

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592554

研究課題名（和文）口腔癌の浸潤・転移における上皮・間葉移行と細胞運動制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of cell motility system with EMT in tumor invasion and metastasis of oral cancer

研究代表者

島末 洋（SHIMASUE HIROSHI）

広島大学・病院・助教

研究者番号：40335683

研究成果の概要（和文）：転写因子 Snail は上皮細胞間接着因子 E-カドヘリンの発現を抑制して上皮間葉移行（EMT）を誘導することが知られており、口腔扁平上皮癌細胞株に Snail を強制発現させることで EMT に伴う高度浸潤能が獲得されることを見出した。その Snail が発現調節する標的遺伝子の中で、液性因子 Cyr61 に着目し、その役割について解析した。口腔扁平上皮癌細胞株に Cyr61 を強制発現させた細胞、または口腔扁平上皮癌細胞株に組み換え Cyr61 処理すると細胞運動能が亢進し、その機構は Rho を介したものであった。この結果は局所浸潤の成立において EMT 型癌細胞と non-EMT 型癌細胞間における Cyr61 のオートクラインおよびパラクライン作用の重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Snail, a transcription factor and EMT inducer, enable squamous cell carcinoma (SCC) cells to acquire high-invasiveness. Cyr61 is a humoral factor which known to be a angiogenesis factor and a target of which its transcription increases by Snail. Forced expression of Cyr61 in SCC cells directed their high-invasiveness and stimulation of recombinant Cyr61 gained their motility through activation of Rho. These data indicates that both of autocrine and paracrine Cyr61 offers crucial roles for the establishment of local invasion of SCC.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、上皮間葉移行、癌の浸潤・転移、細胞運動能制御、Rho

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 Snail は上皮細胞間接着因子 E-カドヘリンの発現を抑制して上皮間葉移行（EMT）を誘導することが知られており、口腔扁平上皮癌細胞株に Snail を強制発現させ

ることで EMT に伴う高度浸潤能が獲得されることを見出した。そこでマイクロアレイ法を用いて Snail が発現を調節する標的分子群を抽出したところ、E-カドヘリンの発現低下以外にも複数の因子の発現変動が明らかとな

り、その中で癌細胞の浸潤能獲得機構において重要である細胞運動制御にかかわる Cyr61 について解析をおこなった。

## 2. 研究の目的

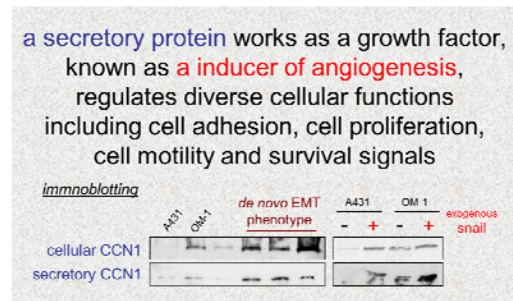
EMT の定義は上皮細胞が間葉細胞に変化する過程である。これは細胞が自由に細胞運動できる能力を得たともいえる。Cyr61 は癌細胞に遊走能を与えることができる液性因子の一つである。もちろん EMT 型癌細胞が自ら産生した Cyr61 がオートクラインに作用して浸潤能を亢進させることが考えられる。さらに SCC では現在、非 EMT 型癌細胞と EMT 型癌細胞が混在して局所浸潤が成立していると考えられている。そこで口腔癌の局所浸潤のメカニズムにおける Cyr61 の意義を明確にすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株に Cyr61 を人工的に発現させるプラスミドベクターを作成して、Cyr61 を安定発現させた細胞株を樹立し、癌細胞における Cyr61 の機能解析をおこなった。またリコンビナント Cyr61 やそれら細胞株が産生する Cyr61 で SCC 細胞株を刺激し、浸潤能など細胞生物学的解析をおこなった。

