

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11851

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌細胞における上皮間葉転換 間葉上皮転換を介した浸潤・転移機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of invasion and metastasis mechanism through epithelial mesenchymal transition - mesenchymal epithelial transition in the oral squamous cell carcinoma cell

研究代表者

加茂 政晴 (Masaharu, Kamo)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40214564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-4細胞において、(1) TGF- $\beta$ 1は上皮間葉転換(EMT)を誘導するのに対して、BMP-2は、間葉上皮転換を誘導することが示唆された。(2) EMTにおいて、転写因子SlugとSox9は、E-cadherinの発現抑制、及びN-cadherinの発現を増加させた。(3) 細胞密度の低下は、E-cadherinによる細胞間接着を崩壊させ、YAP/TAZの活性化を誘導し、Slugの核内移行の促進によりN-cadherinの発現を増大させた。(4) EMTにより発現増加した癌抑制因子CXCL14の発現は、マクロファージ由来のCCL20により抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、まだ理解が進んでいない、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移を制御する分子とそのシグナルに関する研究行なっている。HSC-4細胞がTGF- $\beta$ とBMPの両者に応答する細胞株であり、EMT/METによる浸潤・転移のモデルとして非常に有用であることが示された。EMTに関しては、癌の悪性化に関わる転写因子の同定と、これがHippo経路により制御されていることが示された。また、マクロファージとの相互作用に癌細胞の悪性化に関与するケモカインが関与していることが見出された。これらの理解が進めば、口腔癌治療のための新たな標的分子になる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In human oral squamous cell carcinoma cell HSC-4 cells, (1) TGF- $\beta$ 1 induced the epithelial-mesenchymal transition (EMT), whereas it is suggested that BMP-2 induced the mesenchymal-epithelial transition (MET). (2) In TGF- $\beta$ 1-induced EMT, the transcription factors Slug suppressed the expression of E-cadherin, whereas Sox9 increased expression of N-cadherin. (3) In the low cell density, disruption of the adhesion between the cells by E-cadherins induced activation of YAP/TAZ, and increased expression of N-cadherin through the promotion of nuclear localization of Slug. (4) The expression of tumor suppressor CXCL14 induced by EMT was suppressed by CCL20 derived from the macrophage.

研究分野：口腔生化学

キーワード：上皮間葉転換 間葉上皮転換 口腔扁平上皮癌細胞 TGF- $\beta$ 1 BMP-2 Hippo経路 Sox9 Slug

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔領域において扁平上皮癌は発生頻度の高い癌である。がんの克服には多くの研究が行われているが、癌細胞の転移は依然大きな問題として残ったままである。我々の研究室ではこれまで、ヒト口腔扁平上皮癌(hOSCC)細胞株の上皮間葉転換(EMT)における遊走能(1)や浸潤能(2)に関する研究を主として TGF- $\beta$ 1 誘導化 HSC-4 細胞株について行ってきた。これまでの研究から、TGF- $\beta$ 1 は Smad シグナルを介して転写因子 Slug の発現を増大させ EMT を誘導した。この EMT 誘導により、(1) 間葉マーカーの N-cadherin や vimentin の高発現、並びに integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 の標的タンパク質の発現レベルを増大させることにより細胞の遊走性を増大させていた。(2) non-canonical Wnt シグナル経路に關与する Wnt5b の発現増大を介して MMP-10 の発現増大を引き起こした。この MMP-10 は EMT に關連した細胞の浸潤能の増大に關与することが示された。一方、癌細胞の転移においては、EMT により移動が可能になった後、転移先での癌細胞の定着と再増殖が重要であり、再び上皮様細胞の性質を持つ必要がある。この性質を誘導する因子として間葉上皮転換(MET)の關与が考えられている(3)。この MET を誘導するサイトカインとして BMP の關与が示唆されている(4)。

