

平成 21年 5月 29日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592293  
 研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌の浸潤転移におけるウイントシグナル経路の解析と分子標的治療への応用  
 研究課題名（英文） Analysis of Wnt signal pathway in the invasion and metastasis of oral squamous carcinoma cells and application to molecule target therapy.  
 研究代表者  
 岩井 聡一（IWAI SOICHI）  
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号 10362675

研究成果の概要：beta-catenin の細胞質、核内集積によって、Wnt signal の canonical 経路が活性化され、浸潤能が上昇することが明らかとなった。さらに beta-catenin の細胞内集積は Rho ファミリーの活性化と細胞骨格の再構成により口腔扁平上皮癌細胞の遊走能を亢進させること、この現象に Wnt/beta-catenin 経路の活性化が関与することが明確となった。さらにこの過程に Wnt5a が関与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：シグナル伝達、浸潤、遊走、ウイントシグナル、口腔扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の浸潤、転移についてのメカニズムを解析することは口腔癌の治療における基礎となり、癌の分子標的治療へ繋がる重要な研究である。

Wnt シグナルの破綻は発癌と深い関連があることが判明してきた。様々な報告から Wnt シグナル伝達系が、癌細胞の周囲組織へ浸潤し、転移を引き起こす性質に深く関わっている可能性が高いと考えられるようになってきた。beta-catenin の核や細胞質の集積が大腸癌を含めた多くの癌で報告され、口腔扁平上皮癌においても高頻度に認められることが報告されてきた。(Iwai S et al. J Cancer Res Clin Oncol 2005, 15 Sep 1-10.) さらに、口腔扁平上皮癌の浸潤部位において特に細胞質及び核への集積が見られる事実が報告されている。

通常、Wnt の非存在下では、細胞質内 beta-catenin のタンパク質量は低く保たれている。これは、細胞質内 beta-catenin が Axin を足場タンパク質として adenomatous polyposis coli (APC) や glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 beta)、casein kinase I beta (CKI beta) と複合体を形成し、CKI beta による Ser-45 のリン酸化、GSK-3 beta による Thr-41, Ser-37, Ser-33 のリン酸化、さらにユビキチン化を受け、最終的にプロテアソームにより分解されるためである。一方、Wnt が分泌されて細胞膜上の Frizzled/LRP5, 6 受容体に結合すると、そのシグナルは細胞内へと伝達されて CKI beta が Dishevelled (Dvl) をリン酸化し、リン酸化型 Dvl が GSK-3 beta を不活性化することで beta-catenin のリン酸化の抑制を引き起こす。その結果 beta-catenin

は分解されずに細胞質内に蓄積し、核内へ移行して T cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor (Tcf/Lef) ファミリーの転写因子と複合体を形成し、c-myc, c-jun, fra-1, cyclinD1, matrix metalloproteinase-7 (MMP7)などのさまざまな標的遺伝子の転写活性化を引き起こし種々の細胞機能を制御する。

## 2. 研究の目的

(1) beta-cateninの細胞質及び核への集積が口腔扁平上皮癌の浸潤、遊走、転移に及ぼす影響について解析すること。

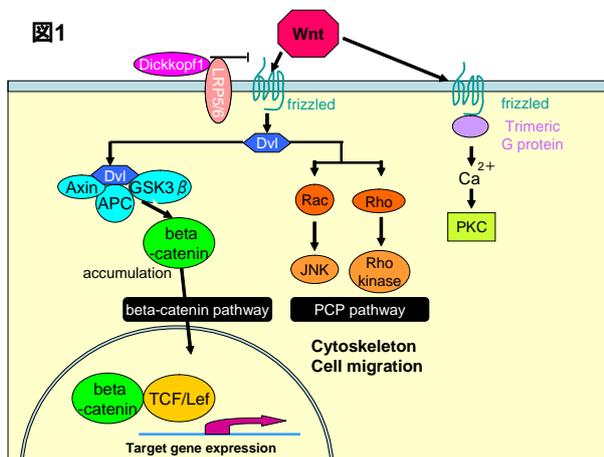
(2) beta-cateninの細胞質及び核への集積が、Wnt/beta-catenin 経路に関与し、転写因子 TCF/Lef を介して標的遺伝子を活性化し、口腔扁平上皮癌の浸潤及び遊走に関与しているかを解析すること。

