

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592537

研究課題名(和文) 頭頸部癌の浸潤・転移における EMT による癌幹細胞活性化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cancer stem cell activation mechanism by EMT in invasion and metastasis of head and neck cancer

研究代表者

太田 一郎 (Ota, Ichiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00326323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌細胞において、Wnt/Snailのシグナル伝達経路がEMT(上皮間葉移行)を誘導し、癌幹細胞の活性化を促進し、癌の浸潤・転移を亢進させるかどうかを検討した。その結果、Wnt/Snailのシグナル伝達経路がEMTを誘導し癌の浸潤・転移を促していることをin vitro、およびin vivoにおいて見出した。さらに、SnailによりEMTを誘導された癌細胞は、癌幹細胞マーカーの発現や治療抵抗性の増強など癌幹細胞様特性の獲得も見出された。今後、EMTに関わるこれらのシグナル伝達経路を制御することは頭頸部癌の浸潤・転移を制御することに繋がると考えられ、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In head and neck cancer cells, we investigated whether Wnt/Snail signaling pathway could induce epithelial-mesenchymal transition, EMT, promote the activation of cancer stem cells, and enhance cancer cell invasion and metastasis. As a result, it was found in the in vivo and in vitro study that Wnt/Snail signaling pathway could induce cancer invasion and metastasis through EMT. In addition, the cancer cells induced EMT by Snail could acquire the cancer stem cell-like properties, such as enhancement of treatment-resistant and expression of cancer stem cell marker. Controlling these signaling pathways involved in EMT will lead to controlling the invasion and metastasis of head and neck cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部がん 癌幹細胞 浸潤・転移 EMT

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌において、これまでの治療の進展により臓器温存を含めて患者の QOL は改善しつつあるものの、生存率の大きな改善に至っていないのが現状である。その死因の多くは局所再発と遠隔転移であり、つまり、いかに癌の浸潤・転移を制御するかが治療の要と考えられる。

(2) 癌が浸潤・転移していく過程で、上皮の基底膜や周囲の間質を突き破り増殖していくためにはタンパク質分解酵素が必要であり、特にその浸潤・転移のあらゆる局面において Matrix metalloproteinase (MMP) が関与していると言われている (Matrisian LM, *et al.* J Clin Oncol. 18:1135-1149, 2000)。我々は、これまでに、とりわけ細胞膜結合型の MMP である MT1-MMP が、癌細胞自身に強発現し、癌細胞の浸潤・転移の直接的な担い手になっていることを報告してきた (Sabeh F, Ota I, *et al.* J Cell Biol. 167:769-781, 2004)。さらに、Wnt シグナル伝達経路が Snail を介して EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮間葉移行) を誘導することで、MT1-MMP 及び MT2-MMP を誘導し、癌細胞の浸潤・転移能を獲得させることを見出してきた (Ota I, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 106:20318-20323, 2009; Yook JI, Ota I, *et al.* Nat Cell Biol. 8:1398-1406, 2006; Yook JI, Ota I, *et al.* J Biol Chem. 280: 11740-11748, 2005)。

(3) 近年、白血病に端を発し、乳癌、脳腫瘍、そして頭頸部癌などの多くの腫瘍において、次々に“癌幹細胞”が同定されてきた (Prince ME, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 104: 973-978, 2007)。癌幹細胞とは、正常幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を有し、癌幹細胞集団を維持しつつ、癌組織を構成する多様な分化段階にあるすべての癌細胞を生みだすと考えられている (Clarke MF, *et al.* Cancer Res. 66: 9339-9344, 2006; Reya T, *et al.* Nature 414: 105-111, 2001)。さらに、癌幹細胞は、通常の癌治療には抵抗性で、癌の浸潤・転移や再発の原因と考えられている。しかしながら、そのメカニズムについては未だ解明されていないものの、最近、頭頸部癌幹細胞において EMT の制御因子である Snail が亢進していることが報告され (Chen YC, *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 385:307-313, 2009)、EMT は、癌の浸潤・転移の Key Factor であるとともに、癌幹細胞の重要な制御因子であることが示唆された。

(4) つまり、EMT をはじめとする癌幹細胞の制御因子を標的とした治療法の開発がすすめば、癌の浸潤・転移抑制を含めた根本的治療となり、癌を根治できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では頭頸部癌の治療効果の向上のため、癌細胞の浸潤・転移のしくみを解明し、そのしくみを基に浸潤・転移を阻止すること

を目的としている。我々が開発した癌浸潤・転移モデル実験系を用いて、Wnt/Snail のシグナル伝達経路が EMT を誘導し、癌幹細胞の活性化を促進し、癌の浸潤・転移を亢進させるかどうかを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子導入細胞の作製

頭頸部扁平上皮癌細胞 (UM-SCC-1、HSC3、HSC4、SAS など) に、control vector (PCR3.1Uni; Invitrogen)、およびヒト Wnt1 あるいはヒト Snail の cDNA を PCR3.1Uni に組込んだ vector を Fugene6 (Roche) を用いて遺伝子導入し、それぞれの遺伝子が強発現した細胞を用いる。

