

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792358

研究課題名(和文) Np63を介した上皮-間葉転換による口腔扁平上皮癌の発生、浸潤、転移機構の解明

研究課題名(英文) A study on epithelial-mesenchymal transition mediated by deltaNp63 in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

川野 真太郎 (Kawano, Shintaro)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：00398067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、OSCCの浸潤・転移における Np63を介したEMTの関与について検討を行った。切除標本の浸潤先端部では Np63の発現が減弱している癌細胞を認め、これらはvimentinを発現していた。OSCC細胞株では、Np63は多くの細胞株で発現していたが、高転移株のSQUU-Bでは発現を認めず、vimentinの発現を認めた。また、Np63 siRNA導入細胞において、線維芽細胞様の形態変化、上皮系マーカーの発現量減少、間葉系マーカーの発現量増加、胞遊走能の充進を認めた。これらの結果より、Np63の発現減弱がEMTを誘導し、浸潤・転移に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of deltaNp63 in EMT during progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC). The expressions of deltaNp63 and epithelial markers was detected in the OSCC cells, but not in SQUU-B cells (high metastatic potential). Mesenchymal markers were strongly expressed in the SQUU-B cells. Knockdown of endogenous deltaNp63 in HSC-2 cells induced morphological changes to the spindle shape, decreased the expression of epithelial markers, increased the expression of mesenchymal markers, increased migration. By contrast, SQUU-B cells overexpressing deltaNp63 showed changed their morphology from stromal cell-like to epithelial cells. Immunohistochemical staining revealed decreased intensity of deltaNp63 was positively associated with metastases and poor prognosis in the OSCC patients. These results indicated that deltaNp63 downregulation in cancer cells induces a mesenchymal phenotype that is related to tumor progression of OSCC.

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：上皮間葉転換 口腔扁平上皮癌 deltaNp63 浸潤 転移

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は多くの場合均一な組織ではなく、様々な分化段階や増殖能力を持った不均一な細胞集団により構成されている。この腫瘍組織の不均一さを生じさせる理論として、近年では癌幹細胞(Cancer stem cell: CSC)仮説が提唱されている。これは、全ての腫瘍細胞は少数のCSCに由来しており、CSCが正常細胞における分化をある程度模倣することによって多様な腫瘍組織が構築されているとするものである。固形癌におけるCSCの由来については統一した見解がないのが現状であるが、正常組織内の幹細胞や前駆細胞から形質転換するという説が有力である。しかしながら、最近では、かなり分化の進んだ細胞が上皮としての性質を喪失し、間葉系細胞のような生物学的挙動を示す、いわゆる上皮-間葉転換(EMT)により幹細胞様の形質を獲得するという考え方が提唱され始めている。

従来、EMTは個体発生の様々な局面で必須の現象の一つであるが、EMTを起こしている細胞とCSCでは発現している遺伝子プロファイルが極めて類似していること、実験的にEMTを起こした細胞は癌化しやすいことが報告されている。さらに、乳癌や卵巣癌ではEMTを獲得した癌細胞は高度の浸潤・転移能を有するとの報告もあることから、EMTを制御する分子機構を明らかにすることは、癌の発生のみならず浸潤、転移のメカニズムの解明に大いに貢献しうるものと推察される。

では、EMTはどのような遺伝子によって制御されているのであろうか。申請者は、p53ファミリーの一つである転写因子

Np63に着目し、口腔扁平上皮癌におけるNp63の発現および機能について研究を行ってきた(平成20~22年度:若手研究B, 課題番号20791531)。それにより以下のような研究結果を得た。

口腔扁平上皮癌の前癌病変である口腔白板症において、上皮性異形成の程度が重度になるにつれて、Np63陽性の上皮細胞が増加していた。

口腔扁平上皮癌細胞株では、Np63は上皮系マーカーであるcytokeratin 5, 14と同様に多くの細胞株で発現していたものの、高転移株であるSQUU-B細胞ではこれらの発現は認められず、間葉系細胞のマーカーであるvimentinを強発現していた。

