

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592205

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌に対する浸潤・転移抑制療法確立のための基礎研究

研究課題名(英文) Establishment of invasion/metastasis inhibition therapy against oral squamous cell carcinomas: a basic study.

研究代表者

河野 憲司 (KAWANO KENJI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：50214664

研究成果の概要(和文)：

口腔扁平上皮癌細胞株MOK205の細胞集塊(MCA)をlaminin 5またはI型collagenをコートしたプレート上に移すと速やかにmonolayer colonyに変化し、さらにlaminin 5上では著しい細胞分散を生じた。この現象はlaminin 5によるインテグリン刺激を介してMOK205の運動能亢進と同時にEカドヘリンによる細胞間接着が解除されるためである。この実験モデルにScr familyの特異的チロシンキナーゼ拮抗剤(PP1)を添加すると、この細胞分散現象は完全に抑制されたことから、インテグリンとカドヘリンの相互作用にSrcが関与することがわかった。さらに蛍光抗体法によりlaminin 5上でのMCAの細胞分散過程におけるチロシンリン酸化Src(Tyr215、Tyr529、Tyr418のリン酸化Src)の局在を検索したところ、Tyr215リン酸化SrcとTyr529リン酸化Srcは細胞分散前に主に核内に局在したが、分散開始時には細胞間接着に局在が変化した。このことからSrcのTyr215とTyr529のリン酸化が細胞分散の惹起に関与することが示唆された。これらの結果からSrcを標的とした浸潤・転移抑制療法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

Multicellular aggregates of MOK205, an oral squamous carcinoma cell line, transformed to monolayer colonies on laminin 5 and type 1 collagen substrates, and then showed cell dispersion only on laminin 5. This phenomenon was triggered by the increased motility and disruption of E-cadherin-mediated intercellular adhesion via the activation of integrin receptor by laminin 5. When PP1, a specific inhibitor of the Src family, was added to the cell scattering model of MOK205, cell dispersion was almost completely blocked, suggesting that Src was involved in the interaction between integrin and cadherin. In addition, fluorescence microscopic observation revealed that phospho-tyrosine 215-Src and phospho-tyrosine 529-Src were localized along the cell membrane of the intercellular adhesion of MOK205 immediately before cells started dispersion on laminin 5. Taken together, these results suggested that Src could be a target of the invasion/metastasis inhibition therapy against oral squamous cell carcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・ 病態科学系歯学・ 歯科放射線学

キーワード： 口腔扁平上皮癌、浸潤、転移、接着分子、アノイキス

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌 (OSCC) において頸部リンパ節転移は重要な予後因子である。われわれは舌扁平上皮癌 140 例を分析し、頸部リンパ節転移が舌癌の独立する予後因子であることを報告した (Kawano, K., 2006) ⁽¹⁾。

OSCC の頸部リンパ節転移が成立するためには、まず癌細胞が癌巣から離脱し、細胞外マトリックス (ECM) の中を移動してリンパ管内へ侵入する。続いて、リンパ管内で浮遊状態となった癌細胞はアノイキス (足場を失った細胞がアポトーシスを生じる現象) を回避して生存し、最終的にリンパ節に定着・増殖し転移巣を形成する。

この前半の過程では、癌細胞の細胞間接着の減弱、細胞運動能の亢進と ECM の分解、リンパ管内皮細胞との接着が必要である。われわれは OSCC 細胞表面の $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン受容体が ECM 蛋白のひとつである laminin 5 と結合すると、OSCC 細胞の細胞運動能が亢進すると同時に、カドヘリンによる細胞間接着が減弱して OSCC 細胞が分散することを示した (Kawano, K., 2001) ⁽²⁾。また臨床症例においても、laminin 5 の高発現症例は有意にリンパ節転移の頻度が高かった (Kawano, K., 2006) ⁽³⁾。

