

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02969

研究課題名(和文)先駆的癌性EMTマーカー分子の機能解析と口腔癌由来循環内腫瘍細胞の検出への応用

研究課題名(英文)Functional analysis of cancer-associated EMT in circulating tumor cells and oral cancer cells

研究代表者

齋藤 正夫(Saitoh, Masao)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90345041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：がんの悪性度を促進する分子としてSnailとZEB1/2が知られ、悪性度の高い癌細胞は両分子の発現が高進している。本研究では、Etsファミリーの分子群が、巧みにSnailとZEB1/2を同時に発現調節することを明らかにした。そこで、現在もEts分子群を先駆的癌性EMTマーカー分子として位置づけるとともに、循環内腫瘍細胞における役割に検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は周囲の間質内に浸潤し、脈管内に侵入し、転移巣を形成する。この過程にEMTという現象が深く関与していることがわかっており、EMT転写因子によって制御されている。そこで本研究ではEMT転写因子の発現制御機構を検討し、Etsファミリー分子群が正と負に調節していることを見いだした。Ets1とEts2はEMTを促進する作用を、ESE1とESE3は抑制する作用を持っていた。したがって、原発巣でこれらの分子群の発現を検討することで、遠隔転移や循環内腫瘍細胞になりうる細胞を診断でき、悪性度をより詳細に評価できる点が学術的にも社会的にも意義が高いところである。

研究成果の概要(英文)：Snail and ZEB1/2 (ZEB1 and ZEB2), known as EMT transcription factors, are key regulators of this transition. ZEB1/2 are positively correlated with EMT phenotypes and the aggressiveness of cancers. On the other hand, Snail is also correlated with the aggressiveness of cancers, but is not correlated with the expression of EMT marker proteins. Snail is induced by transforming growth factor- β (TGF- β), a well-known inducer of EMT, in various cancer cells. Interestingly, Snail induction by TGF- β is markedly enhanced by active Ras signals. Thus, cancer cells harboring an active Ras mutation exhibit a drastic induction of Snail by TGF- β alone. Here, we found that members of the E26 transformation-specific (Ets) transcription factor family, Ets1 and Ets2, contribute to the upregulation of both Snail and ZEB1/2. Thus, Ets1 is a crucial molecule for regulating Snail and ZEB1/2, and thus cancer progression is mediated through post-translational modification of the exon VII domain.

研究分野：がん細胞生物

キーワード：EMT TGF- β がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition; EMT) は発生期の器官形成過程に必須なプロセスであるとともに、創傷治癒など生理学的にも重要なメカニズムである、またがん細胞の分化制御機構としても知られている。一般に EMT を獲得した癌細胞は、運動性、抗がん剤(ストレス)耐性能だけでなく、がん幹細胞や循環内腫瘍細胞へ効率良く分化させ、予後を非常に悪くしている。近年報告された、循環内腫瘍細胞 (CTC) が EMT 様の形質変化を獲得している研究結果は、これまでの研究を裏づける結果である。しなしながら、これまでに、EMT を的確に評価する分子マーカーが無く、診断や治療への応用が困難であったことから、研究代表者の先行研究をもとに、EMT の分子マーカーを確立し、診断や治療に応用することは急務である。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでの EMT に関する研究のなかで、転写調節による「発現量変化」と選択的スプライシング調節による「質の変化」から生じた EMT 特異なタンパク質分子を探索し、これまでに無い全く新たな指標を、“先駆的癌性 EMT 分子マーカー”として位置づけることを目的とした。新規のマーカー分子と思われる複数の遺伝子を細胞に導入し解析したところ、その中のある Ets 関連遺伝子群によって、顕著な EMT が誘導 (上皮分子マーカー E-cadherin の低下と間葉系分子マーカー N-cadherin の上昇) され、EMT 実行転写因子の ZEB1/ZEB2 や Snail をも劇的に上昇した。さらに高い運動性や抗癌剤耐性も確認され、非常に興味深いことに、細胞培養用 plate から離脱し、CTC 様に振る舞うことがわかった。そこで、本研究では、Ets 関連遺伝子群を「先駆的癌性 EMT マーカー分子」として確立するために、その分子機能解析や癌性 EMT 誘導の分子機構、癌性 EMT 様細胞形質の特性などの解明を目的とした。