(3) Wnt /beta-catenin 経路以外の低分子量 G 蛋白質である Rho family を介して平面内細胞極性 (planar cell polarity) を制御する PCP 経路、3 量体 G 蛋白質を介して細胞内で Ca<sup>2+</sup>の動員をひき起こし、PKC や CaMKIIなどを活性化する Ca<sup>2+</sup>経路が口腔扁平上皮癌の悪性化に関与しているのか解析すること。(図1)

(4) beta-cateninの細胞質及び核への集積が、Wnt 自身の発現及び受容体 frizzled に影響を及ぼしているのかを明らかにする。

(5) これらの結果を基礎として、口腔扁平上皮癌の分子標的治療に応用すること。

図1



## 3. 研究の方法

beta-catenin exon 3 のリン酸化部位を欠失した変異型 beta-catenin cDNA とその発現ベクターを検定した。beta-cateninの細胞質、核への集積を認めない細胞株 Ca9-22 に遺伝子導入し、変異型 beta-catenin を発現しかつ細胞質、核へ集積する複数のトランスフェクタントを確立した。(図2, 3)

図2 Tet-off system

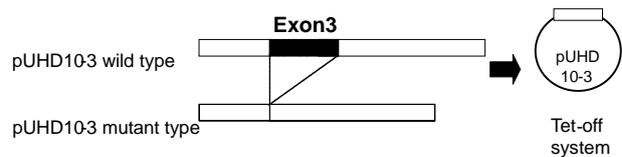
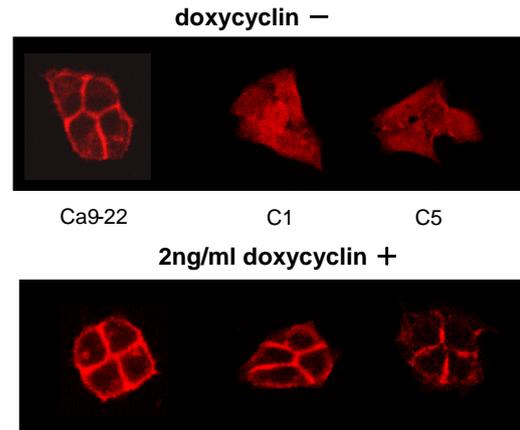


図3 transfectant の確立



複数のトランスフェクタントについて、細胞形態、細胞増殖能、浸潤能、遊走能、造腫瘍能、浸潤増殖様式などの細胞生物学的特性の変化について詳細に検討をおこなった。浸潤能及び遊走能に関しては transwell chamber assay にて検討した。細胞接着状態での一方向への遊走能の検定に wound healing assay を行なった。造腫瘍能に関してはヌードマウスに腫瘍を接種した。ベクターは Tet-off system でドキシサイクリン存在下に、変異型 beta-catenin の発現を抑制できるシステムとした。

beta-catenin 経路の標的遺伝子の発現については RT-PCR、Realtime PCR にて検出した。未知の標的遺伝子のスクリーニングには DNA microarray 解析を行った。MMP7 の proteolysis 活性は casein zymography にて解析した。TCF/Lef 依存の転写活性の解析には luciferase assay を行った。TCF/Lef 依存性の確認に dominant negative TCF4 を使用した。低分子量 G 蛋白質である Rho, Rac, Cdc42 の活性の検出は、Rho family activation assay kit (Cytoskeleton, Denver, USA) を使用して行った (pull down assay)。アクチンフィラメントの再構成は細胞蛍光免疫染色にて行った。Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt10, Wnt11b の発現は RT-PCR、Wnt5a 発現は、Realtime PCR で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞増殖能、造腫瘍能に関して差は認めなかったが、細胞形態は細胞間接着は loose となり、敷石状に変化した(図3)。浸潤能及び遊走能に関し transwell chamber assay において、著しい増加を認め(図4)、wound healing assay においても遊走能は増大した(図5)。ドキシサイクリン存在下にはこれらは抑制された(図4, 5)。