さらにリンパ管内で浮遊状態となった OSCC 細胞はカドヘリンの働きにより細胞集塊を維持することにより浮遊状態でも生存することを示した (Kawano, K., 2005) ⁽⁴⁾。このような所見から、癌細胞が組織内を浸潤する過程ではカドヘリンの働きは抑制され、リンパ管内では逆にカドヘリンの働きを維持することが、転移巣形成に必要と考えられる。

これらのことから、OSCC の浸潤・転移機序を理解するためにはカドヘリン機能の調節機構をインテグリンとカドヘリンの相互作用 (クロストーク) に関連する細胞内シグナルの面から明らかにすることが必要であり、さらにこの径路の操作により浸潤・転移の抑制が期待できるものと考えられる。

(1) Kawano, K. et al. Intratumoral expression of thymidylate synthase is an independent predictor of prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the tongue: results from a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35:258-264, 2006

(2) Kawano, K. et al. Engagement of integrin $\alpha 3 \beta 1$ disrupts of intercellular adhesion. *Exp Cell Res* 262:180-196, 2001

(3) Kawano, K. et al. Predictive value of laminin-5 and membrane type 1-matrix metalloproteinase expression for cervical lymph node metastasis in T1 and T2 squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Head Neck* 28:525-533, 2006

(4) Kawano, K. et al. Roles of N-cadherin in invasion and metastasis of E-cadherin-negative oral squamous carcinoma cell lines. *ORAL ONCOLOGY* vol.10:171-174, 2005

2. 研究の目的

OSCC の浸潤・転移に深く関わりと考えられるインテグリンとカドヘリン間の相互作用 (クロストーク) を司る分子群を明らかにし、この分子群を標的とした新しいがん治療法、すなわち浸潤・転移抑制療法を確立することを目的とした。

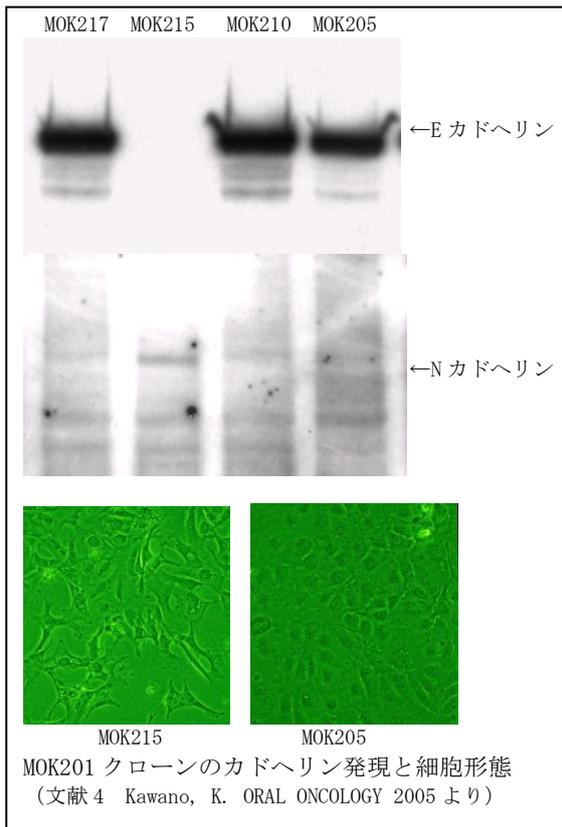
3. 研究の方法

(1) OSCC 細胞株

当科で歯肉扁平上皮癌から樹立した細胞株 MOK201 のクローニングにより得られた細胞株 MOK205、MOK211、MOK214、MOK215 を用いた。MOK205 と MOK214 は E カドヘリンを発現し、敷石状配列を示す定型的な OSCC 細胞株である。一方、MOK211、MOK215 は E カドヘリン発現がなく、代わりに N カドヘリンを発現し、形態的に細長い胞体を有し、細胞間接着が乏しい (写真 1、写真 2 に MOK205 と MOK215 のデータを示す、論文 4 より)。さらにヒト口腔扁平上皮癌 SCC9 (AATC から購入) を用いた。

