

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06949

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌の転移におけるWnt5a-Ror2シグナル経路の関与

研究課題名（英文）Involvement of Wnt5a-Ror2 signaling in metastasis of oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

坂本 泰基（Sakamoto, Taiki）

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：10805261

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では口腔扁平上皮癌（OSCC）の転移機構を解明するために、Wnt5a-Ror2シグナル経路に着目した。まず、転移の前段階となる浸潤・遊走を調べたところ、Ror2を唯一発現しているSQUU-B細胞においてのみrhWnt5a濃度依存的に浸潤・遊走能の亢進を認め、Wnt5aはRor2存在下においてのみOSCCの浸潤・遊走に關与することが示された。さらには、OSCC組織における発現様式と臨床病理組織学的所見との関連を見たところ、Wnt5aとRor2ともに高発現している症例群において頸部リンパ節転移・遠隔転移の頻度が有意に高く、OSCCの転移へのWnt5a-Ror2シグナル経路の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌（OSCC）においては、有用なバイオマーカーは未だ確立されておらず、治療成績の著しい向上は認められない。また、OSCCは頸部リンパ節転移を生じやすく、予後不良因子であるため、癌の浸潤・転移のメカニズムを解明することは重要な課題の1つである。本研究結果より、OSCCの浸潤・転移機構にWnt5a-Ror2シグナル経路が関与していることが示唆され、OSCCの転移機構を解明する第一歩であり、学術的に意義のある成果と言える。また、この研究を基盤としてOSCCにおける新規バイオマーカーの開発に至る可能性があり、OSCCの治療成績向上につながる社会的にも大きな意義を持つ研究成果とも言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on Wnt5a-Ror2 signaling to elucidate the molecular mechanisms of metastasis in oral squamous cell carcinoma. At first, we examined the mechanisms of cancer cell invasion and migration as the initiatory step for metastasis. The results reported that the invasion and migration activities of SQUU-B cells with high expression of Ror2 were dramatically enhanced by addition of rhWnt5a in concentration-dependent manner. Therefore, it was suggested that Wnt5a enhanced the invasion and migration activities of OSCC cells depending on Ror2. Furthermore, we examined the association between clinicopathological findings and immunohistochemical expression of Wnt5a and Ror2 in OSCC specimens. As a result, the prevalence of nodal metastasis and distant metastasis in the high Wnt5a and Ror2 groups was significantly higher than that of the low Wnt5a or Ror2 groups. Therefore, this finding suggested that Wnt5a-Ror2 signaling was involved in the metastasis of OSCC.

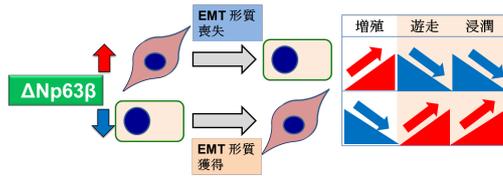
研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平上皮癌 Wnt5a Ror2 浸潤 転移

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

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) は、局所浸潤傾向が強く、癌細胞がリンパ管へ侵入しやすいため、頸部リンパ節転移を生じやすい。頸部リンパ節転移は、OSCC 患者の重要な予後不良因子であるため、癌の浸潤メカニズムを解明し、制御することは極めて重要な課題の1つである。近年、その浸潤・転移のメカニズムに上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が関与することが報告されている。これまでに申請者の研究グループは、Np63 のスプライシングバリエーションの1つである **Np63** の発現減弱が EMT を誘導し、OSCC の浸潤・遊走を亢進することを示してきた (図1)。



Matsubara R, et al. Int J Oncol 2011  
Goto Y, et al. Clin Exp Metastasis 2014

図1 OSCC 細胞における Np63 の発現変動が及ぼす影響

しかしながら、その分子機構は不明であった。そこで、申請者は Np63 の下流で浸潤・遊走に関する遺伝子を同定するために、Np63 の発現を認めない高転移 OSCC 細胞株 (SQUU-B) に Np63 を過剰発現させた細胞株を用い、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、発現変動率が有意に高かった **Wnt5a** をその候補遺伝子として同定した。Wnt5a は、乳癌などにおいて発現が認められ、その受容体である **Ror2** を介して浸潤・遊走に関与することが示唆されているが、詳細は明らかではない。申請者は、OSCC の浸潤・遊走における Wnt5a-Ror2 シグナルの関与について研究を行ってきた。以下にその結果を示す。