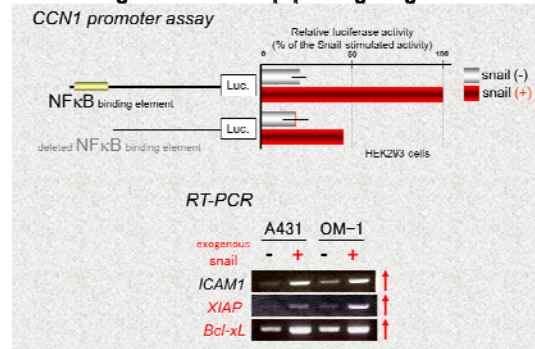
## 4. 研究成果

### CCN1 (Cyr61, Cystein rich 61)



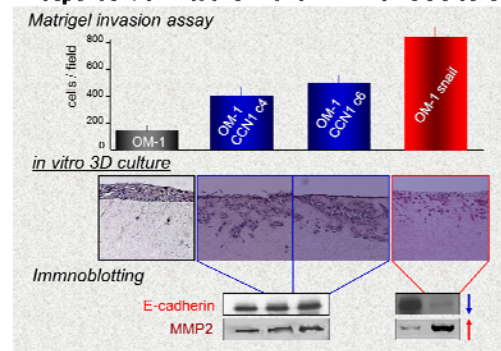
Cyr61 は成長因子として知られており、血管新生誘導という機能をもつだけでなく、細胞運動能や増殖にも関わっていることが報告されてきた。高い増殖能と浸潤能を持つ EMT 型癌細胞も、RT-PCR やウェスタンブロットの結果から Snail が Cyr61 の発現を亢進させて、それら高度悪性度獲得において Cyr61 を利用していることが示唆される。

### CCN1 transcription emerges by snail through NF- $\kappa$ B activation resulting in recruit of anti-apoptotic signaling cascades

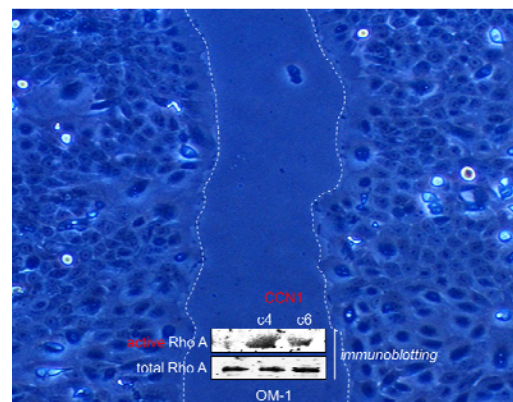


プロモーターアッセイで Snail は NF- $\kappa$ B を介して Cyr61 の発現を亢進させていることが確認できた。と同時に、NF- $\kappa$ B を介してアポトーシス抵抗に関わる分子群の発現を上昇させ、EMT 型癌細胞のアポトーシス抵抗能の獲得にも関わっていることが示唆された。

### Ectopic CCN1 confers high-invasive activity independent of E-cadherin and MMP2 on SCC cells

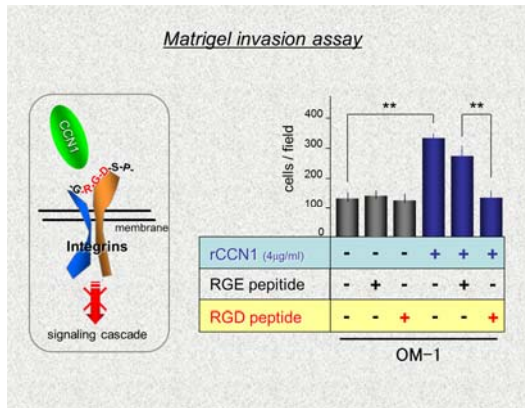


Cyr61 を人工的に安定発現させた癌細胞株の浸潤能は明らかに亢進した。その特徴としては EMT 型癌細胞とは様子が異なり、E-カドヘリンと MMP2 の発現に変化はなかった。