### 2. 研究の目的

癌の転移においては、上皮間葉転換(EMT)により癌細胞の組織浸潤が可能になった後、転移先での癌細胞の定着と再増殖が重要であり、再び上皮様細胞の性質を持つ必要がある。この性質を誘導する因子として間葉上皮転換(MET)の關与が示されている。我々は hOSCC 細胞である HSC-4 細胞株は TGF- $\beta$ 1 により EMT が誘導されることを我々は報告している。そこで(1)一旦 EMT を誘導した HSC-4 細胞において、MET の誘導が示唆されている BMP などの刺激により MET を誘導することを明らかにする。次に(2) EMT 關連転写因子 Slug は E-cadherin の発現を抑制するが、N-cadherin の発現には關与せず、EMT に伴う cadherin の発現調節機構は明らかでない。そこで、N-cadherin の発現に關わる転写因子の同定を行なう。(3)癌細胞培養時の密度変化に伴う遺伝子の発現変化は、Hippo 経路により制御される。そこで hOSCC 細胞表面に存在する細胞接着因子による Hippo 経路を介した EMT の制御機構の解明を行う。(4)癌組織に存在する線維芽細胞あるいはマクロファージ(M $\phi$ )とのサイトカインのシグナルクロストークの解析により EMT/MET を誘導する因子を探索しその機能を解明する。以上により、ヒト口腔扁平上皮癌細胞における浸潤・転移を抑制する創薬の基盤を作製したい。

### 3. 研究の方法

(1) hOSCC 細胞として HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS 及び LMF-4 の各細胞株を用いた。EMT/MET の制御機構及びシグナル伝達経路解析には、主として HSC-4 細胞株を用いた。EMT/MET に關与する遺伝子発現は qRT-PCR で解析した。またタンパク質については、発現レベルの解析や Smad のリン酸化は、対応する抗体を用いたウェスタンブロット法により、細胞内局在性の解析には、蛍光免疫染色法を用いて行なった。  
(2) シグナル伝達経路の解析には、YAP/TAZ, Slug 及び Sox9 の siRNA を用いて解析を行なった。また Smad 及び Sox9 のリン酸化の解析には対応する阻害剤を用いて解析した。  
(3) 細胞遊走能または細胞走化性の測定には、トランスウェルチャンバーを用いて、底面に移動した細胞を固定後 DAPI 染色した後、細胞数を計測した。

### 4. 研究成果

(1) これまで hOSCC における BMP に対する応答の研究は少なく、またその作用も明らかとされてない。そこで、BMP-2 及び TGF- $\beta$ 1 が hOSCC の EMT/MET 關連遺伝子の発現に対してどのように影響するのかについて調べた。HSC-4 細胞において Smad6 及び標的遺伝子 ID1 の発現、及び Smad1/5/9 のリン酸化に対して有意な応答が見られたことから(図 1A,B) HSC-4 細胞は BMP-2 と TGF- $\beta$ 1 の両者に応答する hOSCC 細胞として初めて見いだされた。また BMP-2 は、TGF- $\beta$ 1 と異なり、間葉マーカーである N-cadherin の発現を抑制するのに対して、上皮マーカーの cytokeratin9 の発現を上昇させたことから、EMT ではなくむしろ MET を誘導することが示唆された(図 1C)。一方、BMP による EMT 關連転写因子 Snail の発現抑制、及び MET 關連因子である ID1 の発現増大も同様に TGF- $\beta$ 1 により打ち消された。これらの BMP-2 の作用が TGF- $\beta$ 1 により濃度依存的に阻害されること(図 1D) TGF- $\beta$ 1 は BMP-Smad1/5/9 シグナルを減弱させたことから、TGF- $\beta$ 1 は BMP-2 による MET を抑制することが示された。BMP-2 が遊走能を低下させ、且つ細胞増殖を増大させたことは、転移先での癌細胞のコロニー形成を BMP-2 が誘導する可能性を示すものと考えられる。

TGF- $\beta$ 1 刺激により EMT を誘導した HSC-4 細胞について、BMP-2 刺激による MET 誘導が可能かを調査したが、現在までに、その条件を見出せていない。逆に、BMP-2 の効果は TGF- $\beta$ 1 により打ち消すことが可能であった。TGF- $\beta$ 1 刺激による EMT 誘導された HSC-4 細胞の MET 誘導化が困難な原因を調査するため、TGF- $\beta$ 1 と BMP-2 とのシグナルクロストークの解明を行なった。その結果、TGF- $\beta$ 1 刺激により Smad 経路の分解に關わる E3 リガーゼ類や、SnoN などの Smad 経路抑

制タンパク質の発現上昇が見出された。また、TGF- $\beta$ 1により、NogginなどのBMP阻害タンパク質の発現上昇が見出された。このため、TGF- $\beta$ 1刺激によりEMTを誘導されたHSC-4細胞においては、その後のBMP-2の単独刺激では、METを誘導することが困難であると考えられた。