- (1) 口腔扁平上皮癌細胞株において Wnt5a および Ror2 の発現はともに、Np63 の発現を認めない高転移 OSCC 細胞株 SQUU-B において最も強かった。
- (2) Np63 過剰発現により Wnt5a および Ror2 の発現は減弱し、逆に Np63 ノックダウンによりこれらの発現は亢進した。
- (3) SQUU-B 細胞における Wnt5a または Ror2 ノックダウンにより、EMT 関連遺伝子の一部に発現変動を認めたものの、ほとんどの EMT 関連遺伝子は発現変動を認めなかった。
- (4) wound healing assay および Matrigel™ invasion assay では、Wnt5a または Ror2 ノックダウンにより遊走能および浸潤能の有意な低下を認めた。
- (5) 浸潤・遊走関連分子として、細胞外基質の分解に関与する matrix metalloproteinase (MMP) の発現を検索したところ、MMP-2 の発現が SQUU-B 細胞で最も強く、その発現は Np63 過剰発現および Wnt5a または Ror2 ノックダウンで減弱し、Np63 ノックダウンで亢進した。
- (6) 口腔扁平上皮癌の生検組織を用いて Wnt5a および Ror2 の発現を免疫組織化学的に検索したところ、隣接口腔粘膜上皮と比較して、Wnt5a および Ror2 とともに癌組織で高発現していた。

以上の結果より、Np63 の発現減弱は EMT を誘導するとともに、Wnt5a-Ror2 シグナル経路を介して MMP-2 を活性化させ、OSCC の浸潤・遊走を亢進する可能性が推察された。

## 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究は OSCC における Np63 を介した Wnt5a-Ror2 シグナルの詳細な伝達経路および関連分子を明らかにし、さらにはそのシグナル経路を介した OSCC の転移の分子機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) EMT 形質非獲得 OSCC 細胞と Wnt5a および Ror2 の過剰発現モデルにおける EMT 関連分子の発現量の検索

これまでの研究において、口腔扁平上皮癌細胞株のうち、EMT 形質を獲得し、Wnt5a および Ror2 を高発現している SQUU-B 細胞における Wnt5a または Ror2 のノックダウンでは、EMT 関連遺伝子の発現量に変化はほとんど認められなかった。そのため、本研究では EMT 形質を持たず、Wnt5a および Ror2 の発現をほとんど認めない SQUU-A 細胞と Wnt5a を過剰発現させた SQUU-A 細胞 (Wnt5a 過剰発現モデル) Ror2 を過剰発現させた SQUU-A 細胞 (Ror2 過剰発現モデル) について、以下の分子の発現を real-time PCR 法、western blotting 法を用いて比較検討する。

上皮系細胞マーカー (cytokeratin5, 14, 19 および E-cadherin)  
間葉系細胞マーカー (vimentin, N-cadherin, fibronectin)  
EMT 関連分子 (Snail, Twist, ZEB, MMP-2)

#### (2) 口腔扁平上皮癌細胞株における Wnt5a-Ror2 シグナル関連分子の検索

DNA マイクロアレイ解析を用いて以下に示す細胞株間における遺伝子発現を網羅的に比較検討する。

- ・ SQUU-A 細胞 (コントロール) と Wnt5a を過剰発現させた SQUU-A 細胞 (Wnt5a 過剰発現モデル)
- ・ SQUU-A 細胞 (コントロール) と Ror2 を過剰発現させた SQUU-A 細胞 (Ror2 過剰発現モデル)

その後、両細胞間で発現量に差のある遺伝子を選択し、Wnt5a-Ror2 シグナル経路の下流における関連遺伝子として同定する。

#### (3) (2) で同定された関連分子の発現抑制モデルにおける細胞生物学的特性 (増殖能、分化能、遊走能、浸潤能、転移能) の検索

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SQUU-A, SQUU-B, SAS) において、同定された関連分子の発現を RT-PCR 法および western blotting 法にて検索し、その発現量の多い細胞株に同定遺伝子の siRNA を導入してノックダウンを行い (同定遺伝子発現抑制モデル) 細胞生物学的特性をコントロール細胞と比較検討する。