これらの細胞は 10%胎児ウシ血清 (FBS) 添加 Dulbecco's minimum essential medium (D-MEM) + F-12 medium (1:1) 混合培地 (Gibco BRL, #12400-024) にて継代維持した。

なお本研究では、培地の FBS 濃度を漸次上げてゆき、最終的に insulin-transferrin-selenium (ITS, Gibco BRL 社, #51500-056) 添加 D-MEM/F12 培地に馴化し、すべての実験を無血清下に行った。



(2)抗体

蛍光抗体染色にチロシンリン酸化の部位が異なる Src を認識する抗体を用いた。

- ・抗 Src-pY215 抗体：チロシン 215 のリン酸化を認識ウサギポリクロナール抗体。
- ・抗 Src-pY418 抗体：チロシン 418 のリン酸化を認識ウサギポリクロナール抗体。
- ・抗 Src-pY529 抗体：チロシン 529 のリン酸化を認識ウサギポリクロナール抗体。

いずれも Biosource 社(#44-658、#44-660G、#44-622G) から購入した。

(3)細胞外マトリックスの調整

SCC9 matrix (laminin 5 rich matrix) dish/plate: SCC9 は豊富な laminin 5 を産生し、細胞外に分泌する OSCC 細胞株である。本実験では laminin 5 に富む基質として SCC9 の産生する基質を使った。

まず SCC9 を 92 mmφ 培養皿または 24 穴プレートで confluent になるまで無血清培養し、PBS(-) にて洗浄後、20 mM EDTA、1 mM PMSF、10 μg/ml leupeptin、10 μg/ml soybean trypsin inhibitor 溶液を 92 mmφ 培養皿には 3 ml/dish、24 穴プレートには 300 μl/well だけ入れ、4℃にて一晩静置した。細胞

胞がシート状に剥離してくるので、さらに強くピペッティングすることにより細胞を完全に除去した。さらに 0.1% BSA 液にて 37℃、30 分間処理した後、実験に使用した。

SCC9 CM or I 型 collagen coating dish /plate: SCC9 の 70% confluent 時に新鮮培養液 (D-MEM/F-12 + ITS) に交換し、2 日間培養後、培養液を採取した。この培養液を遠心して細胞片を除去し、5 mM EDTA、1 mM PMSF、10 μg/ml trypsin inhibitor を添加し、SCC9 conditioned medium (SCC9 CM) とした。

SCC9 CM または I 型 collagen (50 μg/ml、Wako、#038-13892) を 92 mmφ 培養皿または 24 穴プレートに加え、37℃で 30 分または 4℃で一晩静置した。さらに 0.1% BSA 液にて 37℃、30 分間処理した後、実験に供した。

(4)細胞集塊 (MCA) の作成

12 mg/ml poly 2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA、Sigma 社、#P-3932) 溶液 (95%エタノールで溶解) 1 ml を 92 mmφ 培養皿に入れて皿底をコートし、37℃にて乾燥させた後、UV 滅菌した。

使用時に poly-HEMA 処理培養皿を PBS(-) で 2 回、培地で 1 回洗浄した後、 3×10^6 個/dish の OSCC 細胞をまき、37℃、5% CO₂ にて培養を行った。癌細胞は培養皿に接着せず、細胞同士が互いに接着して多数の細胞集塊 (multicellular aggregate、MCA) を形成する。

(5)細胞分散モデル

MCA を SCC9 matrix や I 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスをコートした培養皿あるいはプレート上に置くと、MCA は monolayer colony になり、その後細胞間接着が解除され、細胞分散を生じる。この現象はラミニン 5 上で顕著である⁽²⁾。このモデルを用いてインテグリンからカドヘリンへの経路の解析を行った。

