

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20504

研究課題名(和文) 口腔癌EMT関連分子の機能的探索による新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment by Exploration of novel EMT-associated molecule

研究代表者

倉沢 泰浩 (KURASAWA, YASUHIRO)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90737280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌の進展過程において生じるEpithelial-Mesenchymal Transition (EMT) に着目し、独自の機能的スクリーニング手法を用い、口腔扁平上皮癌におけるEMTの発生に関する分子を同定と、分子機序の解明を試みた。口腔扁平上皮癌細胞株を用いたin vitro実験系において、WNT10AをEMT関連分子として選出した。Si-RNAを用いた発現抑制実験系ではWNT10Aをノックダウンすることによって、METの誘導が示唆され、口腔扁平上皮癌においてWNT10Aの発現低下がEMTの発生に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌遺伝子や癌抑制遺伝子による研究の進展により、「癌は遺伝子の病気」として発癌や癌の悪性形質獲得に関するメカニズムが徐々に解明され、予防・診断・治療に臨床応用されつつある。これまでのEMTの研究は、発現レベルでの検索から進められており、Functional genomics から展開する研究は少なかった。本研究の特色はEカドヘリン誘導性を有する分子スクリーニングを展開することで、創薬等の臨床応用が期待できる点である。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify the molecule related to Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) generated in the process of cancer development in oral squamous cell carcinoma (OSCC), and to elucidate the molecular mechanism using an original functional screening method. MET proceeded from knocking down WNT10A in some of the OSCC cell lines, it was suggested that the reduction of WNT10A expression is involved in the generation of EMT in OSCC.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌

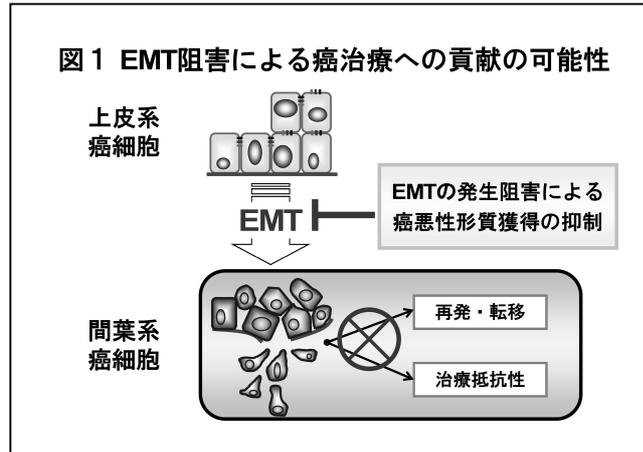
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌遺伝子や癌抑制遺伝子による研究の進展により、「癌は遺伝子の病気」として発癌や癌の悪性形質獲得に関するメカニズムが徐々に解明され、予防・診断・治療に臨床応用されつつある。上皮-間葉転換(EMT: Epithelial Mesenchymal Transition)は、上皮組織の一部が上皮としての極性や上皮組織としての秩序を喪失して運動性を獲得すると同時に、形態学的に間葉系細胞へ変化する現象である。EMT は、正常細胞における初期発生時の原腸陥入や心臓弁形成、あるいは創傷治癒における細胞運動能の獲得等の局面で発生するとされており重要な生物現象の一つとされている。一方で癌細胞においては、上皮系形質を有する癌細胞が間葉系の形質を有する癌細胞へ変化する事で浸潤・転移能を獲得し、放射線治療や抗癌剤治療に対する抵抗性を獲得することが近年多数報告されており、現在の癌研究の主要なテーマとなっている(図1)。

これまで、口腔扁平上皮癌細胞株を用い mRNA レベルの発現解析と DNA メチル化解析を組み合わせた独自のスクリーニングを用いて、口腔扁平上皮癌における新規の EMT 関連分子として WNT7A を同定し、この遺伝子の間葉系癌細胞における発現が DNA メチル化異常によって抑制的に制御されていること、間葉系癌細胞においては転写因子 ZEB1 によって抑制的に直接制御されていることを見出し、WNT7A が間葉系癌細胞では ZEB1 や DNA メチル化異常によって発現抑制されることでより悪性度を増す可能性を報告した(Kurasawa Y, et al. Oncogene. 31:1963-74. 2012)。

また大腸癌においては、複数の細胞株を用いた網羅的な解析によって新規 EMT 関連分子として SIX-1 を同定し、SIX-1 の発現が大腸癌の予後と相関すること、また SIX-1 が ZEB1 の発現を誘導することによって EMT 発生、促進に関与することを見出した(Ono H, et al. Oncogene. 31:4923-34. 2012)。