##### 細胞増殖能

WST-1 assay および BrdU incorporation assay にて細胞増殖能を検索する。

##### 分化能

各種マーカーの発現を RT-PCR 法、real-time PCR 法、western blotting 法にて検索するとともに、同所性細胞移植により *in vivo* での分化能を検索する。

##### 細胞遊走能

wound healing assay を用いて細胞の遊走能について検索を行う。

##### 細胞浸潤能

Matrigel を用いた invasion assay を使用して細胞の浸潤能について検索を行う。

##### 転移能

ヌードマウス同所性細胞移植リンパ節転移モデルを用いて転移能について検索する。

#### (4) 口腔扁平上皮癌の生検組織および転移リンパ節組織における Np63, Wnt5a, Ror2 および MMP-2 の局在の検索

口腔扁平上皮癌の生検組織を用いて、Np63, Wnt5a および Ror2 の局在を多重免疫組織化学的染色法にて検索し、関係性を解明する。また、転移リンパ節組織標本を用いて同様の手技を行い、転移メカニズムの解明を行う。さらには、MMP-2 の局在についても免疫組織化学的に検索を行う。

#### (5) Wnt アンタゴニストの発現検索と Wnt5a との関連についての検討

口腔扁平上皮癌細胞株にける Wnt アンタゴニスト (SFRP, WIF, Dkk) の発現を RT-PCR 法および western blotting 法にて検索する。その結果、Wnt5a の発現がほとんど認められない SQUU-A 細胞にて高発現している Wnt アンタゴニストおよび Wnt5a が高発現している SQUU-B 細胞にて低発現している Wnt アンタゴニストを同定し、その発現抑制および過剰発現モデルを作製し、Wnt5a の発現量の変動を real-time PCR 法にて検索する。また、そのモデルを使用して細胞生

物学的特性をそのコントロールモデルと比較検討を行う。さらには、同定された Wnt アンタゴニストの口腔扁平上皮癌組織における局在を免疫組織化学的に検索する。

#### (6) Wnt5a および Ror2 の発現変動モデルに対する抗癌剤の効果についての検討

SQUU-A 細胞と Wnt5a または Ror2 を過剰発現させた SQUU-A 細胞 (過剰発現モデル) SQUU-B 細胞と Wnt5a または Ror2 を発現抑制させた SQUU-B 細胞 (発現抑制モデル) において、TS-1、シスプラチン、ドセタキセル等の抗癌剤を投与し、その感受性について WST-1 assay を用いて比較検討を行う。

#### 4. 研究成果

本研究目標は、Np63 の制御下における Wnt5a-Ror2 シグナル経路を介した OSCC の転移の分子機構の解明である。転移を生じるためには、OSCC 細胞が周囲組織を分解して浸潤し、脈管へ到達する必要がある。そこで、まず申請者は、細胞外基質分解能を持つ MMP-2 タンパクの分泌を確認するために、ゼラチンザイモグラフィーを行った。その結果、Wnt5a および Ror2 の発現をほとんど認めない SQUU-A 細胞では活性化型 MMP-2 がほとんど分泌されていないが、Wnt5a および Ror2 を高発現する SQUU-B 細胞では活性化型 MMP-2 の分泌を強く認めた。また、潜在型および活性化型 MMP-2 とも Np63 ノックダウンにより分泌が増加し、反対に Np63 過剰発現により分泌が減少した。さらに、Wnt5a または Ror2 ノックダウンにより、潜在型および活性化型 MMP-2 の分泌が減少した。MMP-2 の分泌は Np63 および Wnt5a-Ror2 によって制御され、OSCC の浸潤に参与していることが示された (図 2)。

