

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592526

研究課題名（和文） 口腔癌の浸潤・転移を制御する上皮整合性機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of epithelial integrity system in tumor invasion and metastasis of oral cancer

研究代表者

東川 晃一郎 (HIGASHIKAWA KOICHIRO)

広島大学・病院・講師

研究者番号：80363084

研究成果の概要（和文）：口腔癌の浸潤・転移の過程において EMT 現象が重要である。Snail が多くの標的遺伝子の転写を制御し、それら標的遺伝子産物が機能して多くの現象が生じることで EMT が成立する。その中で、上皮細胞が間葉細胞に変化する過程において細胞間接着が失われて上皮整合性が崩れることに注目し、その詳細を解析した。口腔扁平上皮癌細胞株にウイルスベクターで Snail を強制発現させた細胞プールを作成し、それら細胞に遊走スペースを与えることで EMT を継時的に再現する系を確立した。細胞間接着因子 E-カドヘリンの発現と局在および p63 の発現で上皮整合性の喪失を検索したところ、EMT は多段階であり、完全な細胞間接着は EMT の最終段階であること、また成長因子などの液性因子でこの段階まで誘導できることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is involved in tumor invasion and metastasis of oral squamous cell carcinomas (SCCs). Snail, a transcription factor and EMT inducer, directs transcription of its target genes for the acquisition of EMT in SCC cells. We focused a process of loss of epithelial integrity among SCC cells during the EMT. For the investigation of that, we generated SCC cell pools of forced Snail expression by recombinant virus infection system. Almost the cells displayed constant expression of exogenous Snail, however, a small population of the cells underwent EMT. The cells on culture dish were given the migration area and were escalated into EMT. Immunocytochemistry and immunoblot analyses showed that loss of epithelial integrity and cell-cell contact were the last step of EMT process and the process was accelerated by distinct humoral factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、上皮間葉移行、癌の浸潤・転移、p63、上皮整合性

### 1. 研究開始当初の背景

高度浸潤能を有し、予後の悪い高度悪性型の口腔癌には上皮間葉移行 (EMT) が生じている。転写因子 Snail は様々な標的遺伝子の発現を制御し、それら標的遺伝子産物が機能して多くの現象が生じることで EMT が成立する。その標的遺伝子の中で、上皮整合性に関わる p63 の発現が Snail によって抑制されることを以前に見出した。上皮細胞が間葉細胞に変化する過程において細胞間接着が失われて上皮整合性がどのように崩れるのかを詳細に検討する。

### 2. 研究の目的

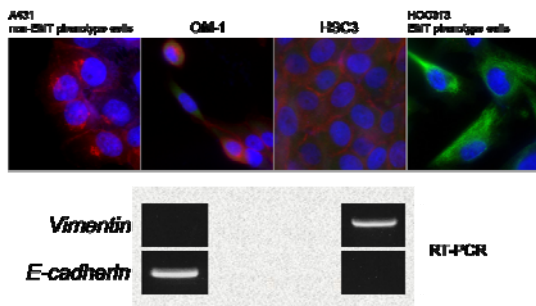
EMT の定義は上皮細胞が間葉細胞に変化する過程である。間葉細胞に変化した上皮細胞はバラバラとなり、個々の上皮細胞としてアイデンティティは失われ、細胞間接着を失って上皮細胞集団としての上皮構造も崩壊する。それには p63 の発現消失が重要であるが、EMT の過程においてその喪失がどのように生じるかを知ること、口腔癌の局所浸潤のメカニズムの理解と、それらを口腔癌の浸潤と悪性度との関連性を予測する要素として応用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株にウイルスベクターで Snail を強制発現させた細胞プールを作成し、それら細胞に遊走スペースを与えることで EMT を継時的に再現する系を確立し、その過程における上皮整合性の喪失について検討する。間葉細胞のマーカであるビメンチンと細胞接着因子 E-カドヘリンの抗体を用いて、蛍光免疫細胞染色を行い、それら発現と局在を調べ、EMT の過程の詳細を検討する。

### 4. 研究成果

How's the expressions of Vimentin and E-cadherin in every SCC cell lines? EMT or non-EMT phenotype?

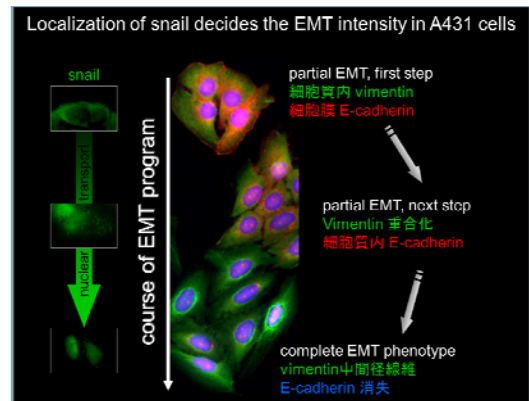


通常の上皮系扁平上皮癌 (SCC) 細胞株では、E-カドヘリンの発現は RT-PCR で確認でき、また蛍光免疫染色でその局在は細胞膜にあることが確認できる。ビメンチンは発現していない。逆に、EMT 型 SCC 細胞株ではビメン