口腔扁平上皮癌の浸潤先端部では、Np63の発現減弱を認めた。

さらに、最近の知見によると、Np63は上皮細胞の極性を決定することが示唆されて

いる。これらのことから、Np63は口腔扁平上皮癌の発生に関与し、浸潤先端部においてその発現が消失した癌細胞は上皮としての細胞極性を失うことで上皮構造が維持されず、その結果EMTが誘導される可能性が推察された。

2. 研究の目的

先に述べたような学術的背景に基づき、Np63の発現が癌細胞におけるEMTの誘導に何らかの関与をしていることが推察されるが、詳細なメカニズムについては不明である。本研究では、Np63を介したEMTによる口腔扁平上皮癌の発生、浸潤・転移の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 口腔扁平上皮癌細胞における Np63 の発現および機能解析

口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2, HSC-3, SQUU-A, SQUU-B, SAS)およびヒト胎児由来腎細胞(HEK293)を用いてNp63, 上皮系マーカーであるE-cadherin, cytokeratin (CK) 5, およびCK 14, 間葉系マーカーであるvimentinおよびN-cadherinの発現をRT-PCR法, Western blotting法, および免疫細胞化学的染色法を用いて検討した。

次に、口腔扁平上皮癌細胞の増殖、分化、および遊走におけるNp63の機能について検討した。まず、Np63を高発現していたHSC-2にsiRNAを遺伝子導入しNp63をノックダウンした。さらに、Np63の発現を認めなかったSQUU-B細胞にNp63発現ベクターを導入後、限界希釈法によるクローニングを行い、Np63を過剰発現する細胞株(SQUU-B0)を樹立し、同様の機能解析を行った。

2) 口腔扁平上皮癌生検組織における Np63, vimentin, および E-cadherin の発現と臨床病理組織学的所見との関連

口腔扁平上皮癌生検材料におけるNp63, E-cadherin, およびvimentinの発現を免疫組織化学的に検索し、臨床病理組織学的所見との関連について検討を行った。

