

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09809

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるGATA転写因子の分子病態の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of GATA transcription factors in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

今井 智章 (Imai, Tomoaki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80599598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：GATA転写因子は6種類からなり、組織の恒常性と形態形成の重要性に加え、近年では各種固形癌の生物学的behaviorとの関連性が知られるが、口腔扁平上皮癌(OSCC)については不明である。GATA6の比較的高発現を示すOSCC細胞株Ca9.22、HSC3、HSC4、V-SASに対しshRNAの遺伝子導入によりGATA6発現を抑制させると上皮間葉系転換(EMT)マーカーの発現が上昇する一方、GATA6低発現細胞株HSC2に対するGATA6過剰発現系では同マーカーの発現は低下した。以上より、GATA6はOSCCのEMTを制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会の進行により口腔扁平上皮癌(OSCC)の罹患率は上昇している。局所進行癌や転移を伴う状態では、予後不良となる症例は依然として少なくない。口腔粘膜は恒常的に多様な刺激に晒されており、癌発生や浸潤・転移の過程でEMTの関与が指摘されている。EMTを制御できれば、癌の浸潤・転移も抑止できると考えられる。したがって本研究により、OSCCの悪性化、進展化の分子機序要因となりうるEMTについて、これまで未解明であったGATA6からの切り口より知見が加わってOSCC制御のための新たな視点が展開する足掛かりになったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：GATA family of transcription factors consists of six members and is important for tissue homeostasis and morphogenesis. Although they are associated with the biological behavior of various solid malignant tumors, few data is available on oral squamous cell carcinoma (OSCC).

In this study, we focused on GATA6, and found that the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers increased when GATA6 expression was suppressed by shRNA gene transfer in OSCC cell lines (Ca9.22, HSC3, HSC4, and V-SAS), which showed relatively high expression of GATA6. On the other hand, overexpression of GATA6 in the low expression cell lines (HSC2) lead to decrease in the expression of those markers. These results suggest that GATA6 may regulate EMT in OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 上皮間葉転換

## 1. 研究開始当初の背景

GATA 転写因子ファミリーは、WGATAR コンセンサス配列に Zn フィンガードメインを介して結合する分子で、これまで 6 種類が同定されている。これらは生物種を超えて広く保存されており、各臓器の初期発生から分化、機能維持に重要な役割を果たす。そのうち、GATA1, 2, 3 は主に血球系細胞において、GATA4, 5, 6 は心臓や消化器系、泌尿・生殖器系臓器の発生に必須の因子である。研究代表者はかつて精巣生殖系をモデル系とした幹細胞 支持細胞システムにおける微小環境の解析研究 (Terada *et al.* J Biochem 2003; Terada *et al.* EMBO J 2005) とともに、支持細胞による精細胞維持に GATA4 が基盤的役割を果たすことを報告した (Imai *et al.* Mol Cell Endocrinol 2004)。

一方、近年では GATA 因子は消化器癌、乳癌などの固形癌や白血病の発生・悪性化に深く関与していることが明らかとなっている。乳癌では GATA3 は腫瘍抑制的に作用して上皮間葉変換を阻止し、化学療法効果や生命予後と逆相関することが知られ、消化器癌では GATA4, 5 の発現低下と GATA6 の発現上昇/低下が報告されている。しかし、口腔扁平上皮癌 (OSCC) における GATA 因子の分子病態については未解明である。

## 2. 研究の目的

OSCC の浸潤・転移を誘導する GATA 因子の役割を解明することである。

## 3. 研究の方法

理化学研究所より購入した各種 OSCC 細胞株と、我々が以前に樹立した細胞株 (ヒト低分化型舌扁平上皮癌由来細胞株 SAS に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現ベクターを導入した V-SAS 細胞株と、V-SAS をマウス舌に接種し、リンパ節転移形成後、in vivo selection を繰り返すことにより樹立した高転移能株 V-SAS-LM8 (Morita *et al.* Int J Oncol, 2012)) を用いて、OSCC 細胞株における GATA 因子の発現を解析する。

膵癌や膀胱癌において GATA6 が上皮間葉転換 (EMT) を制御している可能性があることが報告されていることより、GATA 因子のうち GATA6 をメインターゲットとして解析を進める。

GATA6 をノックダウンした細胞株を樹立する一方、GATA6 の発現が少ない OSCC 細胞株に GATA6 を過剰発現した細胞株も樹立する。これらを EMT との関連性について解析する。