(6)Src family のチロシンキナーゼ特異的拮抗剤 PP1 による細胞分散抑制実験

laminin 5 rich matrix または I 型 collagen 上での細胞分散モデルの培養液に 12 μM PP1/DMSO (PP1、Calbiochem 社、#529573) を添加し、Src 機能阻害による分散現象の変化を観察した。対照として基質をコートしない培養皿、また PP1 の代わりに PBS(-)または DMSO を添加した。

なお実験はすべて D/F+ITS を培養液とする無血清下に行った。

(7) 蛍光抗体染色

MOK205 (D-MEM/F-12 + ITS) を poly (HEMA) がコートされた 6cmφ 培養皿に 1×10^6 個まき、15 時間浮遊培養して MCA を作成し、SCC9 CM をコートしたカバーガラスをおいた 24 穴プレートにまず $300 \mu\text{l}$ の D-MEM/F-12 + ITS を入れ、続いて MOK205 MCA を含む培養液を少量 ($\sim 100 \mu\text{l}$) 加えた。MCA は培養開始 2 時間後に Ln5 matrix に付着して細胞分散を始めた。24 時間後に培養液を捨て、0.1mM orthovanadate/PBS(-) で洗浄後、3.7% formaldehyde/PBS(-) で室温 10 分間固定した。以下、蛍光抗体染色をカバーガラス上でお行った。まず 0.5% Triton-X/PBS(-) にて 4°C 2 分間、2% 正常ヤギ血清 (NGS) /PBS(-) で 4°C 30 分間処理後、1 次抗体として各種チロシンリン酸化 Src 抗体 (Src-pY215、Src-pY418、Src-pY529、いずれも 2%NGS/PBS(-) で 200 倍希釈) で 4°C 一晩反応した。次に PBS(-) で細胞を洗浄後、ウサギ IgG-FITC (300 倍希釈) にて室温 30 分間反応後、再び PBS(-) で洗浄し、カバーガラスをスライドガラスに置き、封入して confocal 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 社、LSM510PASCAL) で観察した。

さらに 1 次抗体を Akt1/2 (Santa Cruz 社、H-136、100 倍希釈)、Erk1/2 (Promega、V114A、400 倍希釈) に変えて同様の染色を行った。