また、siRNA によるヒト Wnt1 あるいはヒト Snail の発現抑制はコントロールを含め、electroporation 法 (Amaxa Biosystems) で細胞内に導入する。その導入効率は蛍光の nucleotide で 90% 以上あることを確認している。また siRNA の抑制効果は導入後 20 時間から 72 時間まで維持できることも確認している (Sabeh F, Ota I, *et al.* J Cell Biol. 167:769-781, 2004)。

### (2) 生化学的な機能解析

これらの細胞を用いて、細胞内での Wnt、Snail、MT1-MMP の発現、相互作用をウェスタン・ブロット、免疫沈降法、レポーターアッセイなどを用いて検討する。

### (3) 癌幹細胞の同定

上記遺伝子導入細胞において、CD44、ALDH などの癌化細胞マーカーの同定、SP 細胞の同定、スフェロイド形成を確認することで癌幹細胞分画を同定する。

### (4) 癌細胞の浸潤能の評価

in vitro に関しては、遊走能を評価する方法として wound healing assay を、浸潤能の評価方法として、マトリゲル invasion assay を用いた。一方、in vivo に関しては、我々が開発した鶏卵を用いた in vivo 癌浸潤・転移モデル chick chorioallantoic membrane assay (CAM assay) で生体での浸潤・転移能を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 頭頸部癌細胞における Snail による EMT の誘導と浸潤能の亢進 (in vitro)

頭頸部癌細胞 (SAS, HSC-4 など) に Snail を強制発現させると、細胞間接着分子 E-Cadherin の発現が抑制される一方、vimentin などの間葉系マーカーが発現増強するとともに、細胞形態も繊維芽細胞様に変化し、EMT が誘導された。さらに、EMT の誘導による細胞遊走能、浸潤能の増強について、それぞれ wound healing assay、および Matrigel invasion assay を用いて検証した結果、Snail を導入した頭頸部癌細胞は、優位に遊走能・浸潤能の亢進が認められた。

(図 1、2)

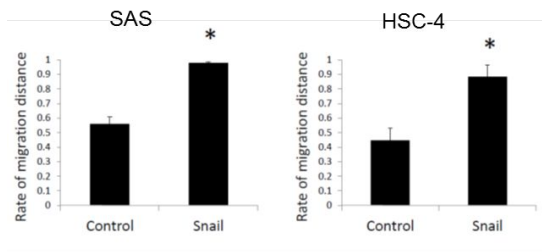


図1 wound healing assay

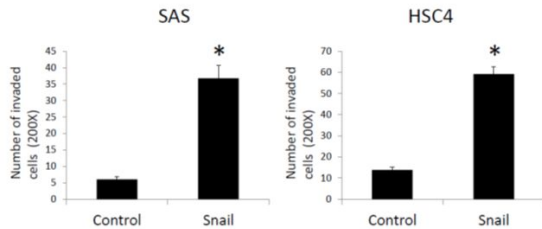


図2 Matrigel invasion assay

## (2) 頭頸部癌細胞における Snail による浸潤能の亢進 (*in vivo*)

頭頸部癌細胞 (SAS, HSC-4 など) に Snail を強制発現させ、CAM invasion assay で生体での浸潤能を検証すると、コントロールに比して有意にその浸潤能が亢進した。

## (3) 頭頸部癌細胞における Snail による癌幹細胞様特性の獲得

Snail によって EMT 特性が誘導された頭頸部癌細胞において、頭頸部癌幹細胞マーカーである CD44、ALDH1 に加え、Bmi-1、Nanog、ABCG2 などの幹細胞マーカーの発現上昇も認められた。さらに Snail 導入株において sphere 形成能などの癌幹細胞様特性も観察された。

## (4) 頭頸部癌細胞における Snail による抗がん剤、放射線抵抗性の獲得

Snail によって EMT 特性が誘導された頭頸部癌細胞において、シスプラチンなどの抗がん剤、および放射線に対して抵抗性を示した。

以上の結果から、頭頸部癌細胞において Wnt/Snail シグナル経路により誘導された EMT を介して癌細胞は癌幹細胞様特性を獲得することで、治療抵抗性および浸潤・転移能が亢進していることが示唆された。したがって、EMT に関わるこれらのシグナル伝達経路を制御することは頭頸部癌の浸潤・転移を制御することに繋がると考えられ、本研究が今後の癌浸潤・転移抑制薬の創薬への試金石となり得ることが期待できる。

## 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 8件)

Masui T, Ota I, Yook JI, Mikami S, Yane

K, Yamanaka T, Hosoi H: Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *Int J Oncol.* 44: 693-699, 2014. 査読有

Uemura H, Ota I, Fujii T, Suzuki M, Sakai M, Nakanishi K, Tomita Y, Noguchi A, Hosoi H, Yoshino K: Sentinel Lymph Node Detection in Patients with Oral Cancer by MR Lymphography using Superparamagnetic Iron Oxide. *The Open Otorhinolaryngology Journal.* 7:14-18, 2013. 査読有

Ota I, Higashiyama S, Masui T, Yane K, Hosoi H, Matsuura N: Heparin-binding EGF-like growth factor enhances the activity of invasion and metastasis in thyroid cancer cells. *Oncol Rep.* 30: 1593-1600, 2013. 査読有