図3 細胞形態の変化と細胞間接着変化

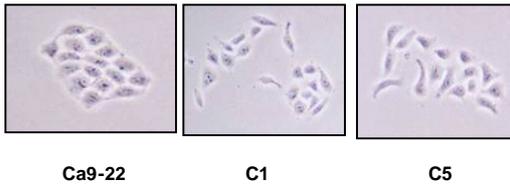


図4 transwell chamber assay

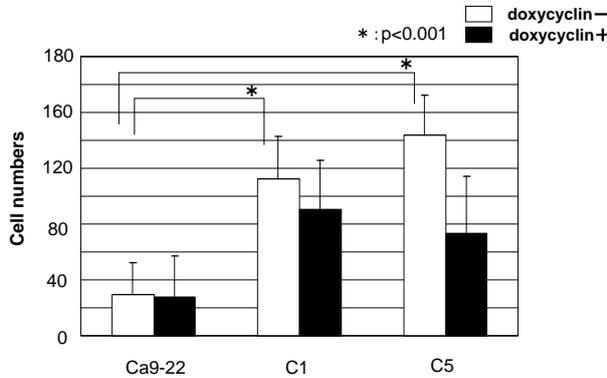
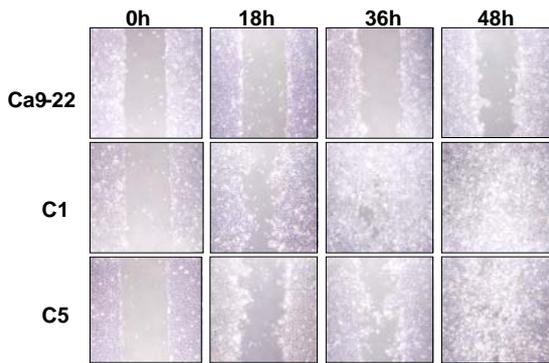


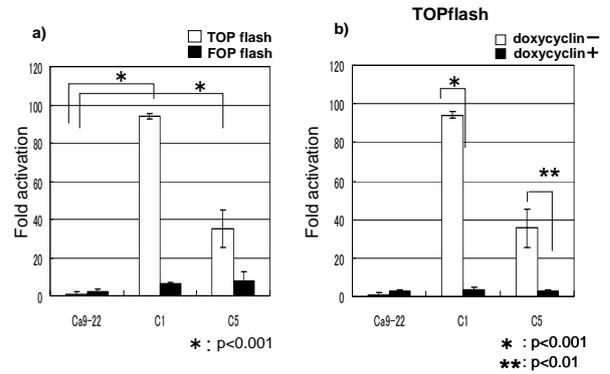
図5 wound healing assay



細胞内集積した beta-catenin が核内において TCF/Lef と結合して標的遺伝子に作用しているのかを検討するため、TCF 結合領域を利用したルシフェラーゼアッセイを行った結果、Top flash において、著しい増加を認め、ドキシサイクリン存在下にはこれらは抑制された(図6)。また dominant negative TCF4 により、同じく抑制された。その結果、

beta-catenin が標的遺伝子を作動していることが明らかとなった。

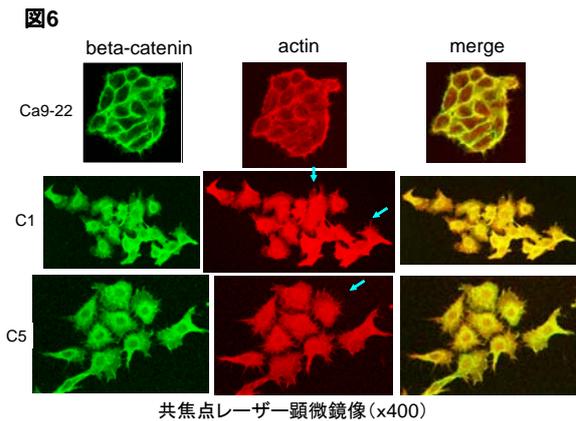
図6 TCF/Lef dependent transcriptional activity



そこで、現在まで報告のある標的遺伝子の発現について RT-PCR にて検討した結果、その中では MMP-7 の発現の増加が見られ、定量 PCR においても確認した。さらに Casein zymography にて検討した結果、MMP-7 の活性は上昇していた。以上より beta-catenin の細胞質、核内集積によって、Wnt signal の canonical 経路が活性化され、浸潤能が上昇することが明らかとなった。

(2) MMP-7 以外の(報告されていない)他の標的遺伝子も関与している可能性が高いと考え、マイクロアレイ解析を実行し、候補遺伝子を絞り込んだが、定量 PCR や蛋白質レベルでは明かな因子を同定には至らなかった。

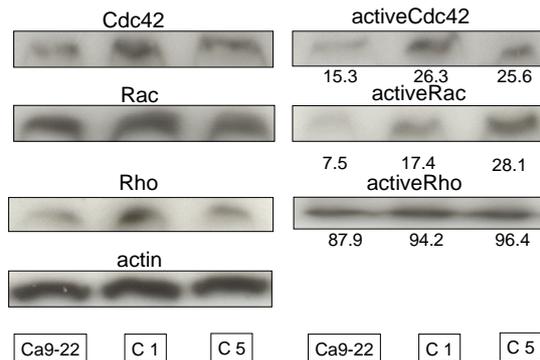
図7 rearrangement of action filament



(3) 細胞蛍光免疫染色と pull down assay において、アクチンフィラメントの再構成と cdc42、Rac の活性上昇がみられた(図7, 8)。transfectants における Tcf/Lef の転写活性は増強し、この transfectants にさらに dominant negative Tcf4 を導入すると、

