

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592988

研究課題名(和文) 口腔癌の浸潤における細胞間相互作用の解明

研究課題名(英文) Analysis of the tumor cell-cell interaction in oral cancer invasion

研究代表者

島末 洋 (SHIMASUE, HIROSHI)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：40335683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の浸潤巣の多くは病理組織学的に癌胞巣を形成する像を示す。大小の癌胞巣はこれらを構成している癌細胞同士が細胞間接着を保持しながら間質へ浸潤している。本研究は癌胞巣が塊として浸潤するメカニズムを細胞間接着分子ではなく「癌細胞間で作用する液性因子」が癌細胞に与える影響の観点から解析をおこなった。non-EMT型癌細胞とEMT型癌細胞の相互作用が存在し、その相互作用の担い手として液性因子CCN1およびGal-1が大きな役割を演じていることが明らかとなった。この結果は、癌組織の進展の理解において重要であると同時に、癌の進展阻止に大いに役立てることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Oral cancer tissues generally show the invasion mass histopathologically. Various sized the invasion mass consists of cancer cells which maintains cell-cell adhesion and progresses their growth into the submucosa. In this study, we investigated the mechanism that invasion mass forms with EMT-dependent invasion system and non-EMT dependent EMT system via humoral factor. Humoral factors, CCN1(Cyr61) and galectin-1 which we newly found contributed the interaction between EMT phenotype tumor cells and non-EMT phenotype tumor cells for the forming tumor invasion mass. This mechanism gives a new insight for the understanding of the local invasion of tumor and could come in useful for the blockage of tumor progression.

研究分野：癌の分子生物学

キーワード：癌の浸潤 EMT 扁平上皮癌 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の浸潤巣の多くは病理組織学的に癌胞巣を形成する像を示す。大小の癌胞巣はこれらを構成している癌細胞同士が細胞間接着を保持しながら間質へ浸潤していると考えられる。しかし上皮内癌や癌胞巣を構成している上皮(構造)形質を保持した癌細胞にどの程度の細胞運動能を持つのかは明らかではない。本研究は癌胞巣が「塊(tumor mass)」として浸潤するメカニズムを細胞間接着分子ではなく「癌細胞間で作用する液性因子(成長因子やケモカインなど)」が癌細胞に与える影響の観点から解析をおこなう。

2. 研究の目的

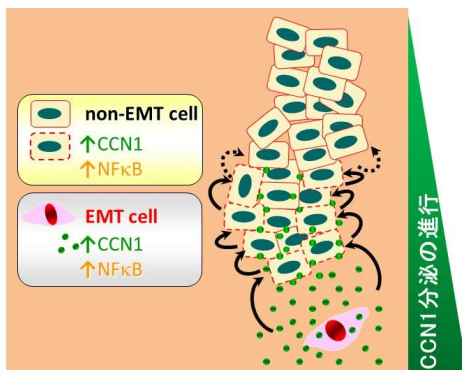


図1 腫瘍巣内におけるCCN1の癌細胞間伝動による癌細胞の運動能獲得モデル

図1は、癌組織の局所浸潤をリードする少数の上皮間葉移行(EMT)の表現型口腔扁平上皮癌細胞で高発現する液性因子 CCN1 (Cyr61) が、癌組織塊の多数を占める上皮形質を保持する口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響を推察し、模式図化したものである。これは、RT-PCR やウェスタンブロット法で各癌細胞の CCN1 発現と、図2で示す癌組織における免疫細胞・組織化学染色法で検索したグラディエントな発現パターンの結果を元にしている。

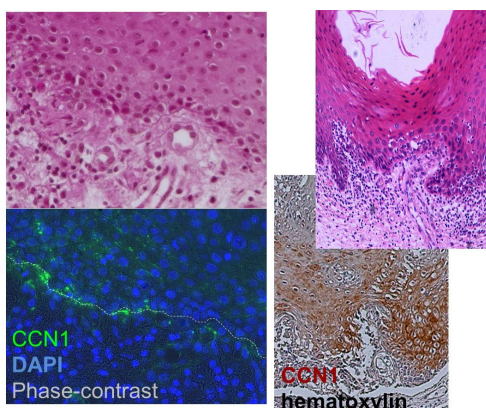


図2 口腔扁平上皮癌組織の免疫細胞・組織染色におけるCCN1のグラディエントな染色像

CCN1 などの液性因子を介する non-EMT 型癌細胞と EMT 型癌細胞の相互作用によって癌組織が形成されていると推察できる。

したがって、癌組織の局所浸潤像の形成は、癌細胞間接着を失った EMT 型癌細胞が利己的に間質へ浸潤するだけでなく、後続の non-EMT 型癌細胞に与える影響を、細胞運動能獲得の観点から解析をおこなう。

