

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592968

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の低酸素環境における EMT の解明と治療標的としての意義

研究課題名(英文) Significance as a therapeutic target and elucidation of EMT in a low oxygen environment of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

石田 喬之 (Ishida, Takayuki)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20404501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円、(間接経費) 1,140,000 円

研究成果の概要(和文)：口腔癌細胞株を低酸素環境と通常環境で培養し、運動能と浸潤能、E-cadherin の発現を比較した。結果、低酸素環境での亢進を認め、Notch 阻害薬を添加することでそれらは抑制された。また Notch 阻害薬のまたリアルタイム PCR にて Notch 関連因子の発現を調べたところ、低酸素環境で Notch 関連因子の発現の亢進を認めた。以上より低酸素環境は Notch 経路を介して口腔癌細胞株に EMT を誘導している可能性が示唆され、口腔癌の転移抑制の治療標的になりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We compared invasion and motility and expression of E-cadherin in oral cancer cell lines cultured in a normal environment and low oxygen environment. They were increased in a low oxygen environment, but suppressed by the addition of Notch inhibitors. We examined the expression of Notch-related factors in the real time PCR, showed an enhanced expression of Notch signaling in a low-oxygen environment. These results suggested possibility that induce EMT in oral cancer cell lines via the Notch pathway by low oxygen environments, and might suggest Notch pathway to be a therapeutic target for inhibiting metastasis of oral cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌 低酸素 EMT Notch

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌(OSCC)において転移の有無は最も予後に関わる因子であり、転移の機序を明らかにし、その制御が可能となれば治療成績は飛躍的に向上すると考えられる。癌細胞が転移を起こすためには周囲組織や血管、リンパ管への浸潤能が必要であるが、近年上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition: EMT)が癌の浸潤・転移能の獲得に関与していることが報告されている。EMTを起こした癌細胞は E-cadherin など細胞接着因子の発現が低下し、vimentin などの間葉系細胞マーカーの発現が上昇し、間葉系細胞様性質を獲得することで走化能や浸潤能が増大し、転移能を獲得すると考えられている。さらに EMT は TGF- β 、Notch、Wnt、Sonic hedgehog など様々な経路を介して起こることが明らかにされている。

(1) Notch シグナルと EMT

申請者らは OSCC 細胞株における Notch シグナルがそのターゲット遺伝子 Hes1 を介して細胞増殖を促進していることを見出した。Notch はまたその他に様々な経路を介して細胞の増殖、アポトーシス、EMT に関与している。Notch の標的遺伝子である snail は細胞接着に重要な E-cadherin の発現を抑制するが、それにより EMT を誘導すると考えられている。

(2) 低酸素状態と EMT

癌の浸潤・転移能は癌細胞の性質によるものだけでなく、それを取り巻く微小環境により修飾される。特に低酸素状態では癌細胞はその過酷な環境に適応するため、低酸素誘導因子(HIF-1 α)を産生する。HIF-1 α は様々な遺伝子の転写因子として機能し、その標的遺伝子の発現によって抗癌剤抵抗性や転移能が亢進すると考えられている。

Cecilia らは OSCC 細胞株を除く子宮頸癌、大腸癌、前立腺癌の細胞株とグリオーマなど種々の細胞株を用いて、HIF-1 α が Notch 細胞内ドメイン(NICD)と複合体をつくり、LOX や snail の転写因子として働くという仮説を提唱した(Cecilia S, et al. N PNAS.105:6392-7,2008)。つまり低酸素環境が Notch シグナルを亢進させ、癌細胞の EMT を誘導し、その結果、腫瘍の浸潤・転移能を亢進させている可能性を示した。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌(OSCC)の治療成績の向上のためには頸部リンパ節転移の制御が不可欠であり、そのためには転移のメカニズムを明らかにする必要がある。近年、癌細胞の浸潤・転移に上皮間葉移行(EMT)が重要な役割を果たしていることが報告されている。また癌周囲の低酸素環境が癌そのものの悪性度

に関連していることが報告されており、その機序の一つに低酸素環境が EMT を誘導すると考えられているが詳細は不明である。EMT を誘導する主な経路は TGF- β 、Notch、Wnt、Sonic hedgehog であることが種々の癌で明らかにされているが、OSCC におけるその機序は未だ不明な点が多い。申請者は今回、低酸素環境における Notch シグナルに着目し、OSCC 細胞株を用いて Notch シグナルが EMT に果たす役割を解明することにより、浸潤・転移のメカニズムを明らかにし、これらにかかわる分子・タンパク質を標的とした新規治療法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

