M, Kobayashi Y, Kondo T, Ushio A, Otsuka K, Kurosawa M, Saito M, Yamada A, Arakaki R, Nagai H, Nikai H, Takeuchi K, Nagao T, Miyamoto Y, Ishimaru N, Kudo Y. Establishment and characterization of a clear cell odontogenic carcinoma cell line with EWSR1-ATF1 fusion gene. *Oral Oncol.* June;69:46-55. 2017. (査読あり)
2. Ando T, Kudo Y, Iizuka S, Tsunematsu T, Umehara H, Shrestha M, Matsuo T, Kubo T, Shimose S, Arihiro K, Ogawa I, Ochi M, Takata T. Ameloblastin induces tumor suppressive phenotype and enhances chemosensitivity to doxorubicin via Src-Stat3 inactivation in osteosarcoma. *Sci Rep.* Jan 5;7:40187. 2017. (査読あり)
3. Tsunematsu T, Fujiwara N, Yoshida M, Takayama Y, Kujiraoka S, Qi G, Kitagawa M, Kondo T, Yamada A, Arakaki R, Miyauchi M, Ogawa I, Abiko Y, Nikawa H, Murakami S, Takata T, Ishimaru N, Kudo Y. Human odontogenic epithelial cells derived from epithelial rests of Malassez stem cell properties. *Lab Invest* Oct;96(10):1063-75. 2016. (査読あり)
4. Obayashi M, Yoshida M, Tsunematsu T, Ogawa I, Sasahira T, Kuniyasu H, Imoto I, Abiko Y, Xu D, Fukunaga S, Tahara H, Kudo Y, Nagao T, Takata T. MicroRNA-203 Suppresses Invasion and Epithelial-mesenchymal Transition Induction via Targeting NUA1 and SNAI2 in Head and Neck Cancer. *Oncotarget.* Jan 22, 2016. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. 常松貴明、タンパク質のユビキチン分解を介した細胞周期と分化の制御機構の解明、第 2 回口腔医科学フロンティア研究会(ZAO センタープラザ・山形・蔵王)、2017 年 3 月 5 日
2. 常松貴明、癌の発生・進展に関する分子病理学的研究、第 105 回日本病理学会総会(仙台国際センター・宮城・仙台)、2016 年 5 月 12-14 日

[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
<http://plaza.umin.ac.jp/pathol2/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
常松 貴明 (TSUNEMATSU, Takaaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：70726752
- (2) 研究分担者
工藤 保誠 (KUDO, Yasusei)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：50314753
- (3) 連携研究者
石丸 直澄 (ISHIMARU, Naozumi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：60314879
- (4) 連携研究者
新垣 理恵子 (ARAKAKI, Rieko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：00193061