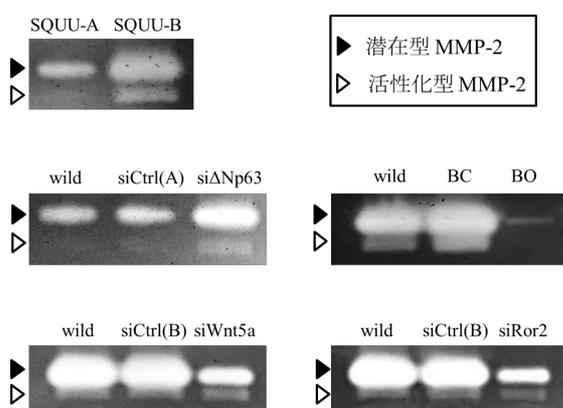


図 2 OSCC 細胞の培養上清中への潜在型 MMP-2 と活性化型 MMP-2 の分泌 (ゼラチンザイモグラフィー)

BO: Np63 過剰発現 SQUU-B 細胞

BC: コントロールベクター導入 SQUU-B 細胞

siCtrl(A): scrambled siRNA 導入 SQUU-A 細胞

si Np63: Np63 siRNA 導入 SQUU-A 細胞

siCtrl(B): scrambled siRNA 導入 SQUU-B 細胞

siWnt5a: Wnt5a siRNA 導入 SQUU-B 細胞

siRor2: Ror2 siRNA 導入 SQUU-B 細胞

本研究における計画として、EMT 形質を持たず、Wnt5a および Ror2 の発現を認めない SQUU-A 細胞に Wnt5a を過剰発現させた Wnt5a 過剰発現モデル、Ror2 を過剰発現させた Ror2 過剰発現モデルを作製し、研究を進める予定であったが、過剰発現モデル作製に難航した。そこで、recombinant human Wnt5a (rhWnt5a) を SQUU-A 細胞へ添加して、EMT 関連マーカーの発現量の変化を検索したが、Wnt5a ノックダウン時と同様に発現量に変化を認めなかった。また、Ror2 を高発現している SQUU-B 細胞においてのみ rhWnt5a 濃度依存的に浸潤・遊走能の亢進を認めた。このことから、Wnt5a は受容体である Ror2 とシグナル経路を形成して、EMT とは関連せずに OSCC の浸潤・遊走に参与していることが示され、シグナル経路形成の確証を得たことに意義があると考える。

また、Wnt5a-Ror2 シグナル関連分子の検索のために、Wnt シグナル経路における関連分子として報告されている Dvl、Rac、JNK、RhoA、FLNa、c-Src、Cdc42 について SQUU-A 細胞および SQUU-B 細胞における発現量を検索したが、細胞間で発現量に差をほとんど認めなかった。さらに、Wnt5a-Ror2 シグナル経路の関連分子として、Wnt アンタゴニストとして報告されている SFRP (1

および2)、WIF-1、Dkk(1-4)のOSCC細胞株における発現をRT-PCR法およびreal-time PCR法にて検索を行った。その結果、Dkk-1およびDkk-3がWnt5aおよびRor2を高発現しているSQUU-B細胞においてほとんど発現していなかった。Wnt5aまたはRor2の発現変動モデルにおけるDkkの発現検索は未施行であるが、Dkk-1および3の発現減弱がWnt5aおよびRor2の高発現に關与している可能性が考えられ、Wnt5a-Ror2シグナル経路を解明する上での重要な知見と思われる。

また、OSCC生検組織におけるWnt5aおよびRor2の免疫組織化学的な発現様式と臨床病理組織学的所見との關連について検索を行った。その結果、Wnt5a高発現群はWnt5a低発現群と比較して局所再発と遠隔転移の発生頻度が有意に高く、Ror2高発現群はRor2低発現群と比較して局所再発、頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高かった(表1)。また、Wnt5aおよびRor2ともに高発現している群は他の群と比較して、局所再発、頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。一方、性別、部位、臨床発育様式、分化度(WHO分類)、T分類、臨床病期分類に関しては、各群間に有意差は認められなかった。この結果は、Wnt5a-Ror2シグナル経路が頸部リンパ節転移および遠隔転移に關与している可能性を示唆しており、本研究の目的にとって意義のある知見の一つと考えられる。