チンが細胞膜に線維状に染色され、E-カドヘリンは発現していない。

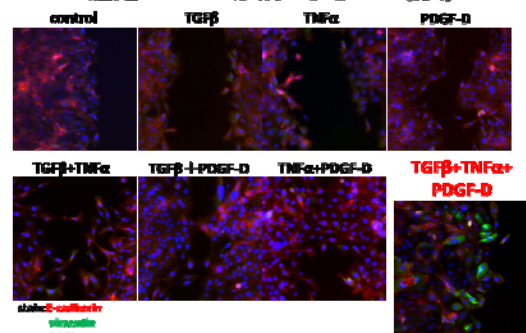
この現象は明確な非 EMT 型と EMT 型の違いであるが、多くの癌細胞、あるいは癌細胞株ではその境界は曖昧である。つまり、EMT の過程は多段階であり、また可逆性をもつ可能性が示唆される。

そこで通常のプラスミドベクターを用いた遺伝子強制発現・セクションする系ではなく、ウイルスベクターを用いた遺伝子強制発現系を用い、Snail を強制発現している癌細胞株のプールを作成した。



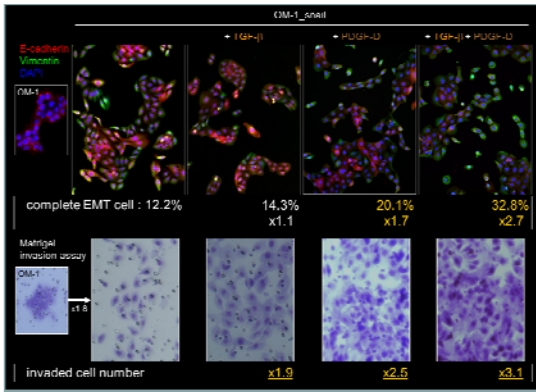
これら細胞は、様々なステップの状態の細胞が混在しており、EMT の過程は多段階であることが分かった。またコンフルエントになると、これら細胞には Snail が強制発現しているにもかかわらず、完全な EMT を生じている細胞はほとんどなく、細胞膜に E-カドヘリンが局在して細胞間接着が復活していた。しかし、コンフルエントの状態に細胞に遊走スペースを与えてやると、EMT のステップが進行していくことを見出した。

### OM-1細胞における液性因子刺激および遊走スペース形成による EMT 誘導

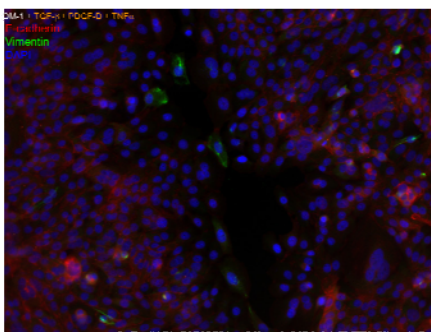


さらに、その EMT コースは液性因子で助長された。

これら結果は、人工的に Snail を強制発現させないと細胞に EMT が生じないわけではなく、液性因子刺激で癌細胞に EMT を誘導できる可能性が示唆された。



さらに、Snail 強制発現細胞において液性因子で EMT の誘導を制御でき、また EMT 型細胞の割合に比例して浸潤能も亢進した。

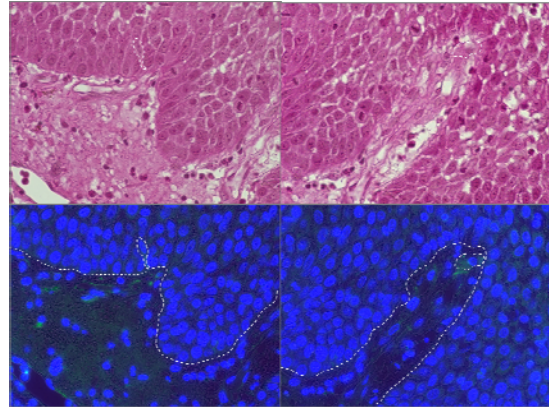


そこで、上皮系の SCC 細胞株に様々な液性因子で刺激することで EMT が誘導できること見出した。TGFβeta、PDGF、TNFalpha の同時刺激および遊走スペースの付与によって確実に上皮系癌細胞を間葉細胞に変化させることが可能となった。

液性因子による EMT 誘導には Snail の発現が誘導される癌細胞もあれば、Snail のファミリー遺伝子である Slug の発現も上昇する細胞、あるいは Slug のみ発現する細胞が混在しており、液性因子による EMT 誘導に責任をもつ EMT 誘導遺伝子の詳細は、今までの検索法では不明である。今後、Snail/Slug の関係性、そしてそれぞれの SCC の EMT 誘導における役割を理解することが重要であると考え、Snail だけではなく Slug 強制発現細胞プールの作成を計画している。