OSCC 細胞株 HSC-2、HSC-4、Ca9-22、KON を正常酸素環境培養(20%O₂, 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C)と低酸素環境培養(5%O₂, 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C)でそれぞれ培養し以下の実験を行った。

細胞培養液は 10% FBS(CCB, ニチレイ Bioscience)、ペニシリン(100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml)とアムホテリシン B(0.25 μ g/ml)(Invitrogen)を添加した Minimum Essential Medium Eagle (Sigma Aldrich)を用いた。

(1) Scratch wound healing assay による走化能の比較

それぞれの細胞株を confluent に培養し、ピペットの先を用いて同一範囲の細胞を剥離し 24 時間後に浸潤してきた細胞数を位相差顕微鏡(CKX41; Olympus)を用いて 3 視野で計測し比較した。また低酸素環境では Notch 阻害薬である γ -secretase inhibitor(GSI)(Calbiochem)を 5 μ M 添加の有無でも比較した。

(2) invasion assay による浸潤能の比較

BioCoatTM MatrigelTM Invasion Chamber(BD)を用いた。8 μ m の多孔を持つ PET メンブレンのついたカルチャーインサート内にはそれぞれ 1.5 \times 10⁵個/ml に調節した血清を含まない細胞浮遊液を入れ、ウェルには誘引物質として 10%FBS を含んだ細胞培養液を入れ 24 時間後にマトリゲルを通過した細胞を diff quick 法にて染色し顕微鏡(BH 2; Olympus)を用いて 3 視野の細胞数を計測した。低酸素環境では GSI を 5 μ M 添加の有無でも比較した。

(3) 免疫組織学的染色による E-cadherin の発現の比較

口腔癌細胞株を 24 時間培養した後、4%パラホルムアルデヒド PBS で固定。10%血清と 0.1%トリトン X を含む PBS でブロッキングし、1 次抗体ラビット由来 E-cadherin ポリクローナル抗体(1:200; Calbiochem)、2 次抗体ヒツジ由来抗ラビット IgG 抗体(1:200; Chemicon)として免疫学的染色を行い E-cadherin の発現を比較した。

(4) qPCR による Notch 関連遺伝子および Snail の mRNA 発現量比較

それぞれの細胞を 24 時間した後、TRIzol

(Invitrogen)を用いて total RNA を抽出し、1µg の total RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (applied Biosystems)を用いて cDNA を作成した。qPCR は 2X SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems)を用いて Step One™ Real Time PCR system (Applied Biosystems)cDNA サンプルを計測した。計測した因子は Notch レセプターの Notch1-4、Notch リガンドの Jagged1 と DLL4、Notch ターゲット遺伝子位の HES-1 と HEY-1、EMT マーカーの snail とした。プライマー配列は

Notch-1;

Forward:5'-CAATGTGGATGCCGCAGTTGTG-3'

Reverse:5'-CCATCTGGGACTTCTTCCT-3',

Notch-2;

Forward:5'-AAAAATGGGGCCAACCGAGAC-3'

Reverse:5'-TTCATCCAGAAGGCGCACAA-3',

Notch-3;

Forward:5'-TCTTGCTGCTGGTCATTCTC-3'

Reverse:5'-TGCCTCATCTTTCAGTTG-3',

Notch-4;

Forward:5'-CACTGAGCCAAGGCATAGAC-3'

Reverse:5'-ATCTCCACCTCACACCACTG-3',

Jagged1;

Forward:5'-CGGGATTTGGTTAATGGTTATC-3'

Reverse:5'-ATAGTCACTGGCAGGTTGTAGCAC-3',

DLL4;

Forward:5'-TGACCACTTCGGCCACTATG-3'

Reverse:5'-AGTTGGAGCCGGTGAAGTTG-3',

HES-1;

Forward:5'-AGGCGGACATTCTGAAATG-3'

Reverse:5'-CGGTACTTCCCAGCACACTT-3',

HEY1;

Forward:5'-CGAGGTGAGAAGGAGAGTG-3'

Reverse:5'-CTGGGTACCAGCCTTCTCAG-3',

Snail;

Forward:5'-CATCTTCTCACTGCCATGGA-3'

Reverse:5'-AGGCAGAGGACACAGAACCAGA-3',

-actin;

Forward:5'-AAGAGATGGCCACGGCTG-3'

Reverse:5'-GAACCGCTCATTGCCAATG-3'