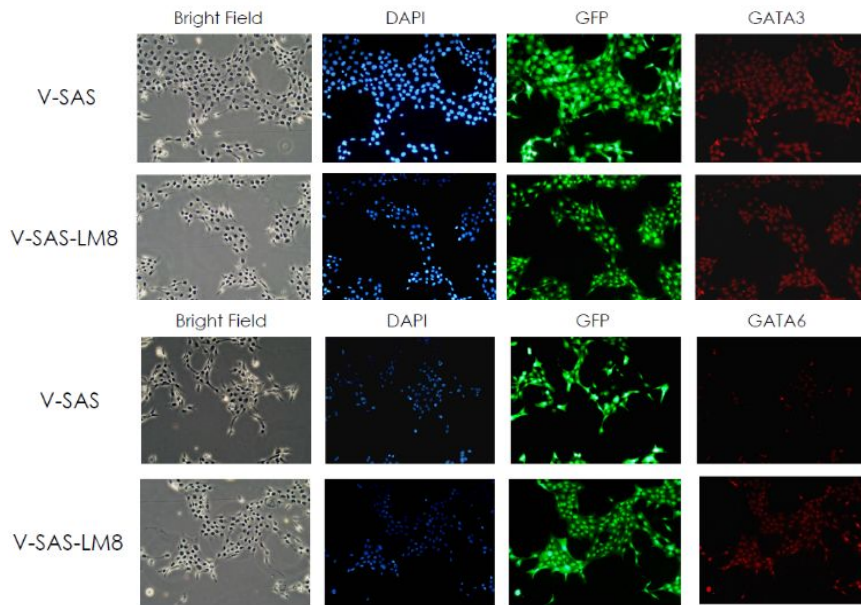
また、臨床検体や細胞株における GATA6 タンパクの発現を確認する。

## 4. 研究成果

定性的 mRNA 発現では、GATA6 が、全株に強発現する一方、他の因子は細胞株特異的なプロファイルを示した (右図)。

	SKN-3	HSC-2	HSC-4	SAS	Ca9-22
GATA3	+	+	+	+	±
GATA4	++	-	-	-	-
GATA5	+	+	+	+	-
GATA6	++	++	++	++	++

細胞免疫染色においては、V-SAS、V-SAS-LM8 とともに、GATA3 や GATA6 の発現を確認できた。ただし GATA6 については培養条件により発現が変動しやすい (下図)。



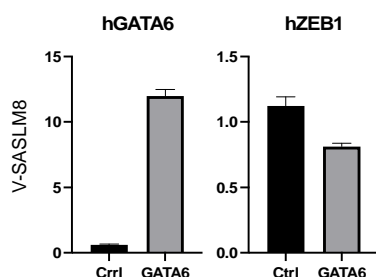
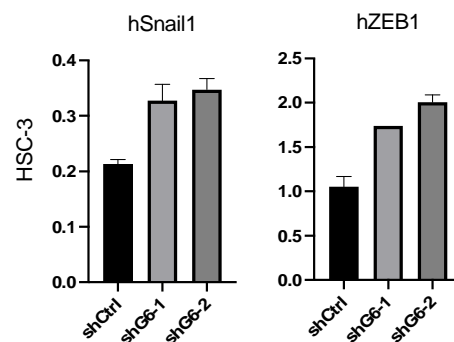
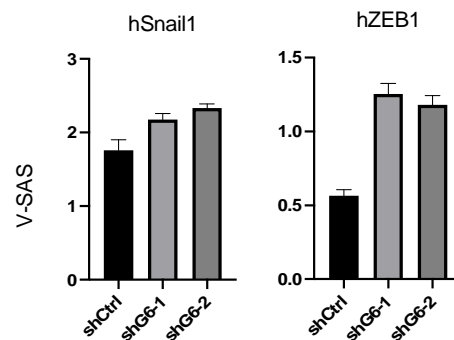
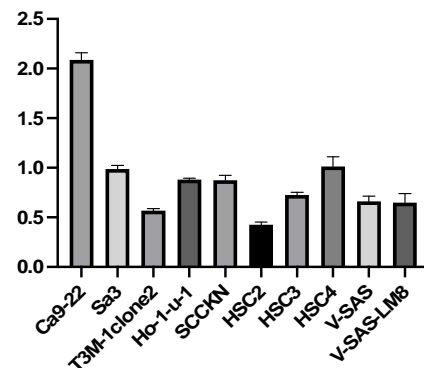
GATA 因子のうち、GATA6 に焦点をしばって検討した。使用した 10 種類の口腔癌細胞株のほとんど全てで GATA6 の発現を認めた。(右図 qPCR)

その中でも比較的高発現を示していた Ca9.22、HSC3、HSC4、V-SAS 細胞株の GATA6 発現を shRNA の遺伝子導入により抑制させたところ、4 種全てで間葉系マーカーの発現上昇を認めた。