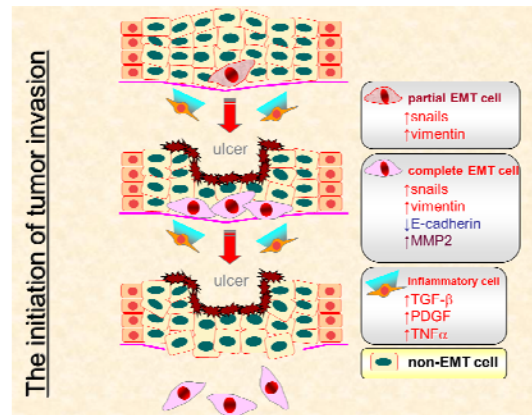
これらの結果は、癌細胞周囲の炎症など、癌細胞周囲の環境要因によって通常非 EMT 癌細胞から EMT 細胞が出現することを示唆する。多くの癌組織は上皮系性質をもつ癌細胞の集団であり、胞巣を形成して浸潤する病理組織学的像を示している。癌における EMT 研究は現在まで、EMT 型癌細胞の研究がほとんどであった。しかし最近、通常癌組織においても EMT 型癌細胞の存在が示唆され、非 EMT 型癌細胞と EMT 型癌細胞の相互関係が、癌の浸潤・転移の過程に重要であるという考えが浸透してきている。

上皮系 SCC 細胞株が液性因子によって EMT が誘導されるということは、SCC 組織においても EMT 型癌細胞が存在している可能性が十分ある。



そこで SCC 組織において EMT 癌細胞が存在するのか、ビメンチンで染色して確認した。結果、癌細胞集団の再外周、つまり間質と接している癌細胞に、EMT が生じていると考えられる癌細胞の存在が確認できた。

以上の結果をまとめると



癌細胞周囲には様々な要因によって炎症が惹起される。さらに増殖した癌細胞集団は栄養を求めて間質へ集団で（細胞間接着を保持したまま）足を延ばす。しかしながらそれは不十分であり、一部の癌細胞は壊死して潰瘍を形成する。それがまた癌細胞周囲に炎症をもたらし、さまざまな液性因子が放出される。ここまでは上皮内癌や、胞巣を形成する、いわゆる SCC のほとんどを占める上皮形質を保つ癌細胞集団としての SCC である。これら癌細胞は増殖の結果、さらに栄養を間質に求めるため、放出された液性因子を利用して EMT 型癌細胞が出現し、これからの間質への局所浸潤をリードする、という一つの SCC の局所浸潤のモデルが想定された。もちろん、上皮細胞から間質細胞へ変化する

のは細胞の個々レベルだけでなく、癌細胞集団としての上皮整合性が崩れることも重要であるが、そこで p63 をマーカーにして、上述の EMT コース、および SCC 検体を用いて検索したが、有意な結果は得られなかった。

よって、p63 が制御する上皮構造整合性が癌の局所浸潤過程における役割については未だ不明である。

これは、上皮系 SCC 癌細胞と de novo の EMT 型癌細胞との比較で得られた知見をそのまま今回の、EMT 型非 EMT 型癌細胞の混在する癌組織に直接応用できなかったためと考えられた。

つまり、当初想定していたようななどの段階で上皮整合性の喪失が生じているかなどの検討項目は、SCC の局所浸潤の成立の過程において意義ある結論は得られなかったため、改めて解析ストラテジーを検討する必要があると思われた。

#### 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. PGE(2) targets squamous cell carcinoma cell with the activated epidermal growth factor receptor family for survival against 5-fluorouracil through NR4A2 induction. **Shigeishi H, Higashikawa K, Hatano H, Okui G, Tanaka F, Tran TT, Rizqiawan A, Ono S, Tobiume K, Kamata N.** Cancer Lett. 307 (2): 227-36. 2011. (査読有り)

2. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, **Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K.** Lymphangiogenesis and metastasis: Role of tumor-induced lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease. Am J Pathol., 175(5):2235-48, 2009. (査読有り)

3. **Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, Higashikawa K, Kamata N.** Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. Int J Oncol., 34(6):1565-1571, 2009. (査読有り)

4. **Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, Shigeishi H,**

**Ono S, Kamata N.** DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. Int J Cancer., 124(12):2837-2844, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. **東川晃一郎**: 口腔癌の浸潤能診断 (シンポジウム「癌細胞の浸潤・転移」 第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 シンポジウム 2 「口腔癌治療における遺伝子診断の役割」 2011 年 4 月 21 日, 東京都)

2. 鎌田伸之, **東川晃一郎 (講演者)**, 飛梅圭: Snail による転写調節と EMT の誘導 (シンポジウム「Epithelial Mesenchymal Transition と腫瘍の転移・浸潤」 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 3 日, 横浜市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

**東川 晃一郎 (HIGASHIKAWA KOICHIRO)**  
広島大学・病院・講師  
研究者番号: 8 0 3 6 3 0 8 4

##### (2) 研究分担者

**鎌田 伸之 (KAMATA NOBUYUKI)**  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 7 0 2 4 2 2 1 1

**飛梅 圭 (TOBIUME KEI)**  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 4 0 3 5 0 0 3 7

**重石 英生 (SHIGEISHI HIDEO)**  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 9 0 3 9 7 9 4 3

##### (3) 連携研究者

**小野 重弘 (ONO SHIGEHIRO)**  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 7 0 3 7 9 8 8 2