とした。計測した発現量は -action をコントロールとして比較した。

統計学的分析は student-t 検討を用いて p<0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) Scratch wound healing assay による走化能の比較

すべての OSCC 細胞株において低酸素環境で有意に走化能が有意に亢進した。また HSC-2、HSC-4、Ca9-22 では GSI の添加により低酸素環境での走化能の亢進は阻害されたが KON のみ GSI 添加でも走化能に変化はなかった。

(2) invasion assay による浸潤能の比較

HSC-2、HSC-4、Ca9-22 で低酸素環境での浸潤能の亢進を有意に認めた。また GSI の添加により低酸素環境での浸潤能の亢進は阻害された。

(3) 免疫組織学的染色による E-cadherin の発現の比較

すべての OSCC 細胞株で低酸素環境で E-cadherin の発現の減弱を認めた。また GSI の添加により低酸素環境下での E-cadherin の発現の減弱は阻害された。

(5) qPCR による Notch 関連遺伝子および Snail の mRNA 発現量比較

Notch レセプター

Notch-1

低酸素環境では通常培養と比較し HSC-2 は 3.55 倍、HSC-4 は 2.37 倍、Ca9-22 は 0.78 倍、KON は 1.01 倍であった。

Notch-2

HSC-2 は 3.04 倍、HSC-4 は 1.32 倍、Ca9-22 は 2.45 倍、KON は 1.32 倍であった。

Notch-3

HSC-2 は 6.15 倍、HSC-4 は 1.69 倍、Ca9-22 は 1.53 倍、KON は 0.93 倍であった。

Notch-4

HSC-2 は 1.10 倍、HSC-4 は 0.79 倍、Ca9-22 は 2.97 倍、KON は 0.85 倍であった。

Notch リガンド

Jagged1

HSC-2 は 1.00 倍、HSC-4 は 1.80 倍、Ca9-22 は 1.76 倍、KON は 1.07 倍であった

DLL4

HSC-2 は 2.17 倍、HSC-4 は 1.33 倍、Ca9-22 は 3.39 倍、KON は 1.57 倍であった。

Notch ターゲット遺伝子

HES-1

HSC-2 は 1.51 倍、HSC-4 は 1.19 倍、Ca9-22 は 1.98 倍、KON は 5.63 倍であった。

HEY-1

HSC-2 は 1.73 倍、HSC-4 は 1.19 倍、Ca9-22 は 1.98 倍、KON は 2.05 倍であった。

EMT マーカー

Snail

HSC-2 は 5.03 倍、HSC-4 は 2.88 倍、Ca9-22 は 2.02 倍、KON は 25.68 倍であった。

以上より低酸素環境はすべての OSCC 細胞株において EMT を誘導することが示唆された。また HSC-2、HSC-4、Ca9-22 は GSI 添加によって走化能と浸潤能の亢進、E-cadherin 発現量減少が阻害されることから低酸素環境においてこれらの細胞株は Notch シグナルを介して EMT を引き起こすことが示唆されたため、Notch シグナルが口腔癌の転移抑制の新たな治療標的となりうることを示唆された。しかし KON では低酸素環境で EMT が誘導されるも GSI 添加で EMT 誘導が阻害されないことから低酸素環境では Notch シグナル以外の経路でも EMT が誘導することも示唆され、更なる研究が必要と思われた。

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 2 件)

1. Ishida T, Hijioka H, Kume K, Miyawaki A and Nakamura N: Notch signaling induces EMT in OSCC cell lines in a hypoxic environment. *Oncology Letters* 6: 1201-1206, 2013 .doi: 10.3892/ol.2013.1549 査読有り

2. Kume K, Haraguchi H, Hijioka H, Ishida T, Miyawaki A, Nakamura N Masayuki Ozawa: The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)* 430(3): 889-894, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.060. 査読有り

〔学会発表〕(計 1件)

3. 石田喬之、比地岡浩志、宮脇昭彦、岐部俊郎、久米健一、中村典史: 低酸素環境下での口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉移行における Notch シグナルの意義. 第 56 回日本口腔外科学会総会 2011 年 10 月 21-23 日, 大阪

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 喬之 (Ishida, Takayuki)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 20404501

(2) 研究分担者

宮脇 昭彦 (Miyawaki, Akihiko)

産業医科大学病院・講師

研究者番号: 40200216

比地岡 浩志 (Hijiok, Hiroshi)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 70305150

池田 龍二 (Ikeda, Ryuji)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号: 50398278

中村 典史 (Nakamura Norifumi)

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 60217875