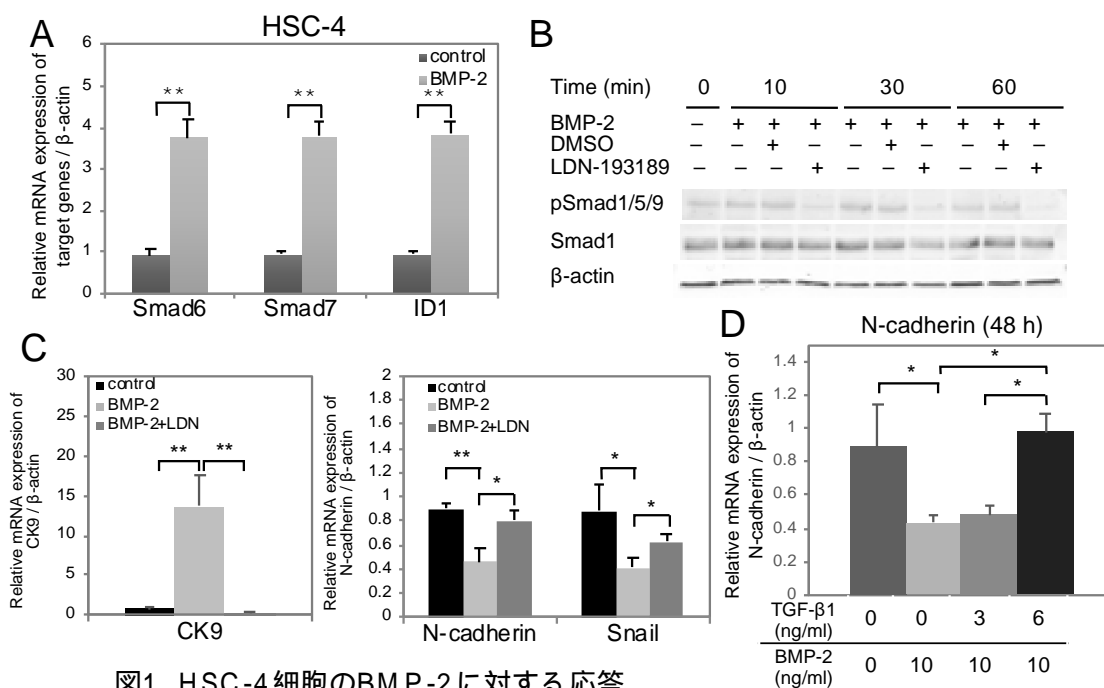


図1. HSC-4細胞のBMP-2に対する応答

(2) これまでにEMT関連転写因子Slugは、vimentinなどの発現増大に関するが、N-cadherinの発現増大に関与していないことを報告している。そこで、Slugに非依存的なEMT関連遺伝子を調べたところ、Laminin $\alpha$ 3が見出された。そこで、転写因子の検索を行なった結果、HSC-4細胞においてTGF- $\beta$ 1刺激はSox9の発現を上昇することが示され(図2A)、hOSCC細胞としては、SAS細胞も同様にSox9の発現増大が見られた。またSox9の遺伝子ノックダウンによりN-cadherinの発現が抑制された(図2B)。さらにSox9を遺伝子ノックダウンしたHSC-4細胞の遊走能を調べたところ有意に低下した。以上の結果により、Sox9はN-cadherinの発現の増大に関与する転写因子であることが示された。また、TGF- $\beta$ 1刺激によりSlugと同様にSox9の細胞質から核への移行を促進することが示された。このSox9の核移行にはサイクリックAMP依存性タンパク質キナーゼ(PKA)によるリン酸化によるpSox9化が必要であることが知られている。そこで、pSox9の細胞内局在化を調べたところ、PKA阻害剤であるH-89により、Sox9の核移行が抑制された。またN-cadherinの発現がH-98により抑制され、プロテインセリン・スレオニンホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸により増加した。以上の結果は、Sox9のリン酸化がN-cadherinの発現増大に重要であることを示している。