Masui T, Ota I, Itaya-Hironaka A, Takeda M, Kasai T, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Mikami S, Yane K, Takasawa S, Hosoi H: Expression of REG III and prognosis in head and neck cancer. *Oncol Rep.* 30: 573-578, 2013. 査読有

Nakagawa Y, Takahashi A, Kajihara A, Yamakawa N, Imai Y, Ota I, Okamoto N, Mori E, Noda T, Furusawa Y, Kirita T, Ohnishi T: Depression of p53-independent Akt survival signals in human oral cancer cells bearing mutated p53 gene after exposure to high-LET radiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 423(4):654-60, 2012. 査読有

Yoo JY, Choi HK, Choi KC, Park SY, Ota I, Yook JI, Lee YH, Kim K, Yoon H: Nuclear hormone receptor corepressor promotes esophageal cancer cell invasion by transcriptional repression of interferon- $\gamma$ -inducible protein 10 in a casein kinase 2-dependent manner. *Mol Biol Cell.* 23(15):2943-2954, 2012. 査読有

Ota I, Okamoto N, Yane K, Takahashi A, Masui T, Hosoi H, Ohnishi T: Therapeutic strategies for head and neck cancer based on p53 status. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 3: 585-591, 2012. 査読有

Okamoto N, Takahashi A, Ota I, Ohnishi K, Mori E, Kondo N, Noda T, Nakagawa Y, Uemura H, Yane K, Hosoi H, Ohnishi T: siRNA targeted for *NBS1* enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Int J Hyperthermia.* 27:297-304, 2011. 査読有

[学会発表](計 13件)

Ota I, Masui T, Uemura K, Kanno M, Yane K, Hosoi H: Low-intensity ultrasound enhances the anti-cancer activity of cetuximab in human head and

neck cancer cells. III Eurasian Head & Neck Cancer Forum 25-28 July 2013, St. Petersburg, Russia

太田一郎、榊井貴史、三上慎司、細井裕司: 糖尿病と癌の進展 - 高血糖は癌の浸潤を促進させる - 日本耳鼻咽喉科学会総会 2013年5月18日、札幌市

榊井 貴史、太田 一郎、広中 安佐子、武田 麻衣子、笠井 孝彦、山内 晶世、土田 澄代、高沢 伸、細井 裕司: 下咽頭癌における *REGIII* の発現と治療感受性. 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013年6月4日、東京都

太田一郎: がん研究 UP TO DATE 2013 世界の基礎研究の動向. 第7回頭頸部癌基礎研究会 2013年6月3日、東京都

太田一郎、榊井貴史、三上慎司、細井裕司: 糖尿病と癌の進展 - 高血糖は癌の浸潤を促進させる(1) - 日耳鼻大阪地方連合会 327 回例会 2013年12月7日、大阪市

Ota I, Masui T, Yane K, Okamoto N, Hosoi H: Snail1 regulates MMP-dependent invasive activities through cancer cell EMT programs in head and neck cancer cells. the 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery April 12-14, 2012, Kyoto, Japan

Masui T, Ota I, Kanno M, Hosoi H: Low-intensity ultrasound enhances anti-cancer effect of cetuximab on apoptosis induction in human head and neck cancer cells. the 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery April 12-14, 2012, Kyoto, Japan

Ota I, Masui T, Yane K, Okamoto N, Hosoi H: Snail1 regulates MMP-dependent invasive activities through cancer cell EMT programs in head and neck cancer cells. 8th International Conference on Head & Neck Cancer, July 21 - 25, 2012, the Metro Toronto Convention , Centre in Toronto, Ontario, Canada

太田一郎 榊井貴史 神野正敏 家根 旦有 細井裕司: 超音波照射による EGFR をターゲットにした分子標的治療 Cetuximab の増感効果の検討. 第 36 回 日本頭頸部癌学会 2012年6月7日、松江市

榊井貴史、太田一郎、高沢 伸、細井裕司: 下咽頭癌における REG 遺伝子ファミリーの発現と予後. 第 36 回 日本頭頸部癌学会 2012年6月7日、松江市

太田一郎: がん研究 UP TO DATE 2012 世界の基礎研究の動向. 第6回 頭頸部癌基礎研究会 2012年6月6日、松江市

太田一郎 榊井貴史 神野正敏 家根 旦有 細井裕司: 頭頸部癌細胞における EGFR をターゲットにした分子標的治療の超音波照射による増感効果. 第 18 回 国際癌増感研究会 2012年6月9日、吹田市

Masui T, Ota I, Kanno M, Hosoi H: Combination of cetuximab and low-intensity ultrasound causes a synergistic enhancement in cell killing and an additive enhancement in apoptosis induction in human head and neck cancer cells. The 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Dec 8, 2011, Kobe, Japan

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.narmed-u.ac.jp/~oto/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

太田 一郎 (OTA, Ichiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 00326323

### (2)研究分担者

高橋 昭久 (TAKAHASHI, Akihisa)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授

研究者番号 : 60275336