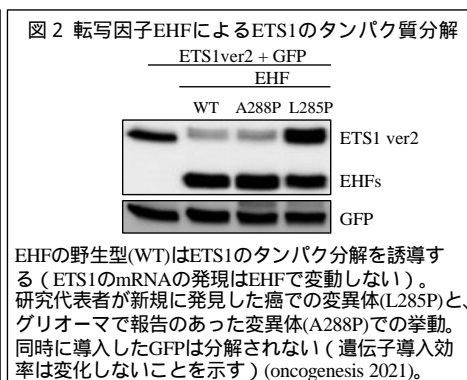
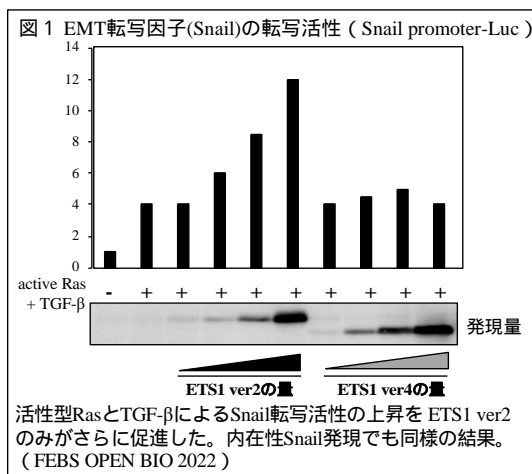
3. 研究の方法

がん細胞が産生する TGF- β と間質細胞の産生する液性因子が協調し劇的に EMT を促進した結果、新たに「発現変動」と「選択的スプライシング変動」する遺伝子のスクリーニングを、すでに行い、候補遺伝子の絞り込みを乳癌細胞や膵癌細胞でおこなってきた。そこで、本研究では、口腔がん細胞に応用し、複数ある口腔癌細胞を EMT の観点から characterize する。さらに、これまで絞り込んだ候補遺伝子と口腔癌の EMT とを比較検討を分子生物学的・細胞生物学的に検討する。また必要に応じて、病理学的にも検討を加える。CTC が血小板に付着することが知られており、EMT を獲得させた癌細胞と血小板との相互作用などを in vitro またはマウス組織をつかって解析する。