4. 研究成果

1) 口腔扁平上皮癌細胞における Np63 の発現および機能解析

a. 口腔扁平上皮癌細胞における Np63 および上皮系ならびに間葉系マーカーの発現

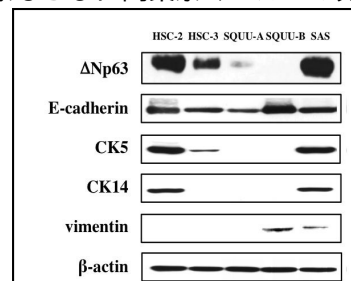


図 1

高転移株である SQUU-B 細胞は Np63 や多くの上皮系マーカーの発現を認めず、間葉系マーカーである vimentin を発現していた(図 1)。

b. Np63 ノックダウンが口腔扁平上皮癌の細胞特性に与える影響

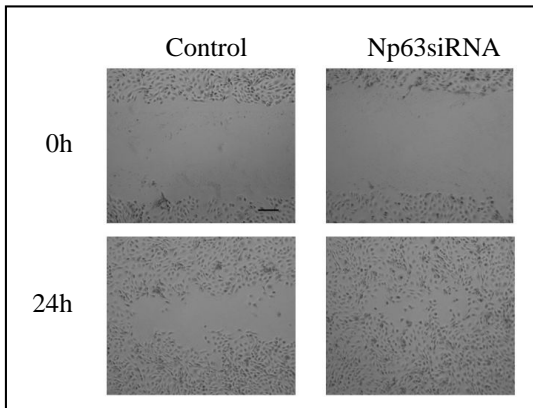


図 2 Np63 ノックダウンによる細胞遊走能の比較

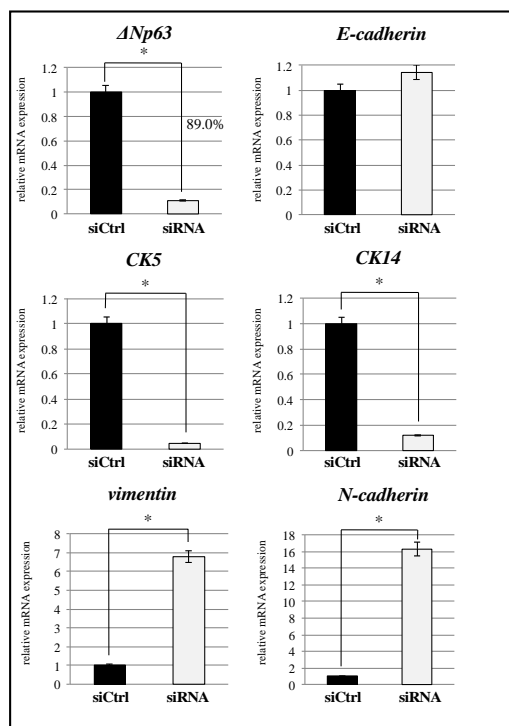


図 3 Np63 ノックダウンが分化マーカーの発現に与える影響

Np63 を高発現していた HSC-2 細胞に Np63siRNA を遺伝子導入することにより、線維芽細胞様の形態変化、上皮系マーカーの発現量低下、間葉系マーカーの発現量上昇、細胞遊走能ならびに浸潤能の亢進を認めた(図 2, 3)。

c. Np63 ノックダウンが口腔扁平上皮癌の細胞特性に与える影響

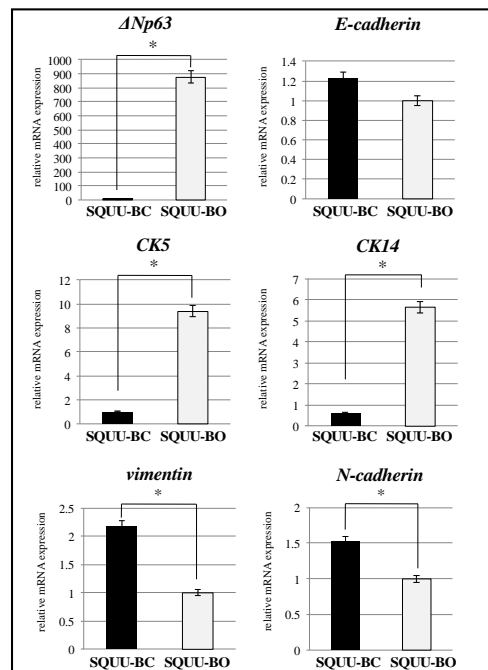


図 4 Np63 を過剰発現

SQUU-B の細胞形態は紡錘形であったのに対し、Np63 を過剰発現した SQUU-BO は多角形で敷石状に増殖しており、細胞増殖活性の亢進、細胞遊走能の低下、CK 5 および CK 14 の発現量増加、vimentin および N-cadherin の発現量減少を認めた。

2) 口腔扁平上皮癌生検組織における Np63、vimentin、および E-cadherin の発現と臨床病理組織学的所見との関連

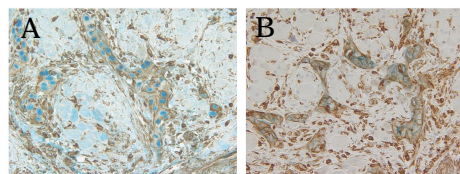


図 5 腫瘍浸潤先端部における Np63, E-cadherin, vimentin の発現  
A: Np63(blue), vimentin (brown), B: E-cadherin (blue), vimentin (brown)

OSCC 生検材料における Np63、E-cadherin、および vimentin の発現を免疫組織化学的に検索した。OSCC において Np63 および E-cadherin は癌細胞のほぼ全てに発現を認めたが、浸潤先端部では Np63 および E-cadherin の発現が减弱している癌細胞を認め、これらは vimentin の発現が亢進していた。次に、浸潤先端部の癌細胞における vimentin 陽性率を算出し、臨床病理組織学的所見との関連について検討した。その結果、vimentin 陰性群(5%>)に比べ陽性群(5%≤)において、頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。また、浸潤先端部の癌細胞における Np63 発現减弱の有無についても同様に検討を行ったところ、Np63 発現减弱を有する群においてこれらの