4. 研究成果

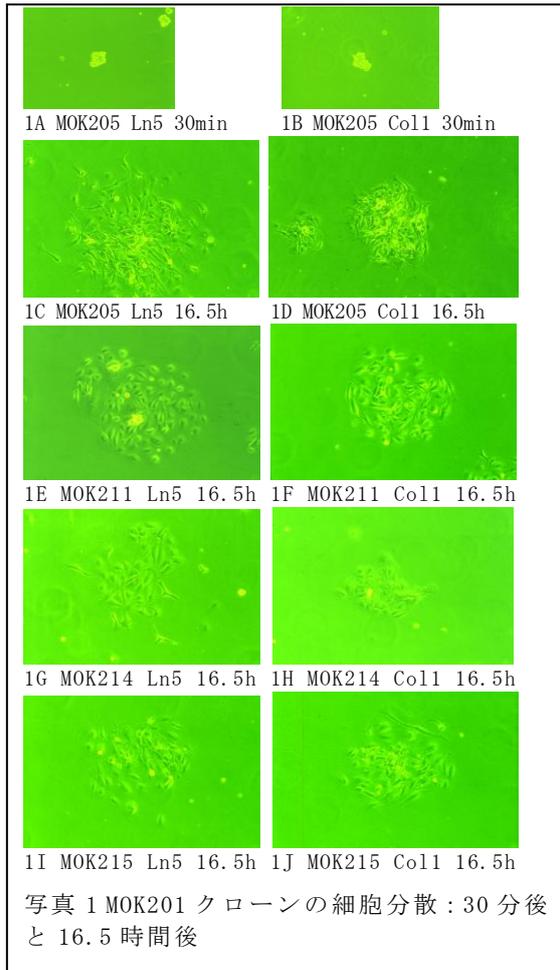
(1) MOK201 由来クローンの細胞分散能

細胞分散モデルを用いて MOK205、MOK211、MOK214、MOK215 の laminin 5 rich matrix および I 型 collagen 上での細胞分散を観察したところ、MOK205 と MOK214 の MCA は laminin 5 rich matrix 上で著しい細胞分散を示したが、I 型 collagen 上では MCA から monolayer colony への変化はあるものの、コンパクトなコロニーのまま細胞分散は乏しかった (写真 1A~1D、1G、1H)。

一方、MOK211 と MOK215 の MCA は laminin 5 rich matrix と I 型 collagen いずれにおいても軽度の細胞分散を示し、両者間で差異がなかった (写真 1E、1F、1I、1J)。この 2 つの細胞株は E カドヘリンの代わりに N カドヘリンを発現しており、インテグリン受容体からカドヘリンへのシグナル伝達が E カドヘリンを発現する MOK205、MOK214 とは異なるものと推測される。

4 種類の細胞クローンのうち MOK205 が laminin 5 rich matrix 上での細胞分散が最も著しかった。以下 MOK205 を用いて、細胞

分散現象の解析を進めた。



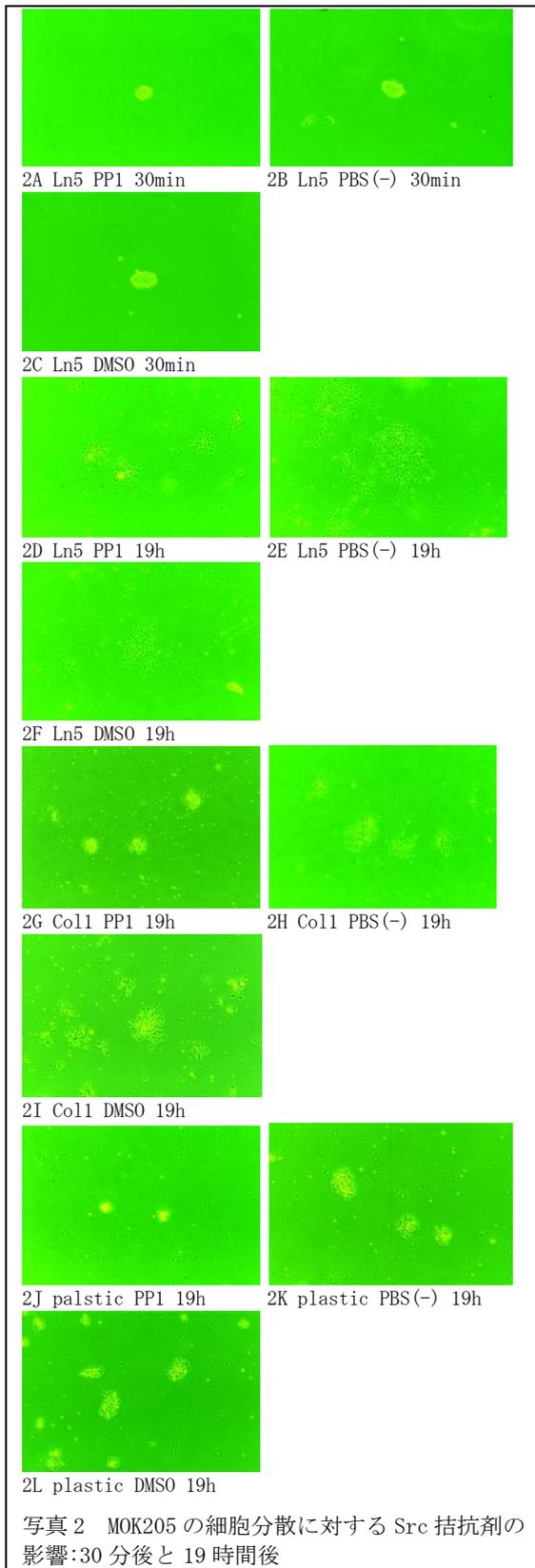
(2) MOK205 の細胞分散における Src の関与

laminin 5 rich matrix、I 型 collagen、基質コートなし (以下、plastic) のいずれにおいても実験開始 30 分後には MCA の細胞皿との付着を認めた。また MCA の接着は PP1、DMSO の添加により阻害されなかった (写真 2A~2C)。