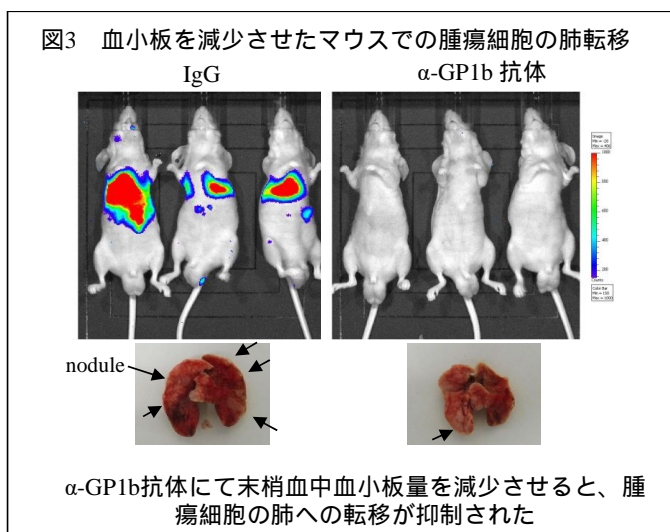
4. 研究成果

これまでの先行研究をもとに解析した結果、多数の遺伝子候補から ETS ファミリータンパク質 (ETS1 と EHF) を絞り込み、in vitro、マウス・ヒトでの解析を行った。まず、がん遺伝子である ETS1 が、ver4 から ver2 へ選択的スプライシング変化することを実験的に確認した。さらに、ETS1ver2 のみが、劇的に EMT 転写因子の ZEB1/2 と Snail の発現を同時に上昇させ (図 1 (1)) EMT 分化マーカー誘導 (上皮分子マーカー発現低下と間葉系分子マーカー発現上昇) のみならず、高い運動性や抗癌剤耐性も誘導した。したがって、がん遺伝子 ETS1 ver2 は Ras の下流で、発がんに関与するばかりでなく、悪性分化転換機能にも関与するマスター因子であることが判明した (1)。ただし、ETS1 が Ras の下流で細胞老化も誘導することも知られており、現在、選択的スプライシング変異体による機能解析を進めている。

一方、EHF は、ETS1 のタンパク質の分解促進する (mRNA 発現には影響しない)、非常に新奇な現象 (de novo タンパク質にも依存しない) を世界に先駆けて発見し、マウスやヒト病理組織での解析もおこなった。最も重要な点として、ETS1 分解活性を消失するような EHF の新規遺伝子変異を発見し (図 2) ヒト病理組織由来のゲノム DNA 中での解析も行った (Sakamoto 2021 Oncogenesis, Ichikawa 2022)。



近年の CTC に関する研究では、CTC が血小板に結合し活性化させ、血小板から放出された TGF-β などによって、CTC に EMT が誘導・維持され、生存していることがわかっている。実際、がん細胞によって活性化された血小板から TGF-β などのサイトカインの放出も確認でき、逆に、マウスの血小板を約 80% 減少させると、がん細胞の肺転移が劇的に減少した(図3)。この時、血小板と同時に移植した場合には転移能



の回復が確認された (Ichikawa J. Bone Miner Res. 2020)。これらの結果を、現在 ETS1 や EHF との相関性に関し、研究をさらに発展させている。

発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)
すべて査読有り

1. Ichikawa MK, Endo K, Itoh Y, Osada AH, Kimura Y, Ueki K, Yoshizawa K, Miyazawa K, Saitoh M. Ets family proteins regulate the EMT transcription factors Snail and ZEB in cancer cells 2022 FEBS Open Bio. 2022 Apr 22. doi: 10.1002/2211-5463.13415.
2. Ichikawa MK, Saitoh M. Direct and indirect roles of GRWD1 in the inactivation of p53 in cancer. J Biochem. 2022 Feb 16;mvac010. doi: 10.1093/jb/mvac010.
3. Kimura Y, Yoshizawa K, Hotta-Osada A, Moroi A, Ishii H, Sakurai D, Saitoh M, Oishi N, Kondo T, Ueki K. High expression of protein tyrosine kinase 7 in oral squamous cell carcinoma: Clinicopathological correlation and prognosis relevance, Clinical and Experimental Dental Research Clin Exp Dent Res. 2022 2, 506-512. doi: 10.1002/cre2.553.
4. Yoshizawa K, Kimura Y, Moroi A, Ishii H, Sakurai D, Saitoh M, Oishi N, Kondo K, Toyoura M, Ueki K. Loss of intercellular bridges in the depth of invasion measurement area is a novel negative prognostic factor for oral squamous cell carcinoma: a retrospective study, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology in press 2022 10.1016/j.oooo.2022.02.017