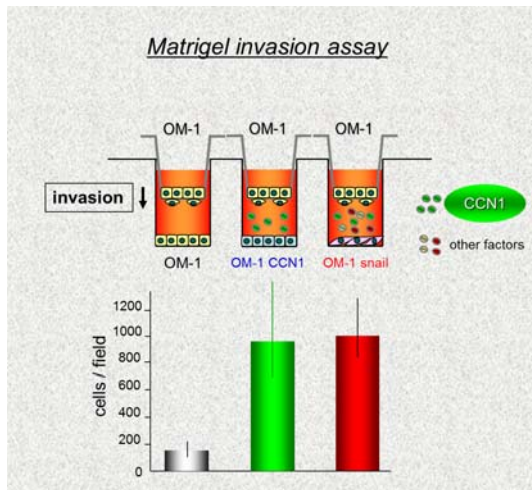


またウンドヒーリングアッセイで、これら癌細胞の遊走は細胞間接着をタイトに保持しながら、遊走先端部の細胞は細胞質を伸張さ

せていた。これには Rho の活性が関与していることが確認できた。

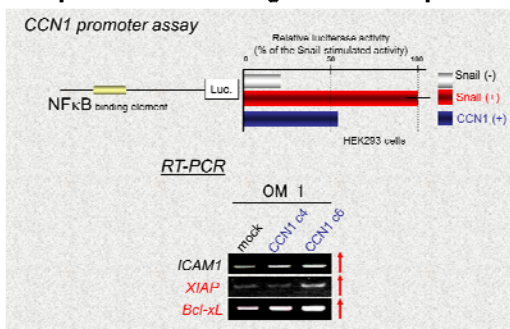


リコンビナント Cyr61 を SCC 細胞株に作用させるとそれら細胞の浸潤能が亢進した。その作用はインテグリンの汎インヒビターである RGD ペプチドで阻害された。



さらに Cyr61 安定発現細胞、ならびに EMT 型癌細胞の培養液を SCC 細胞株に作用させると、それら SCC 細胞株の浸潤能が亢進し、これは EMT 型癌細胞が産生する Cyr61 の作用は、SCC 細胞へのパラクライン効果があることが確認できた。

#### Ectopic CCN1 evokes endogenous CCN1 expression



興味深いことに、Cyr61 で刺激した癌細胞は、NFκB を介して Cyr61 の発現を上昇させることを見出した。もちろんアポトーシス抵抗性に関わる分子群の発現も上昇させた。

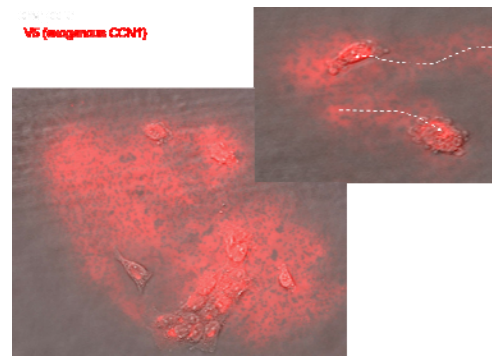
#### matricellular protein(マトリックス細胞タンパク)

細胞外器質 (ECM) は細胞に安定的足場を提供する

しかし可溶性分子であるマトリックス細胞タンパクは、この ECM と細胞との安定的結合を阻害し、細胞を動的状態に変換する

- e.g.,
- CCN family
- OPN (osteopontin)
- SPARK (osteonectin)

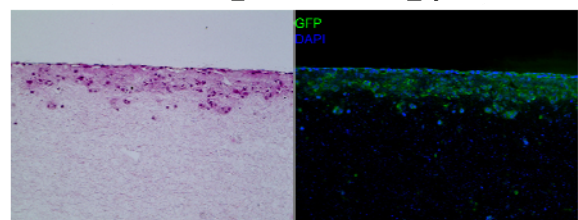
一方で、Cyr61 はマトリックス細胞タンパクとして理解されている。



Cyr61 の抗体で細胞を染色すると、細胞周囲のディッシュには Cyr61 が染色され、運動の足場となっている。

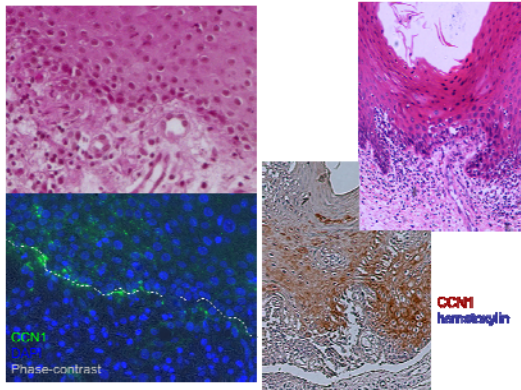
#### Forced CCN1-expressing OM-1 cells lead OM-1 cells to invade into the collagen gel