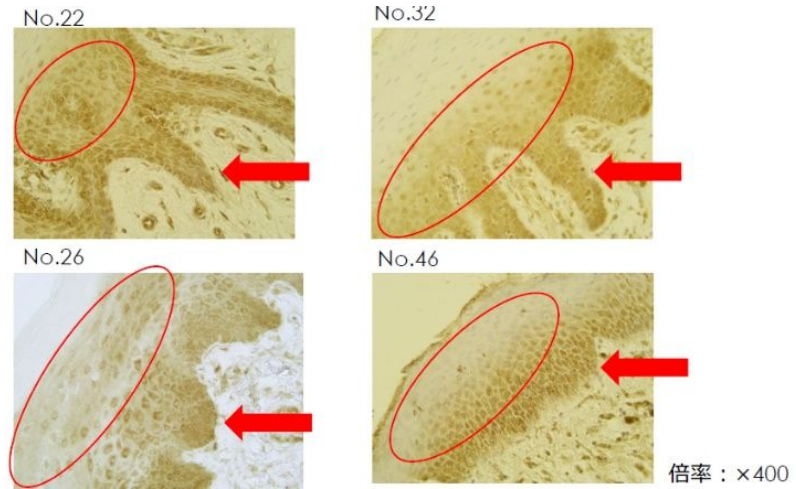
右図 qPCR は GATA6 ノックダウン細胞株 (shG6) において、コントロール株 (shCtrl) よりも間葉系マーカー (Snail1、ZEB1) の mRNA 発現が上昇していること示す。

次に GATA6 が比較的低発現であった HSC2、V-SAS-LM8 細胞株に GATA6 を過剰発現させたところ、両細胞株とも間葉系マーカーの発現低下を認めた。下図 qPCR は V-SAS-LM8 の GATA6 過剰発現細胞株 (GATA6) において、コントロール株 (Ctrl) よりも ZEB1 の mRNA 発現が低下していること示す。

GATA6 expression of OSCCs



臨床検体における免疫組織染色では、GATA6 の発現は主に上皮基底層、棘細胞層に局在していた（右図）。癌浸潤先端部における GATA6 の発現は判然としなかった。



今後は RNA-seq や転写因子におけるチップシーケンス解析を行い、その下流遺伝子を網羅的に解析する予定である。また、臨床検体における GATA6 の発現と臨床パラメーターとの相関を検討し統計学的に評価する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imai T, Nakazawa M, Uzawa N	4. 巻 30
2. 論文標題 Lipoma Rarely Involving Multiple Suprahyoid Fascial Spaces: A Large Lesion Removed With Bimanual Transcervical Finger Dissection Using a "Push-Pull Down" Maneuver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Craniofac Surg	6. 最初と最後の頁 e717-e719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SCS.0000000000005703.	査読の有無 有
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 Imai Tomoaki, Hyodo Miho, Uzawa Narikazu	4. 巻 60
2. 論文標題 Delayed angioedema of the unilateral tongue associated with angiotensin II receptor blocker in a patient with polypharmacy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Australasian Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e164-e165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ajd.12947	査読の有無 有
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 Kubota S, Imai T, Iwai S, Nakazawa M, Uzawa N	4. 巻 -
2. 論文標題 Gingival Neurofibroma With Teardrop-Shaped Defects of the Interdental Alveolar Bone: An Unusual Oral Manifestation of Neurofibromatosis Type 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Craniofac Surg	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） 10.1097/SCS.0000000000005094	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶川ひとみ、森田祥弘、亀山裕泰、今井智章、鷗澤成一
2. 発表標題 口腔癌における予後因子としてのHuman Papillomavirus (HPV) 感染のビッグデータ解析
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩井聡一、今井智章、竹下彰範、加藤逸郎、中澤光博、鶴澤成一
2. 発表標題 頬脂肪体有茎弁移植の上顎欠損部の再建の有用性についての検討
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 岩井聡一、中澤光博、加藤逸郎、今井智章、福武里沙、飯井孝年、竹下彰範、鶴澤成一
2. 発表標題 腎機能障害を有する高齢者進行歯肉癌にPTX+Cmab化学療法でCRを得た症例
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 高山峻、森田祥弘、今井智章、鶴澤成一
2. 発表標題 舌扁平上皮癌のリンパ節転移におけるFibronectin発現に関する免疫組織学的検討
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 今井智章、墨哲郎、岩井聡一、中澤光博、鶴澤成一
2. 発表標題 診断に苦慮した下顎歯肉癌術後に生じた壊疽性膿皮症の1例
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉彩夏、竹下彰範、今井智章、鶴澤成一
2. 発表標題 頬粘膜に生じたオトガイ神経由来の神経鞘腫の1例
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯井孝年、石原翔太、清水英孝、今井智章、亀山裕泰、窪田星子、中澤光博、鶴澤成一
2. 発表標題 舌癌術後に発症した初発症状が非典型的なClostridium difficile感染症の1例
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福武里沙、岩井聡一、今井智章、大家香織、福田康夫、浪花耕平、飯井孝年、加藤逸郎、中澤光博、鶴澤成一
2. 発表標題 舌下腺原発扁平上皮癌の症例
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤逸郎、大前政利、竹下彰範、飯井孝年、岩井聡一、中澤光博、鶴澤成一
2. 発表標題 口腔癌患者100人に対する超選択動注化学放射線療法の治療経験
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
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
研究分担者	鶴澤 成一  (Uzawa Narikazu)  (30345285)	大阪大学・歯学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	中澤 光博  (Nakazawa Mitsuhiro)  (70217701)	大阪大学・歯学部附属病院・講師   (14401)	
研究分担者	森田 祥弘  (Morita Yoshihiro)  (30590517)	大阪大学・歯学研究科・助教   (14401)	

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
---------	---------