

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861941

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の高度悪性化に関するサイトカイン誘導性EMTの解析

研究課題名(英文) Analysys of cytokine-induced EMT in oral squamous cell carcinoma cells.

研究代表者

奥井 岳(okui, gaku)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号：00646888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉移行(Epithelial Mesenchymal Transition: EMT)は上皮形質を示す細胞が間葉形質を示す細胞に変化する現象である。近年、癌の進展においても極めて重要な機構であることが理解されつつある。EMT細胞は細胞間接着の喪失、高い遊走能および細胞外基質分解能の獲得により高度浸潤、転移能を示し、癌の浸潤開始にも密接に関与していることが明らかにされてきた。しかし、EMTの誘導開始機構については未だ不明な点が多い。本研究では、口腔扁平上皮癌の高度悪性化に関するEMT誘導開始機構におけるサイトカインの機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Present study demonstrated that a Snail/Slug-dependent EMT program with parallel signaling that provides polarized cell motility via AKT is required to execute EMT. Our model will contribute to the basic understanding of how varied environmental conditions at a given stage in the cancer life cycle (e.g., stroma invasion vs. nest formation) may induce phenotypic changes (e.g., induction of EMT) in SCC cells, even if the EMT master regulator Snail is constitutively expressed at a high level.

研究分野：口腔癌

キーワード：上皮間葉移行 口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

本研究の学術的背景として、当研究室では口腔癌の浸潤様式分類である山本・小浜分類においてびまん性浸潤を呈する4D型の高度浸潤口腔扁平上皮癌から細胞株を樹立しており、これらの細胞株が、紡錘状形態、細胞間接着因子 E-cadherin の発現消失、中間径線維 Vimentin および EMT のマスターレギュレーターである転写因子 Snail の高発現を示すことを明らかにしてきた (Yokoyama *et al.*, Oral Oncol, 2001). また、上皮形質を示す口腔扁平上皮癌細胞に Snail を過剰発現させ EMT を誘導することに成功しており (Yokoyama *et al.*, Int J Oncol, 2003), この Snail 誘導性 EMT モデルおよび4D型口腔扁平上皮癌細胞株を用いて EMT に伴い変化する遺伝子群を同定している (Higashikawa *et al.*, Cancer Res, 2007, Cancer Letters, 2008, Int J Cancer, 2009, Taki *et al.*, Cancer Sci, 2003, Int J Oncol, 2006, Oncol Rep. 2008). このような研究を通じ、口腔扁平上皮癌細胞における高度悪性化に対する EMT の影響は明らかとなりつつあるが、どのような因子が Snail に代表される EMT 誘導転写因子を制御するのか、どういった細胞周囲環境が EMT 誘導を促進するかは未だに不明であり、解析の必要がある。

2. 研究の目的

上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) は上皮形質を示す細胞が間葉形質を示す細胞に変化する現象である。近年、癌の進展においても極めて重要な機構であることが理解されつつある。EMT細胞は細胞間接着の喪失、高い遊走能および細胞外基質分解能の獲得により高度浸潤、転移能を示し、癌の浸潤開始にも密接に関与していることが明らかにされてきた。しかし、EMTの誘導開始

機構については未だ不明な点が多い。本研究では、口腔扁平上皮癌の高度悪性化に関与する EMT 誘導開始機構および EMT に伴って制御される分子の発現と機能解析を行い、口腔癌の浸潤開始のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Snail 過剰発現細胞プールへの恒常活性型 AKT 過剰発現

申請者は、口腔扁平上皮癌細胞株 OM-1 にレトロウイルスベクターを用いて Snail 過剰発現させた細胞プールを樹立しており、この細胞プールはサイトカイン処理や細胞密度によって EMT 細胞率が変動する。また、Snail 過剰発現細胞プールに PI3K 特異的阻害剤 LY294002 処理を行うと EMT 細胞率が著しく減少することから、PI3K シグナル経路、特に細胞遊走に関わる AKT の EMT 誘導への直接的な関与が疑われる。これを実証するため、新たに恒常活性型 AKT 発現ウイルスベクターを作成し、Snail 過剰発現プールに遺伝子導入した後、EMT 細胞率の変動を確認する。