### 2. 研究の目的

本研究課題では、口腔癌の癌腫において以下の項目の実現を目指す。# 1 過去の解析で使用した細胞株の中で上皮系口腔癌細胞株と間葉系口腔癌細胞株数種類を対象としマイクロアレイを用いた網羅的な発現解析を行い間葉系口腔癌で発現低下する EMT 関連遺伝子群のスクリーニングを行い、さらに DNA メチル化等のエピゲノム異常を指標としたスクリーニングや、過去に樹立した E カドヘリンの発現亢進を指標とした in vitro 機能的探索モデル系(Harazono Y, et al. PLoS One, 2013)を用いて間葉系癌細胞においてエピジェネティックな異常により発現抑制され、かつ E カドヘリン発現誘導能を有する分子の探索を試みる。# 2 選出した分子の間葉系癌細胞株における発現低下が EMT 発生にどのように関与するのかを検討し、さらに選出した分子による E カドヘリン発現誘導(MET: Mesenchymal Epithelial Transition)の分子機序を解明する。# 3 選出した分子の発現と口腔扁平上皮癌の臨床病理学的因子との相関性の検討を通じて、口腔扁平上皮癌における選出した候補分子の発現変化の意義を解明し臨床的な活用法を検討、開発する。

### 3. 研究の方法

上皮系口腔癌細胞株と間葉系口腔癌細胞株のマイクロアレイを用いた発現レベルの比較と COBRA 法、bisulfite sequence 法を組み合わせた DNA メチル化解析、さらに E カドヘリンの発現亢進を指標とした in vitro 機能的探索モデル系を組み合わせた絞込みによって間葉系癌細胞株において DNA メチル化によって発現抑制され、かつ E カドヘリンの発現誘導性を有する分子を選出する。具体的には以下に示すストラテジーで遂行予定である。

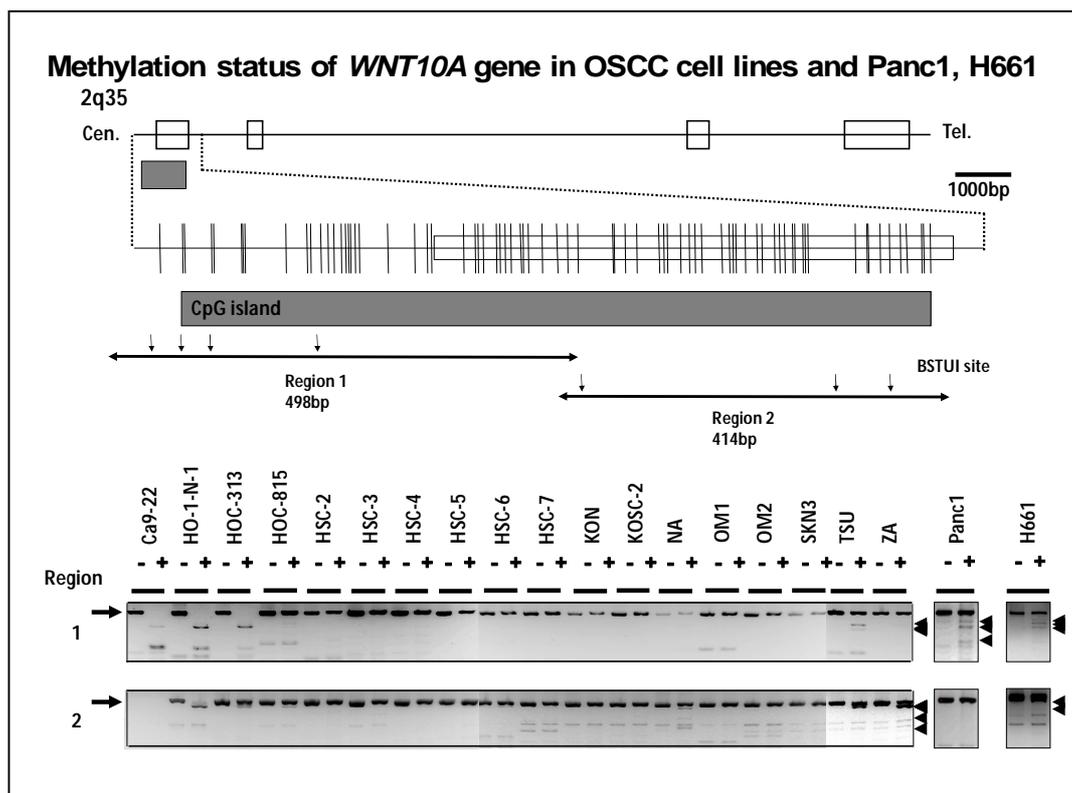
1) 4x44K Human Whole Genome Ver.2.0 gene expression array (Agilent 社)を用いて上皮系口腔癌細胞株と比較して間葉系口腔癌細胞株において発現が低下している分子をスクリーニングし、加えてデータベース解析や分子の機能、新規性などから絞り込みを行う。2) TaqMan 法を用いた定量的発現解析による validation を行った後に COBRA 法、bisulfite sequence 法を組み合わせた DNA メチル化解析によって DNA の過剰メチル化と発現抑制が一致する分子を選び出す。3) EMT 関連分子の確度の高い機能的スクリーニングを行うため、既報の in vitro 機能的スクリーニング・モデルを用いて選出した分子の E カドヘリン発現誘導能の有無を確認し最終的な候補分子を選出する