90% OM-1\_GFP + 10% OM-1\_Cyr61

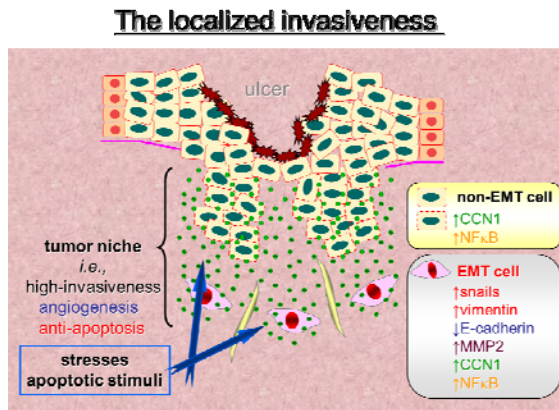


つまり、EMT 型癌細胞が産生する Cyr61 が、その他多くの非 EMT 型癌細胞の集団的浸潤のキーになっていることが想定できる。そこで三次元培養法において、本来コラーゲン層に浸潤することがほとんどできない SCC 細胞株に Cyr61 安定発現細胞を 10% の割合で混ぜて

やると、コラーゲン層に浸潤していく SCC 細胞が見られた。



そういった像は、実際の SCC の臨床検体でも見られ、Cyr61 で染色すると、間質側から癌細胞集の中心部に向かって Cyr61 がグラデーションに染色される像が認められた。



以上の結果をまとめると、上図のごとくひとつの SCC の浸潤モデルが想定できた。局所浸潤をリードする EMT 型癌細胞が産生する Cyr61 はマトリックス細胞タンパクとして周囲に浸潤の足場を形成し、非 EMT 型癌細胞の集団はこれに刺激されて浸潤を開始し、さらに非 EMT 型癌細胞は自ら Cyr61 を産生するようになって癌細胞集団＝癌胞巣そのものに遊走能が与えられ、局所浸潤が成立することが考えられた。

#### 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 4 件)

1. PGE(2) targets squamous cell carcinoma cell with the activated epidermal growth factor receptor family for survival against 5-fluorouracil through NR4A2 induction. Shigeishi H, Higashikawa K, Hatano H,

Okui G, Tanaka F, Tran TT, Rizqiawan A, Ono S, Tobiume K, Kamata N. Cancer Lett. 307 (2): 227-36. 2011. (査読有り)

2. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K. Lymphangiogenesis and metastasis: Role of tumor-induced lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease. Am J Pathol., 175(5):2235-48, 2009. (査読有り)

3. Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, Higashikawa K, Kamata N: Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. Int J Oncol., 34(6):1565-1571, 2009. (査読有り)

4. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, Shigeishi H, Ono S, Kamata N: DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. Int J Cancer., 124(12):2837-2844, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. 東川晃一郎: 口腔癌の浸潤能診断 (シンポジウム「癌細胞の浸潤・転移」 第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 シンポジウム 2 「口腔癌治療における遺伝子診断の役割」 2011 年 4 月 21 日, 東京都)

2. 鎌田伸之, 東川晃一郎 (講演者), 飛梅圭: Snail による転写調節と EMT の誘導 (シンポジウム「Epithelial Mesenchymal Transition と腫瘍の転移・浸潤」) 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 3 日, 横浜市

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

島末 洋 (SHIMASUE HIROSHI)

広島大学・病院・助教

研究者番号: 40335683

(2) 研究分担者

鎌田 伸之 (KAMATA NOBUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70242211

東川 晃一郎 (HIGASHIKAWA KOICHIRO)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：80363084

(3)連携研究者

重石 英生 (SHIGEISHI HIDEO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90397943