3. 研究の方法

EMT 型癌細胞が高発現する液性因子から CCN1 と Galectin-1 を本研究では選択し、扁平上皮癌細胞株 A431 および口腔癌細胞株 OM-1 に強制発現させた株をそれぞれ樹立し、各液性因子が癌細胞に及ぼす影響、そして non-EMT 型癌細胞と EMT 型癌細胞との相互作用について細胞生物学的ならびに分子生物学的手法で解析した。

4. 研究成果

(1) CCN1 は non-EMT 型癌細胞の細胞運動能を増強する

CCN1 を強制発現させた癌細胞は、マトリゲルインベージョンアッセイで細胞浸潤能の増強を認め、三次元培養法においても mass を形成しながらコラーゲンゲル層に浸潤した(図3)。

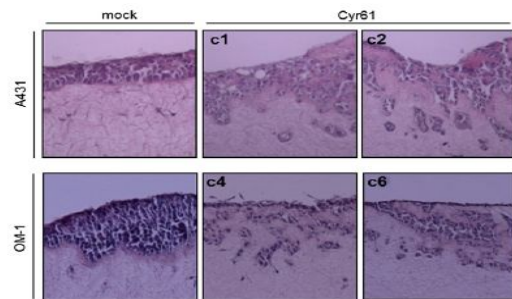


図3 CCN1 強制発現癌細胞の三次元培養像

ウンドヒーリングアッセイにおいては癌細胞は集団的に細胞遊走する像を示し、癌細胞が癌細胞感接着を保ちながら細胞遊走能を獲得することが明らかとなった。すなわち、CCN1 は癌細胞に collective cell migration を与えることが示された。

(2) non-EMT 型癌細胞は外因性 CCN1 刺激によってNFκBの活性を介して内因性 CCN1 が発現誘導される

RT-PCR やウェスタンブロットにおいて、CCN1 強制発現癌細胞の内因性 CCN1 発現の上昇と、組換え CCN1 刺激による内因性 CCN1 発現上昇を確認した。そこでプロモーターアッセイをおこなったところ、内因性 CCN1 の転写活性は外因性 CCN1 によって増強することがわかった(図4)。

また、その活性は NFκB を介しており、その結果、Rho の活性が上昇して collective cell migration を獲得することが推察された。

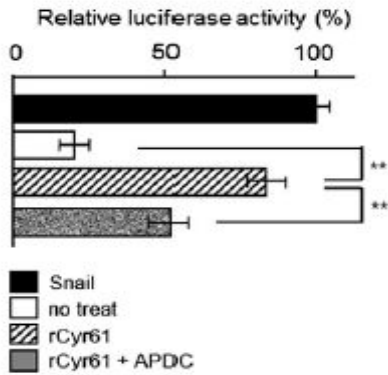


図4 CCN1 プロモーターアッセイ

(3) EMT 型癌細胞は外因性 CCN1 は non-EMT 型癌細胞のインテグリンを介して collective cell migration を引き起こす

外因性 CCN1 による non-EMT 型癌細胞の細胞遊走能獲得は、インテグリンの阻害剤である RGD ペプチドによって阻害された。

そして、マトリゲルインベージョンアッセイにおいて、浸潤能を計測するチャンバーには non-EMT 型癌細胞をシードして浸潤能を計測する一方で、培養液を共有するウェルには CCN1 強制発現癌細胞または EMT 型癌細胞をシードした。その結果、CCN1 強制発現癌細胞または EMT 型癌細胞をシードしたときの non-EMT 型癌細胞の浸潤能は著しく増加した (図5)。この結果は、EMT 型癌細胞が実際に産生する CCN1 が培養液を介して non-EMT 型癌細胞の浸潤能を増強させたのほかならない。

図6は、以上の結果を実際の口腔癌の局所浸潤像にあてはめたモデルである。局所浸潤は EMT 依存的な浸潤様式と CCN1 依存的な浸潤によって構成されることが推察された。