Tcf/Lef の転写活性は低下し、遊走能も減弱した。さらに低分子量 G 蛋白質の Rho, Rac, Cdc42 全てに対する阻害剤である C. difficile ToxinB を用いて C1, C5 の細胞遊走能に及ぼす影響を transwell chamber assay で検討した。阻害剤を 5 ng/ml の濃度で作用させ、24 時間後に測定したところ、C1, C5 においてメンブレンを通過する細胞数は阻害剤非存在下と比較して低下する傾向がみられた

図 8 activation of Rho family



Wnt の中には PCP 経路や PKC 経路を介して、細胞の浸潤や運動に深く関与するものが知られている。これまでの実験結果から C1, C5 における細胞遊走能の亢進が明らかとなったので、beta-catenin の細胞内集積が細胞の運動を制御する Wnt に影響を及ぼしている可能性について検討した。すなわち、Ca9-22, C1, C5 から RNA を抽出し、それぞれの Wnt 遺伝子に特異的なプライマーを設定して、Wnt の発現につき半定量 RT-PCR を行った。その結果、Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt10, Wnt11b の発現量は細胞間で明らかな差を認めなかった。しかしながら、Wnt5a 発現については、C1, C5 で検出したバンドは大きく、Image J で数値化したところ、Ca9-22 と比較して、C1, C5 は、それぞれ 2.3 倍と 2.2 倍であった。次に、ドキシサイクリンを添加して beta-catenin の細胞内集積を抑制すると、それらの発現量は Ca9-22 レベルか、それ以下にまで低下した。Ca9-22 細胞の培養液に Wnt5a を加えると、Ca9-22 の遊走能は亢進し、Wnt シグナルの阻害剤である s-FRP2 によりその亢進は抑制された。また transfectants に s-FRP2 を作用させた場合にも、遊走能の亢進は抑制された。

beta-catenin の細胞内集積は Rho ファミリーの活性化と細胞骨格の再構成により口腔扁平上皮癌細胞の遊走能を亢進させること、この現象に Wnt/beta-catenin 経路の活性化が関与することが明確となった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 孔知恵 beta-catenin の細胞内集積が口腔扁平上皮癌細胞の生物学的特性に及ぼす影響 大阪大学歯学会雑誌 53 巻 1 号 2008 年 査読無

[学会発表] (計 5 件)

① Atsuko Yonekawa, Soichi Iwai, Chie Kong, Gentaro Fujita, Masakazu Hamada, Mitsuhiro Nakazawa, Yoshiaki Yura The involvement of Wnt-beta-catenin pathway in the migration of oral squamous carcinoma cells 第 31 回日本分子生物学会 神戸 2008 年 12 月 8 日

② 米川敦子、岩井聡一、孔知恵、青田圭子、加藤逸郎、墨哲郎、中澤光博、由良義明 The role of Wnt beta-catenin pathway in the migration of oral squamous cell carcinoma cells 第 67 回日本癌学会 名古屋 2008 年 10 月 28 日

③ Soichi Iwai, Atsuko Yonekawa, Chie Kong, Keiko Aota, Mitsuhiro Nakazawa, Yoshiaki Yura. The involvement of wnt beta-catenin signal pathway in the invasion and migration of oral squamous cell carcinoma cells. EACR (European Association of Cancer Research) Congress Lyon France 2008 年 7 月 7 日

④ 米川敦子、岩井聡一、孔知恵、藤田源太郎、青田桂子、中澤光博、由良義明 口腔扁平上皮癌細胞の遊走能における Wnt シグナルの関与について 第 62 回日本口腔科学会 福岡 2008 年 4 月 18 日

⑤ 孔知恵、岩井聡一、米川敦子、加藤逸郎、中澤光博、由良義明 Effects of the accumulation of cytoplasmic beta-catenin on the migration and invasion in oral squamous cell carcinoma 第 66 回日本癌学会 横浜 2007 年 10 月 4 日

[その他]

上記研究成果は本年 3 月に終了し、現在論文投稿中である。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 聡一 (IWAI SOICHI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：10362675

(2) 研究分担者

由良 義明 (YURA YOSHIAKI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：00136277

青田 桂子 (AOTA KEIKO)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：70437391