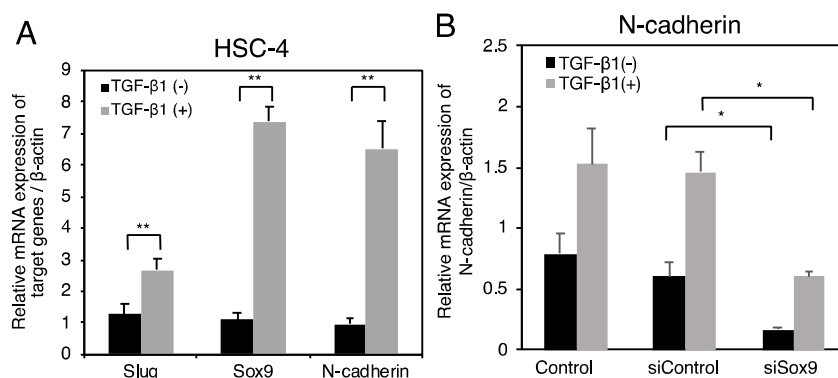


図2. Sox9の発現とN-cadherinの発現

(3) 高密度条件でHSC-4細胞を培養すると、E-cadherinは細胞膜表面に局在して高発現したが、低密度条件では細胞質に点状に観察された。一方、N-cadherinの発現は低密度条件のみで観察された。RT-qPCR法では高密度条件よりも低密度条件で有意に高いN-cadherinが発現したのに対して、低密度条件では高密度条件よりもE-cadherinの発現は減少した。この発現変動はLMF-4細胞においても、同様に見出された。これらの結果は、E-cadherinおよびN-cadherinの発現

が hOSCC 細胞の細胞密度の変化によって相反的に調節されていることを示している。

E-及び N-cadherin の発現レベルが、Hippo 経路のエフェクター分子である YAP/TAZ に依存するかどうかを調べたところ、HSC-4 細胞での E-cadherin の発現は上昇し、N-cadherin の発現は減少することが、YAP の遺伝子をノックダウンによる RT-qPCR 法により明らかとなった (図 3A)。また、低密度条件下で YAP/TAZ の核内移行が確認されたことから、HSC-4 細胞株における E-cadherin から N-cadherin への cadherin の発現変化である "cadherin switch" には Hippo 経路が関与していることが示唆された。

EMT 関連転写因子 Slug の cadherin switch への関与を調べたところ、Slug の siRNA によりノックダウンすると、E-cadherin の発現上昇が RT-qPCR 法により見出された。さらに、Slug は低密度条件下では、HSC-4 細胞の核に局在するが、高細胞密度では細胞質に局在することが観察された。この Slug の核局在化は、siYAP による YAP の遺伝子ノックダウンにより抑制された (図 3B)。これらの結果より、EMT 関連転写因子 Slug の核移行は、Hippo 経路のターゲット因子であると共に、転写共役因子である YAP により正に調節され、E-cadherin 発現抑制には Slug が関与することが示された。

E-cadherin などの細胞間接着分子の多くは、その接着機能のために  $Ca^{2+}$  を必要とする。そこで細胞表面での  $Ca^{2+}$  依存性接着タンパク質の cadherin switch への関与を調べた。通常  $Ca^{2+}$  培養条件下と比較して、 $Ca^{2+}$  枯渇処理後に YAP の核局在化が顕著に観察されたため、 $Ca^{2+}$  依存的な細胞接着分子の関与が示唆された。そこで、E-cadherin を介した細胞間接着の崩壊が YAP の核局在化にどのように影響するかを調べた。細胞間の E-cadherin 間の接着を阻害する、E-cadherin の中和抗体の投与により、HSC-4 細胞の YAP の核局在化が促進される (図 3C) と共に、N-cadherin の発現上昇および E-cadherin の発現抑制が認められた。以上より、E-cadherin の細胞間接着の崩壊は、Hippo 経路依存的に cadherin switch を誘導することが示された。