培養開始 19 時間後には laminin 5 rich matrix 上で著しい細胞分散が観察された (写真 2E)。I 型 collagen 上では MCA は monolayer colony に変わったが細胞分散は軽度であった (写真 2H)。また plastic では完全に monolayer colony にならず、一部に細胞集塊の残存が見られた (写真 2K)。これらの現象は DMSO の添加により明らかな影響がなかった (写真 2F、2I、2L)。

しかし PP1 を添加した場合、いずれの基質においても細胞分散が抑制され、laminin 5 rich matrix 上では MCA は monolayer colony に変わるものの細胞の分散はほとんど見られなかった (写真 2D)。また I 型 collagen と plastic では MCA から monolayer colony への

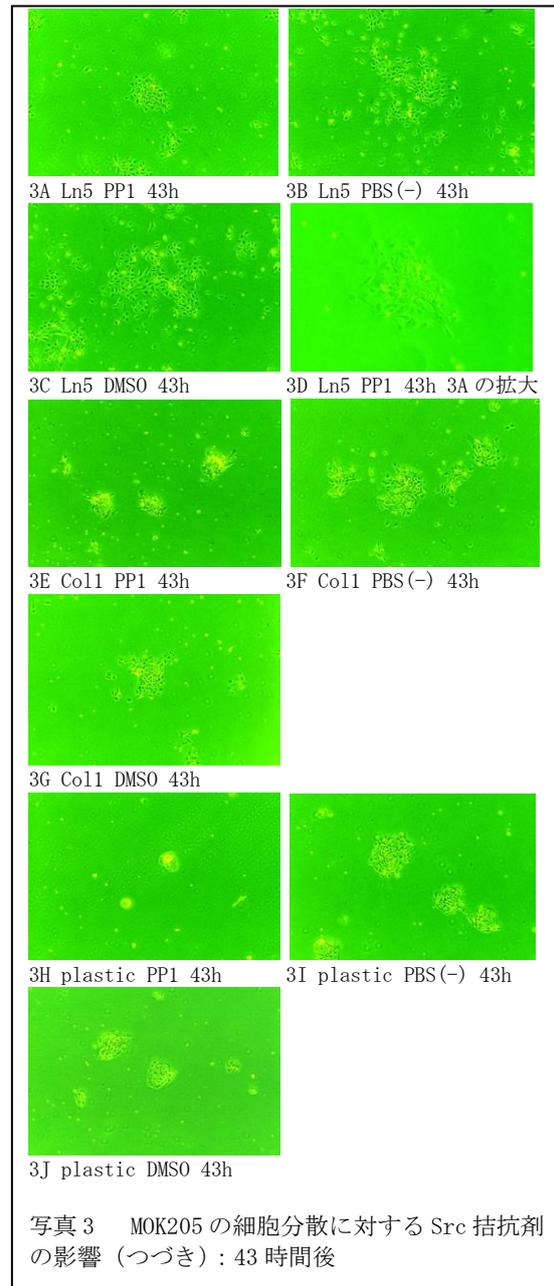
変化は完全でなく、一部に細胞集塊が残っていた (写真 2D、2G)。



さらに 43 時間まで培養時間を延長して観

察した、PP1 添加例ではいずれの基質においても細胞分散はほとんど観察されなかった。とくに plastic では MCA の monolayer colony への変化は生じなかった。