選出した候補分子の機能を解析するため発現コンストラクトを用いて複数種の間葉系口腔癌細胞株や過去の研究において有用であった膵臓癌細胞株 Panc1 への強制発現実験、あるいは数種類の上皮系口腔癌細胞株への siRNA を用いた発現抑制実験を行うことなどによって選出した分子の E カドヘリン誘導能の validation を行うとともに、E カドヘリンの発現誘導における分子機序の詳細を解析する。これらの実験系は過去の研究において確立済みであり、選出した

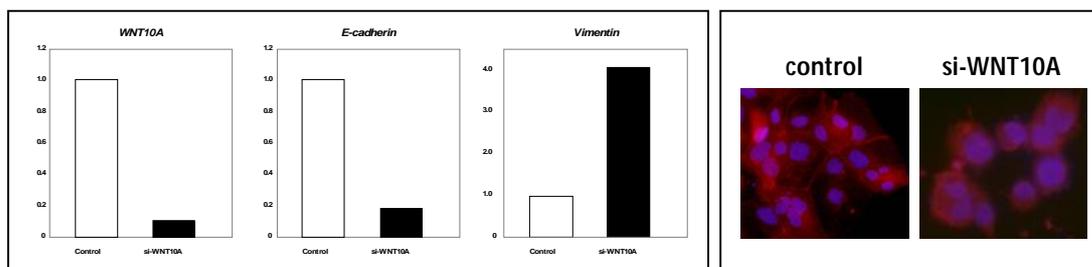
候補分子の発現を人工的に変化させ E カドヘリン発現変化に至るまでの様々な下流分子の発現変化を検証することによって口腔癌の EMT 発生に関わる新規知見を得ることができると考えている。

#### 4. 研究成果

OSCC 細胞株 18 株で、間葉系 OSCC 細胞株で発現低下している分子として、WNT10A を選出した。COBRA 法を用いて、WNT10A の Exon1 上流の CpG アイランドの DNA メチル化状態を確認し、間葉系 OSCC 細胞株に加えて、膵臓癌細胞株 Panc1 ならびに肺癌細胞株 H661 において、CpG アイランドの DNA 過剰メチル化を認めた。



WNT10 の si-RNA 導入によって、OSCC 細胞株 OM1 において、E カドヘリンの発現減少、ビメンチンの発現上昇を認め、WNT10A が EMT に関与している可能性が示唆された。



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

**倉沢泰浩**, 道脇幸博, 田代真由美, 根岸明秀, 丸岡豊, 関谷秀樹, 向山仁, 重松司朗, 杉崎順平, 上正泰. 入院中の肺炎発症に関する多施設共同研究 - 医科入院患者 43 万人の解析 第 1 報: 研究の全体像と結果の概要 - . 第 14 回日本口腔ケア学会総会・学術大会 2017. 4. 22 沖縄

**倉沢泰浩**, 道脇幸博, 田代真由美, 根岸明秀, 丸岡豊, 関谷秀樹, 向山仁, 重松司朗, 小林裕, 村上正泰. 入院中の肺炎発症に関する多施設共同研究 - 医科入院患者 43 万人の解析

第2報：脳卒中患者の分析 - . 第14回日本口腔ケア学会総会・学術大会 2017. 4. 22 沖縄

**倉沢泰浩**，道脇幸博，向山仁，関谷秀樹，小林裕，丸岡豊，重松司朗，陸川良智，長谷川士朗，唐木田一成，根岸明秀，石井良昌，大橋勝，坂田康彰，杉崎順平，植野正之，村上正泰．入院後の肺炎発症に関する多施設共同研究-入院患者約40万人と脳卒中患者の解析．第61回日本口腔外科学会総会・学術集会 2016. 11. 25 千葉

**倉沢泰浩**，道脇幸博，向山仁，関谷秀樹，小林裕，丸岡豊，重松司朗，陸川良智，長谷川士朗，唐木田一成，根岸明秀，石井良昌，大橋勝，坂田康彰，杉崎順平，植野正之，村上正泰．入院後の肺炎発症に関する多施設共同研究-入院患者約40万人と診療科別の解析．第61回日本口腔外科学会総会・学術集会 2016. 11. 25 千葉

**倉沢泰浩**，道脇幸博，向山仁，関谷秀樹，小林裕，丸岡豊，重松司朗，陸川良智，長谷川士朗，唐木田一成，根岸明秀，石井良昌，大橋勝，坂田康彰，杉崎順平，植野正之，村上正泰．総合病院の入院患者が入院中に発症する肺炎に関する多施設共同研究?医科入院患者約40万人の解析．日本歯科医学会第32回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」2016. 09. 03 東京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。