5. Sakamoto K, Endo K, Sakamoto K, Kayamori K, Ehata S, Ichikawa J, Ando T, Nakamura R, Kimura Y, Yoshizawa K, Masuyama K, Kawataki T, Miyake K, Ishii H, Kawasaki T, Miyazawa K, and Saitoh M. EHF suppresses cancer progression by inhibiting ETS1-mediated ZEB expression. *Oncogenesis* 2021 10, 26
6. Motizuki M, Koinuma D, Yokoyama T, Itoh Y, Omata C, Miyazono K, Saitoh M, Miyazawa K. TGF- β -induced cell motility requires down-regulation of ARHGAPs to sustain Rac1 activity. *J Biol Chem.* 2021, 296, 100545
7. Otake S, Itoh Y, Omata C, Saitoh M, Miyazawa K, ZEB1 and oncogenic Ras constitute a regulatory switch for stimulus-dependent E-cadherin downregulation *Cancer Sci* 2020 112, 205-216
8. Ichikawa J, Ando T, Kawasaki T, Sasaki T, Shirai T, Tsukiji N, Kimura Y, Aoki K, Hayakawa K, Suzuki-Inoue K, Saitoh M, Haro H. Role of platelet C-type lectin-like receptor 2 in promoting lung metastasis in osteosarcoma. *J. Bone Miner. Res.* 2020 35,1738-1750
9. Ishii H, Saitoh M, Sakamoto K, Sakamoto K, Saigusa D, Kasai H, Ashizawa K, Miyazawa K, Takeda S, Masuyama K, Yoshimura K. Lipidome-based rapid diagnosis with machine learning for detection of TGF- β signalling activated area in head and neck cancer. *Br J Cancer.* 2020 Mar;122(7):995-1004.
10. Osada AH, Endo K, Kimura Y, Sakamoto K, Nakamura R, Sakamoto K, Ueki K, Yoshizawa K, Miyazawa K, Saitoh M. Addiction of mesenchymal phenotypes on the FGF/FGFR axis in oral squamous cell carcinoma cells. *PLoS One.* 2019 Nov 4;14(11):e0217451.
11. Itoh Y, Koinuma D, Omata C, Ogami T, Motizuki M, Yaguchi SI, Itoh T, Miyake K, Tsutsumi S, Aburatani H, Saitoh M, Miyazono K, Miyazawa K. A comparative analysis of Smad-responsive motifs identifies multiple regulatory inputs for TGF- β transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2019 Oct 18;294(42):15466-15479. doi: 10.1074/jbc.RA119.009877. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31481467
12. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem.* 2018 Oct 1;164(4):257-264

〔学会発表〕(計 10件)

- 1 . 坂本要、宮澤恵二、斉藤正夫 頭頸部癌細胞における ZEB と ETS ファミリー分子の機能解析 第 77 回日本癌学会総会 2018 年 9 月 28 日 大阪
- 2 . 斉藤正夫 がんの heterogeneity と EMT シグナル 日本口腔外科学会関東地方会 2018 年 5 月 26 日 甲府
- 3 . 中村亮介、斉藤正夫 口腔扁平上皮癌細胞における slug,snail の役割の解析 第 55 回日本口腔組織培養学会 2018 年 11 月 10 日 兵庫
- 4 堀田麻美、中村亮介、吉澤邦夫、斉藤正夫 口腔扁平上皮癌細胞における FGFR1c isoform の機能解析 第 55 回日本口腔組織培養学会 2018 年 11 月 10 日 兵庫
- 5 . Masao Saitoh Ets family proteins regulate aggressiveness of head and neck cancer cells 歯科基礎医学会総会 2019 年 10 月 13 日 東京
- 6 . 石井裕貴、斉藤正夫、坂本要、宮澤恵二、竹田扇、吉村健太郎 Diagnosis of activated TGF- β signaling in head and neck cancer by ambient mass spectrometry with machine learning. 第 78 回日本癌学会総会 2019.9.26-28 京都