以上の結果から、Src 機能の抑制により MCA の基質との接着は阻害されないものの、MCA から monolayer colony へのリモデリングおよび細胞分散が阻害されることがわかった。



(3) チロシンリン酸化 Src の細胞内分布

MOK205 の laminin 5 rich matrix 上での分散過程において、Src-pY529 は核内と細胞間接着部の細胞膜に局在が見られた。とくに分散初期の細胞接着の緊密な部分に強く発現

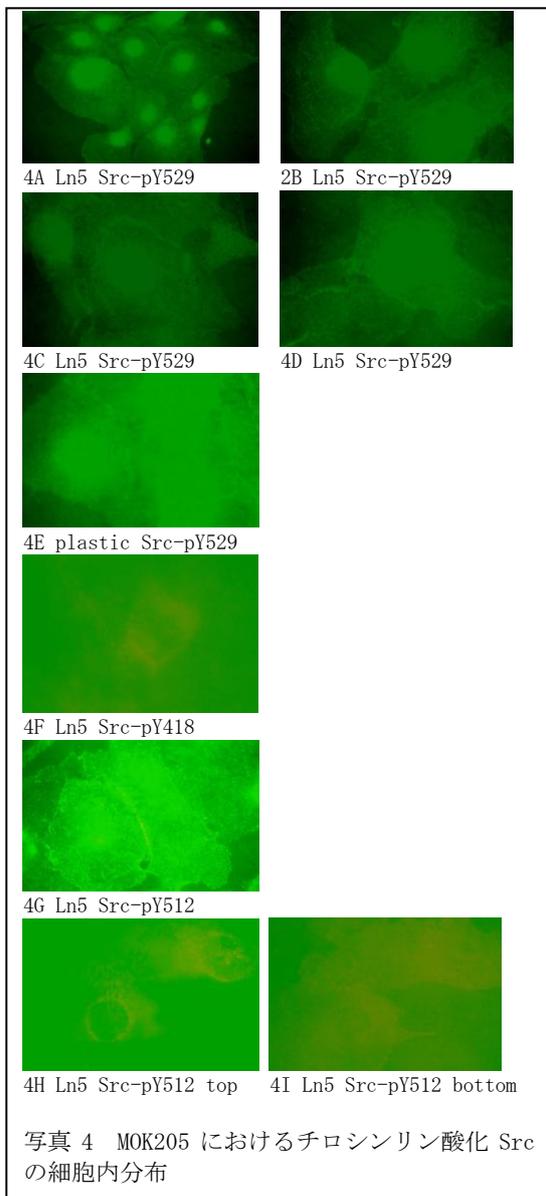
が見られた (写真 4A~4D)。一方、細胞分散が惹起されない基質コートなしの条件では細胞接着部の発現は弱かった (写真 4E)。

Src-pY418 はごく弱い細胞間接着部の発現を見るのみであった (写真 4F)。

Src-pY215 は Src-pY529 に類似した、局在をしめしたが、Src-pY529 に比べると発現が弱かった (写真 4G)。

また MCA から monolayer colony への変化が不完全で十分に扁平になっていない細胞をスライスして観察すると、細胞の上方では核膜に一致した Src-pY215 の局在が見られたのに対して (写真 4H)、細胞の下面 (培養皿との接着面近く) では細胞質にび慢性に分布していた (写真 4I)。

以上の所見から Src-pY215 と Src-pY529 がインテグリンの活性化を受け、Eカドヘリンによる細胞間接着解除に関わることが示唆された。



なお Akt1/2 と Erk1/2 について同様の方法で局在を検索したが、細胞質にび慢性の弱い反応を認めるのみで、細胞分散とのかかわりを示唆する特徴的所見は捉えられなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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) 研究代表者 河野 憲司 (KAWANO KENJI)
大分大学・医学部・教授

研究者番号 : 50214664