またこの細胞プールの全細胞抽出液を用いて E-cadherin, Vimentin のタンパク発現をウエスタンブロットングを行い検討し、Wound Healing Assay 法を用いて遊走能の変化を検索する。この解析から PI3K 経路全体ではなく AKT の EMT への直接的な関与が明らかにできる。

(2) Slug の EMT への関与の検討予備実験の結果より TGF 処理時、Snail, Slug の発現上昇を認めた。さらに TGF, TNF, PDGF-D 同時処理により OM-1 細胞に EMT が誘導されたが、サイトカイン処理と同時に siRNA を用いて Slug をノックダウンしたところ、EMT 細胞率は減少した。しかし Slug がどのように EMT 誘導に関わっているのか未だ不明である。これを明らかにするため、まず Slug 過剰発現ベクターを作成し OM-1 細胞に遺伝子導入し過剰発現細胞の樹立する。また Slug ノックダウンも行い、野生型を含めた3者での EMT 関連遺伝子の変化をマイクロアレイ法により検索し、Slug により

発現変化する遺伝子群を同定する。

(3)口腔扁平上皮癌細胞株OM-1はディッシュ内すべての細胞にサイトカイン処理を行っているにも関わらず一部の細胞のみにEMT誘導される。このことから一定の刺激により間葉形質に変化しやすい細胞群が存在する可能性が示唆される。まず分化可能な幹細胞能をもつ細胞がいるという仮説を立て、それを実証するためOM-1にEMT誘導を行いE-cadherin, Vimentin抗体で免疫染色を行いFACS法によりEMT細胞および非EMT細胞に分離後、それぞれをCD44抗体で免疫染色しCD44高発現型と低発現型に分離し4つのグループを遺伝子発現の面から解析を行う。この方法により、EMTと癌幹細胞の関係性を明らかにする。

4. 研究成果

TGF β , TNF α , PDGF-D 単独あるいは同時刺激のみではOM-1細胞にEMTは誘導できなかった。また、培養ディッシュ上でwound healing assayを行った場合もEMTは誘導できなかった。しかしwound healing assayをTGF β , TNF α , PDGF-D存在下で行うことでE-cadherin消失とvimentin高発現を示すEMT細胞がwoundスペースにのみ出現した。このEMT誘導条件下では、snail, slugの発現上昇に加え、PI3K-Akt経路の活性化が認められた。また、PI3K阻害剤処理により、上記実験系におけるEMT誘導は著しく阻害されるとともに細胞遊走能の著明な低下が認められた。一方、siRNAを用いてsnail, slugをノックダウンしたところ、単独ノックダウンではEMT細胞がわずかに減少したのみであったが、ダブルノックダウン時、EMT細胞数は著明に減少した。さらに本実験系で液性因子処理により発現が誘導されたsnail, slugは液性因子を除去すると発現量が減少しEMTも解除された。また、snail導入細胞ではwoundingによる細胞遊走誘導によりEMT細胞発現が顕著に亢進したが、これはPI3K阻害剤により抑制された。それに対し、恒常的に

高い細胞遊走能を獲得しているsnail発現SCC細胞株は非可逆的にEMT形質を保持し、Aktの恒常的活性化が獲得された。

この結果より、口腔扁平上皮癌細胞におけるEMTはsnail, slugの発現に依存するが、TGF β , TNF α , PDGF-Dの3因子同時処理によるEMTはPI3K-Akt経路依存性のsnail, slug発現上昇経路とPI3K-Akt経路依存的な細胞運動能付与が並行して働くことが必須であると考えられた。

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1件)

Okui G, Tobiume K, Rizqiawan A, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Higashikawa K, Kamata N.

AKT primes snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cell carcinoma cells.

J. Cell. Biochem. 114: 2039-2049, 2013.

査読有

DOI: 10.1002/jcb.24545

[学会発表](計0件)

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥井 岳 (OKUI Gaku)

広島大学・大学病院・歯科診療医
研究者番号：00646888

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：