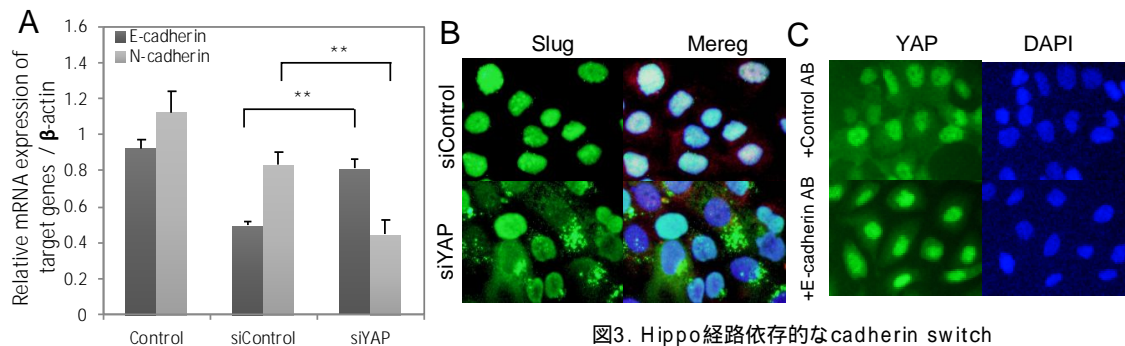


図3. Hippo経路依存的なcadherin switch

(4) TGF- $\beta$ 1 により誘導された EMT 化 HSC-4 細胞は、BMP-2 による刺激では MET を誘導しないことが示されたため、癌組織の微少環境であるニッチを構成している細胞成分である、線維芽細胞及びマクロファージ (M ) との共培養系における相互作用について、サイトカイン/ケモカインの発現変化の解析を行い EMT/MET に関与する因子の検索を行なった。この結果、HSC-4 細胞において、TGF- $\beta$ 1 刺激により、HSC-4 細胞において、癌細胞の抑制に作用する CXCL14 の発現が上昇し、この発現には Smad 経路が関与していることが見出された (図 4A)。この CXCL14 は、HSC-4 細胞の遊走能及び増殖能を抑制することが示された。一方、M との共培養では、M において発現が増大する CCL20 により、HSC-4 細胞での CXCL14 の発現は抑制されることを見出した (図 4B)。現在、癌細胞との共培養による M での CCL20 の発現機構の解析並びに、HSC-4 細胞における CCL20 の CXCL14 の発現抑制機構及び EMT/MET への関与について解析を行なっている。

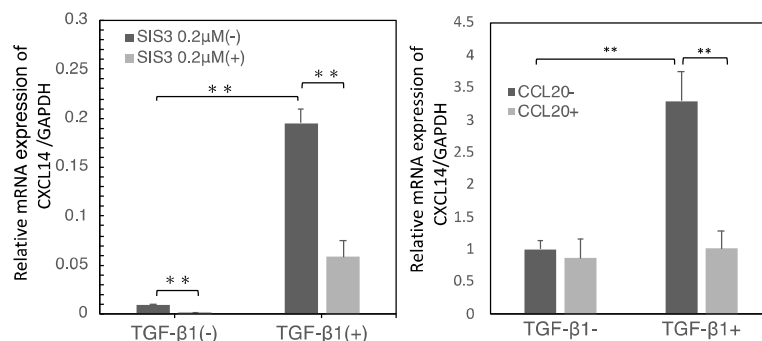


図4. CXCL14の発現

以上の結果から、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 細胞において、(1) TGF- $\beta$ 1 は EMT を誘導す

るのに対して、BMP-2 は、逆に MET を誘導することが示唆された。(2)EMT において、転写因子である Slug と Sox9 は、それぞれ E-cadherin の発現抑制、及び N-cadherin の発現を増加させる機能をもつことが示された。(3)細胞密度の低下は、E-cadherin による細胞間接着を崩壊させ、YAP/TAZ の活性化を誘導し、Slug の核内移行を促進することにより cadherin switch を誘導することが示された。(4)M<sup>1</sup> との相互作用により、EMT により発現増大する癌抑制因子 CXCL14 の発現が M<sup>1</sup> 由来の CCL20 により抑制されることが示された。以上より、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移に關与する EMT/MET の機構の一端を解明することができた。なお、(1)の一部は、*Oncol Rep*, 37:713-720, 2017 に、(2)は、*Oncol Lett*, 20:474-482, 2020 に、(3)については、*Dent J Iwate Med Univ*,45:23-34, 2020 にて発表した。