発生頻度が有意に高かった。さらに、疾患特異的累積5年生存率において、vimentin陽性群および Np63 の発現減弱を有する群は vimentin 陰性群および Np63 の発現減弱を認めない群と比較して有意に低く、予後不良であった。

本研究により、OSCC 細胞において Np63 の発現減弱が EMT を誘導し、間葉系細胞様の形質発現に関与していることが示された。また生検材料においても、浸潤先端部で Np63 および E-cadherin の発現が減弱し、vimentin の発現が亢進している癌細胞を認め、EMT が誘導されている可能性が示された。さらに、浸潤先端部の癌細胞における vimentin 陽性率および Np63 の発現減弱の有無は、頸部リンパ節転移や遠隔転移と強い関連を示した。以上より、Np63 を介した EMT は OSCC の浸潤・転移に関与することが示唆された。しかしながら、本研究では、EMT の重要な現象の1つである細胞間接着因子 E-cadherin の発現減弱が、*in vivo*において認められたものの、*in vitro*では認められなかった。これは、Np63 と異なる因子が E-cadherin の発現制御に関与していることを示している。今後、同因子の特定と EMT との関連について研究を重ね、癌の浸潤・転移における分子機構のさらなる解明を進める必要がある。

## 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2件)

1. Y. Goto, S. Kawano, R. Matsubara, T. Kiyosue, M. Hirano, T. Jinno, Y. Maruse, T. Toyoshima, R. Kitamura, H. Tanaka, K. Oobu, S. Nakamura. Possible involvement of  $\Delta$ Np63 downregulation in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype. *Clinical & Experimental Metastasis* 214: 289-306, 2014.
2. R. Matsubara, S. Kawano, T. Kiyosue, Y. Goto, M. Hirano, T. Toyoshima, R. Kitamura, K. Oobu, and S. Nakamura. Increased  $\Delta$ Np63 expression is predictive of malignant transformation in oral epithelial dysplasia and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 39: 1391-1399, 2011.

[学会発表](計5件)

1. 神野 哲平, 川野 真太郎, 松原 良太, 清末 崇裕, 後藤 雄一, 平野 充広, 田中 秀明, 丸瀬 靖之, 森山 雅文, 豊嶋 健史, 中村 誠司. 口腔扁平上皮癌における IL-6 の発現と臨床病理学的所見との関連. 第 37 回日本頭頸部癌学会, 2013.6.13.
2. 平野 充広, 川野 真太郎, 松原 良太, 清末 崇裕, 後藤 雄一, 神野 哲平, 丸瀬 靖之, 豊嶋 健史, 北村 亮二, 田中 秀明, 大部 一成, 中村 誠司. 口腔扁平上皮癌高転移株より分離した上皮-間葉転換細胞の特性. 第 17 回九州地区口腔癌研究会学術講演会, 2013.6.07.
3. 神野 哲平, 川野 真太郎, 平野 充広, 松原 良太, 清末 崇裕, 後藤 雄一, 丸瀬 靖之, 今藤 彰子, 豊嶋 健史, 田中 秀明, 大部 一成, 中村 誠司. 口腔扁平上皮癌における interleukin-6 発現と臨床病理学的所見との関連. 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会, 2013.01.24.
4. 後藤 雄一, 川野 真太郎, 松原 良太, 清末 崇裕, 平野 充広, 神野 哲平, 豊嶋 健史, 北村 亮二, 大部 一成, 中村 誠司. 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における Np63 を介した上皮-間葉転換の関与. 第 56 回日本口腔外科学会総会, 2011.10.21.
5. 後藤 雄一, 川野 真太郎, 松原 良太, 清末 崇裕, 平野 充広, 豊嶋 健史, 北村 亮二, 大部 一成, 中村 誠司. 口腔扁平上皮癌における浸潤・転移の分子機構の解明- Np63 の発現と上皮-間葉転換との関連について-. 第 65 回日本口腔科学会学術集会, 2011.4.21.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.omfs1.dent.kyushu-u.ac.jp>

6．研究組織

(1)研究代表者

川野 真太郎 (KAWANO SHINTARO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：00398067

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：