- 7 . 坂本要、宮澤恵二、斉藤正夫 A novel point mutation of EHF functions as an EMT promoter via regulating ETS-ZEB pathway 第 78 回日本癌学会総会 2019.9.26-28 京都
- 8 .小泉 舞、宮澤 恵二、斉藤 正夫 Involvement of STAT3 and Ets1 in Snail induction by TGF-β. 第 79 回日本癌学会総会 2020.10.1-10.3 広島
- 9 .大嶽茂雄、斉藤正夫、宮澤恵二 Novel mechanism of E-cadherin downregulation by ZEB1 and oncogenic Ras 第 79 回日本癌学会総会 2020.10.1-10.3 広島
- 10 .小泉 舞、宮澤 恵二、斉藤 正夫 Regulation of EMT transcription factors by Ets1 第 80 回日本癌学会総会 2021.9.30-10.2 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石井 裕貴

ローマ字氏名：Hiroki Ishii

研究協力者氏名：坂本 啓

ローマ字氏名：Kei Sakamoto

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 1. Ichikawa MK, Endo K, Itoh Y, Osada AH, Kimura Y, Ueki K, Yoshizawa K, Miyazawa K, Saitoh M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Ets family proteins regulate the EMT transcription factors Snail and ZEB in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13415.	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 2. Ichikawa MK, Saitoh M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct and indirect roles of GRWD1 in the inactivation of p53 in cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac010	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 3. Kimura Y, Yoshizawa K, Hotta-Osada A, Moroi A, Ishii H, Sakurai D, Saitoh M, Oishi N, Kondo T, Ueki K.	4. 巻 -
2. 論文標題 High expression of protein tyrosine kinase 7 in oral squamous cell carcinoma: Clinicopathological correlation and prognosis relevance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dental Research Clin Exp Dent Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cre2.553.	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 4. Yoshizawa K, Kimura Y, Moroi A, Ishii H, Sakurai D, Saitoh M, Oishi N, Kondo K, Toyoura M, Ueki K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Loss of intercellular bridges in the depth of invasion measurement area is a novel negative prognostic factor for oral squamous cell carcinoma: a retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oooo.2022.02.017	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 5. Sakamoto K, Endo K, Sakamoto K, Kayamori K, Ehata S, Ichikawa J, Ando T, Nakamura R, Kimura Y, Yoshizawa K, Masuyama K, Kawataki T, Miyake K, Ishii H, Kawasaki T, Miyazawa K, and Saitoh M	4. 巻 -
2. 論文標題 EHF suppresses cancer progression by inhibiting ETS1-mediated ZEB expression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00313-2.	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 6. Tanabe Y. Maruoka Y. Kondo J. Yagi S. Chikaze D. Okamoto R. and Saitoh M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Dispersion of Aerosols Generated during Dental Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 11279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph182111279	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 7. Motizuki M, Koinuma D, Yokoyama T, Itoh Y, Omata C, Miyazono K, Saitoh M, Miyazawa K.	4. 巻 296
2. 論文標題 TGF- β -induced cell motility requires down-regulation of ARHGAPs to sustain Rac1 activity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 100545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100545	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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小泉 舞宮澤 恵二, 斉藤 正夫
2. 発表標題 Involvement of STAT3 and Ets1 in Snail induction by TGF- β .
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井裕貴、斉藤正夫
2. 発表標題 Diagnosis of activated TGF- β signaling in head and neck cancer by ambient mass spectrometry with machine learning
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaname Sakamoto, Keiji Miyazawa, and Masao Saitoh
2. 発表標題 A novel point mutation of EHF functions as an EMT promoter via regulating ETS-ZEB pathway
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本要、宮澤恵二、斉藤正夫
2. 発表標題 頭頸部癌細胞における ZEBとETSファミリー分子の機能解析
3. 学会等名 第38回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村亮介、斉藤正夫
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞におけるslug, snailの役割の解析
3. 学会等名 第55回日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田麻美、中村亮介、吉澤邦夫、斉藤正夫
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞におけるFGFR1c isoformの機能解析
3. 学会等名 第55回日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斉藤正夫
2. 発表標題 がんのheterogeneityとEMTシグナル
3. 学会等名 日本口腔外科学会・関東支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------