#### <引用文献>

- 1) Saito, D., S. Kyakumoto, N. Chosa, M. Ibi, N. Takahashi, N. Okubo, S. Sawada, A. Ishisaki, and M. Kamo. 2013. Transforming growth factor- 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin 3 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. *J Biochem.* 153:303-315.
- 2) Hino, M., M. Kamo, D. Saito, S. Kyakumoto, T. Shibata, H. Mizuki, and A. Ishisaki. 2016. Transforming growth factor- 1 induces invasion ability of HSC-4 human oral squamous cell carcinoma cells through the Slug/Wnt-5b/MMP-10 signalling axis. *J Biochem.* 159:631-640.
- 3) Wakefield, L.M., and C.S. Hill. 2013. Beyond TGF : roles of other TGF superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer.* 13:328-341.
- 4) del Pozo Martin, Y., D. Park, A. Ramachandran, L. Ombrato, F. Calvo, P. Chakravarty, B. Spencer-Dene, S. Derzsi, C.S. Hill, E. Sahai, and I. Malanchi. 2015. Mesenchymal Metastatic Colonization. *Cell Rep.* 13:2456-2469.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hirano T, Saito D, Komatsu Y, Yamada H, Ishisaki A, Kamo M.	4. 巻 45
2. 論文標題 YAP/TAZ activation, induced by disruption of E-cadherin-mediated cell-to-cell contact, promotes the cadherin switch by facilitating nuclear translocation of Slug in human oral squamous cell carcinoma HSC-4 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dent. J. Iwate Med. Univ.	6. 最初と最後の頁 23 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Taifu, Saito Daishi, Yamada Hiroyuki, Ishisaki Akira, Kamo Masaharu	4. 巻 20
2. 論文標題 TGF- 1 induces N-cadherin expression by upregulating Sox9 expression and promoting its nuclear translocation in human oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 474 ~ 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 加茂政晴, 齋藤大嗣, 樋野雅文, 千葉高大, 山田浩之, 石崎明	4. 巻 43
2. 論文標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-4における細胞遊走・浸潤能に關与するTGF- 1誘導性上皮間葉転換の分子機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 岩医大歯誌	6. 最初と最後の頁 107~121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 加茂政晴, 平野大輔, 松本識野, 相原恵子, 横田聖司, 帖佐直幸, 客本齊子, 石崎明	4. 巻 27
2. 論文標題 TGF- 1とBMP-2はヒト扁平上皮癌細胞HSC-4の上皮間葉転換に対して相反的に作用する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 口腔組織培養学会誌	6. 最初と最後の頁 39~40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chiba Takahiro, Ishisaki Akira, Kyakumoto Seiko, Shibata Toshiyuki, Yamada Hiroyuki, Kamo Masaharu	4. 巻 37
2. 論文標題 Transforming growth factor- 1 suppresses bone morphogenetic protein-2-induced mesenchymal-epithelial transition in HSC-4 human oral squamous cell carcinoma cells via Smad1/5/9 pathway suppression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 713 ~ 720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2016.5338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平野大輔, 武田啓, 齋藤大嗣, 山田浩之, 石崎明, 加茂政晴
2. 発表標題 ヒト扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換におけるSlug/Sox9の役割とHippo経路の関与
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野大輔, 武田啓, 大橋祐生, 宮本郁也, 山田浩之, 加茂政晴
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-4におけるTGF- 誘導性上皮間葉転換機構の解析
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野大輔, 武田啓, 石川雄大, 齋藤大嗣, 小松祐子, 柴田敏之, 山田浩之, 石崎明, 加茂政晴
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞においてSox9はHippo経路を介しTGF- 誘導上皮間葉転換のcadherin switchを制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田啓, 加茂政晴, 石崎明, 宮本郁也, 山田浩之
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 の上皮間葉転換におけるケモカインの作用について
3. 学会等名 岩手医科大学歯学会第88回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野大輔, 齋藤大嗣, 小松祐子, 千葉高大, 樋野雅文, 横田 聖司, 客本齊子, 帖佐直幸, 山田浩之, 石崎 明, 加茂政晴
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換におけるHippo経路の関与
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第84回例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野 大輔, 武田 啓, 齋藤 大嗣, 柴田 敏之, 山田 浩之, 石崎 明, 加茂 政晴
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるSox9とHippo経路の上皮間葉転換への関与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉高大, 樋野雅文, 齋藤大嗣, 杉山芳樹, 山田浩之, 加茂政晴
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-4において、TGF- $\beta$ 1はBMP-2により誘導された間葉上皮転換をSmad1/5/9経路の抑制を介して制御する
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 加茂政晴、客本齊子、石崎明
2. 発表標題 ヒト扁平上皮癌細胞HSC-4においてTGF- 1はBMP-2シグナルの減弱によりBMP-2誘導性間葉上皮転換を抑制する
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加茂政晴、平野大輔、松本識野、相原恵子、横田聖司、帖佐直幸、客本齊子、石崎明
2. 発表標題 TGF- 1とBMP-2はヒト扁平上皮癌細胞HSC-4の上皮間葉転換に対して相反的に作用する
3. 学会等名 第54回日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石崎 明  (Ishisaki Akira)  (20356439)	岩手医科大学・歯学部・教授   (31201)	
研究 分担者	小松 祐子  (Komatsu Yuko)  (90781625)	岩手医科大学・歯学部・助教   (31201)	