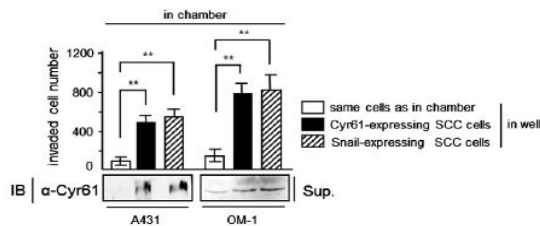


図5 マトリゲルアッセイの応用

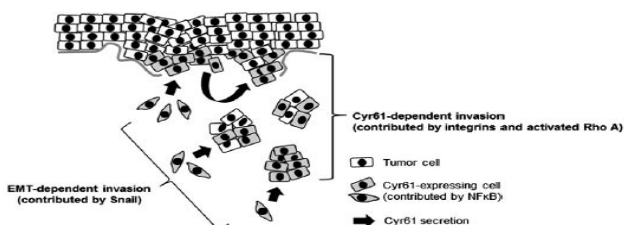


図6 CCN1 を介した局所浸潤像

(4) 液性因子 Galectin-1 による口腔癌の局所浸潤に対する影響

CCN1 と同様の解析を液性因子 Galectin-1 についておこなった。Galectin-1 (Gal-1) は -galactoside-binding lectin family of proteins のメンバー分子で、口腔癌の予後因子になりうるとの報告がある。口腔癌細胞に Gal-1 を強制発現させると浸潤能が増大し、CCN1 と同様に collective cell migration を誘導することがわかった。

EMT 型癌細胞および Snail 強制発現癌細胞において Gal-1 が高発現しており、CCN1 と同様に Snail による転写制御下にあったが、Gal-1 は CCN1 と異なり、Rho ではなく Rac1 の活性を誘導して口腔癌細胞の collective cell migration を誘導していることがわかった。

液性因子 Gal-1 のレセプターとしてインテグリンが考えられ、アイソフォームとしては 2 5 の発現が組換え Gal-1 刺激によって上昇しており、それぞれの中和抗体によって Ga-1 依存的な浸潤能増加が阻害された。

Gal-1 はパラクラインに上皮形質を保持する癌細胞に Collective cell migration を誘導する一方で、EMT 型癌細胞ではオートクラインに Snail 依存的 EMT の感受性を高めることがわかった。

以上の CCN1 および Gal-1 の解析から、癌組織の局所浸潤において non-EMT 型癌細胞と EMT 型癌細胞の相互作用が存在し、その相互作用の担い手として液性因子が大きな役割を演じていることが明らかとなった。この結果は、癌組織の進展の理解において重要であると同時に、癌の進展阻止に大いに役立てることが期待できる。

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. Rizqiawan A1, Tobieme K, Okui G, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Shimasue H, Takechi M, Higashikawa K, Kamata N. Autocrine galectin-1 promotes collective cell migration of squamous cell carcinoma cells through up-regulation of distinct integrins. *Biochem Biophys Res Commun.* 441(4), 査読有 2013, 904-10.

2. Tanaka F1, Rizqiawan A, Higashikawa K, Tobieme K, Okui G, Shigeishi H, Ono S, Shimasue H, Kamata N. Snail promotes Cyr61 secretion to prime collective cell

migration and form invasive tumor nests in squamous cell carcinoma. Cancer Lett. 329(2), 査読有, 2013, 243-52.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Snail-dependent upregulation of Galectin 1 promoted to complete EMT process in Snail-expressing squamous cell carcinoma cells. Andra RIZQIAWAN, Kei TOBIUME, Gaku OKUI, Kazuhiro YAMAMOTO, Hideo SHIGEISHI, Shigehiro ONO, Koichiro HIGASHIKAWA, Masaaki TAKECHI, Nobuyuki KAMATA. 第 58 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013.10.11, 福岡市

2. Snail-dependent upregulation of Gal-1 promoted to complete EMT process in Snail Expressing cells. Andra RIZQIAWAN, Gaku OKUI, Kazuhiro YAMAMOTO, Koichiro HIGASHIKAWA, Hideo SHIGEISHI, Shigehiro ONO, Masaaki TAKECHI, Nobuyuki KAMATA. 第 46 回 広島大学歯学会総会, 2013.6.29, 広島市

3. Role of galectin 1 in cell migration and invasiveness in human squamous cell carcinoma correlated with EMT, ANDRA RIZQIAWAN, 飛梅 圭, 奥井 岳, 山本一博, 東川晃一郎, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之. 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2013.5.24, 宇都宮市

4. Galectin 1 involved in cell migration and invasion by upregulated Integrin alpha2 in squamous cell carcinoma correlated with EMT, Andra R, Okui G, Higashikawa K, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Kamata N. 第 57 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 2012.10.19, 横浜市

5. Role of Galectin 1 in cell migration and invasion in human squamous cell carcinoma correlated with EMT, Rizqiawan A, Okui G, Tanaka F, Higashikawa K, Shigeishi H, Tobiume K, Kamata N. 第 71 回 日本癌学会学術総会, 2012.9.21, 札幌市

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

飛梅 圭 (TOBIUME KEI)

広島大学大学院・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号 : 40350037

東川 晃一郎 (HIGASHIKAWA KOICHIRO)

広島大学・病院・講師

研究者番号 : 80363084

鎌田伸之 (KAMATA NOBUYUKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号 : 70242211

(H24 のみ)