	症例数 (%)	Wnt5a発現		p-value	Ror2発現		p-value
		LI≥ mean	LI< mean		LI≥ mean	LI< mean	
性別							
男性	62(63.9)	48	14	N.S.	29	33	N.S.
女性	35(36.1)	29	6		21	14	
原発部位							
舌	53(54.6)	40	13	N.S.	28	25	N.S.
歯肉	26(26.8)	23	3		14	12	
口底	9(9.3)	8	1		4	5	
頬粘膜	9(9.3)	6	3		4	5	
臨床発育様式							
表在型	22(22.7)	19	3	N.S.	10	12	N.S.
外向型	24(24.7)	17	7		12	12	
内向型	51(52.6)	41	10		28	23	
T分類							
T1	22(22.7)	18	4	N.S.	8	14	N.S.
T2	45(46.4)	33	12		25	20	
T3	6(6.2)	6	0		2	4	
T4	24(24.7)	20	4		15	9	
臨床病期分類							
Stage I	20(20.6)	16	4	N.S.	6	14	N.S.
Stage II	35(36.1)	24	11		19	16	
Stage III	9(9.3)	8	1		4	5	
Stage IV	33(34.0)	29	4		21	12	
分化度(WHO分類)							
grade 1	64(66.0)	48	15	N.S.	28	36	N.S.
grade 2	31(31.9)	27	4		20	11	
grade 3	2(2.1)	2	0		2	0	
浸潤様式(YK分類)							
grade 1	3(3.1)	1	2	$p<0.05$	0	3	$p<0.01$
grade 2	17(17.5)	13	4		6	11	
grade 3	49(50.5)	36	13		22	27	
grade 4C	19(19.6)	18	1		15	4	
grade 4D	9(9.3)	9	0	7	2		
頸部リンパ節転移							
有	52(53.6)	45	7	N.S.	36	16	$p<0.01$
無	45(46.4)	32	13		14	31	
局所再発							
有	23(23.7)	22	1	$p<0.05$	16	7	$p<0.05$
無	74(76.3)	55	19		34	40	
遠隔転移							
有	15(15.5)	15	0	$p<0.05$	13	2	$p<0.01$
無	82(84.5)	62	20		37	45	

表1 OSCC生検標本におけるWnt5aまたはRor2の発現と臨床病理組織学的所見との關連

LI≥mean: 陽性細胞率が平均値以上。

LI<mean: 陽性細胞率が平均値未満。

<sup>2</sup> 検定または Fisher's exact 検定; N.S.: not significant

本研究成果より、OSCCの浸潤・転移機構にWnt5a-Ror2シグナル経路が關与していることが示唆され、この研究を基盤として今後OSCCにおける新規バイオマーカーの開発に至る可能性があ

り、OSCC の治療成績向上につながることを期待している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 2017 年 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会  
「口腔扁平上皮癌の浸潤・遊走における Np63 を介した Wnt5a-Ror2 シグナル経路の関与」  
坂本泰基、川野真太郎、松原良太、後藤雄一、神野哲平、丸瀬靖之、金子直樹、橋口有真、服部多市、田中翔一、中村誠司
- (2) 2018 年 第 63 回日本口腔外科学会総会・学術大会  
「口腔扁平上皮癌における Np63 を介した kallikrein-related peptidase (KLK)5 の発現」  
服部多市、川野真太郎、松原良太、坂本泰基、橋口有真、金子直樹、田中翔一、大部一成、中村誠司
- (3) 2018 年 第 63 回日本口腔外科学会総会・学術大会  
「口腔扁平上皮癌における Np63 を介した KRT19 の発現についての検討」  
田中翔一、川野真太郎、松原良太、坂本泰基、橋口有真、金子直樹、服部多市、大部一成、中村誠司
- (4) 2019 年 第 37 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
「口腔扁平上皮癌における Np63 を介した kallikrein-related peptidase (KLK)5 の発現」  
服部多市、川野真太郎、松原良太、坂本泰基、橋口有真、金子直樹、田中翔一、大部一成、中村誠司
- (5) 2019 年 第 37 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
「口腔扁平上皮癌における Np63 を介した KRT19 の発現についての検討」  
田中翔一、川野真太郎、松原良太、坂本泰基、金子直樹、橋口有真、服部多市、大部一成、中村誠司

〔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)研究分担者 なし

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。