

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792231

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) Elucidation on the molecular mechanisms of the carcinogenesis, invasion, and metastasis of oral squamous cell carcinoma due to epithelial-to-mesenchymal transition mediated by DeltaNp63

研究代表者

松原 良太 (Matsubara, Ryota)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：60615798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌の発生、浸潤、転移に関与しているとされている上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)を制御する分子として Np63に着目し、EMTを介した口腔扁平上皮癌の発生、浸潤、転移制御機構の解明を目的に研究を行った。

その結果、口腔扁平上皮癌細胞において Np63の発現低下がEMTを誘導していることが示唆された。口腔扁平上皮癌において Np63はEMTを制御し、浸潤・転移能の獲得に関与している可能性が推察された。

研究成果の概要(英文)： The purpose in this study is elucidation on the molecular mechanisms of the carcinogenesis, invasion, and metastasis of oral squamous cell carcinoma due to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) mediated by DeltaNp63.

As the results, It is suggested that DeltaNp63 downregulation induced EMT in oral squamous cell carcinoma. DeltaNp63 possibly involved in acquirement of the ability of the invasion, metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype.

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： Np63 口腔扁平上皮癌 上皮-間葉転換(EMT) 浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、異なった増殖能や分化段階にある不均一な細胞集団によって構成されている。この腫瘍組織の不均一性を生じさせる概念として、近年、癌幹細胞 (cancer stem cell: CSC) 仮説が提唱されている。この概念は、正常組織と同様に癌組織中にも存在するごく少数の幹細胞様の細胞集団が自己複製能と多分化能を有し、多様な腫瘍組織を構築するというもので、癌組織内に不均一性を生じさせる新たな要因として考えられている。さらに CSC は抗癌剤や放射線に対し強い抵抗性を示す性質を有することも明らかにされつつある。しかしながら、CSC の発生源については未だ統一した見解が得られていないのが現状であるが、現在のところ正常組織内の組織幹細胞や前駆細胞が形質転換することで発生するという説が有力視されている。そのため、組織幹細胞に特異的な分子マーカーを用いた CSC の同定が様々な癌組織でなされている。また最近では、分化の進んだ状態にある癌細胞が上皮としての性質を喪失し、間葉系細胞様の形質を獲得する、上皮 - 間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) により CSC 様の形質を獲得するという概念も提唱され始め、EMT を獲得した細胞と CSC とでは遺伝子の発現パターンが極めて類似していることが報告されている。さらに、乳癌などにおいては EMT を獲得した細胞は高度の浸潤、転移能を有しているとの報告もある。以上のことから、EMT の制御に関与している分子機構を明らかにすることは癌の発生、浸潤、転移の制御機構の解明、そして CSC の同定に大きく貢献し得るものと推察される。そこでわれわれは、上記背景をもとに正常口腔粘膜の上皮幹細胞マーカーである p63 に着目し、その中でも oncoprotein と考えられている Np63 に焦点を当て、口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma: OSCC) における Np63 の発現および機能について研究を行った。

2. 研究の目的

上述のように EMT が癌の発生、浸潤、転移に深く関与し、さらに癌細胞が EMT を獲得することで CSC 様の形質を獲得することが示唆されている。われわれは EMT を制御する分子として正常口腔粘膜の上皮幹細胞マーカーである Np63 に着目し、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した。

3. 研究の方法

(1) OSCC 細胞株、EMT 獲得細胞、Np63 発現抑制細胞、および Np63 過剰発現細胞における EMT 関連分子の発現の検索

OSCC 細胞株のうち、上皮細胞様形態を示す低転移細胞株 (HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SAS) と線維芽細胞様形態を示し、EMT を獲得して

いると考えている高転移細胞株である SQUU-B 細胞について、上皮系細胞マーカー (Np63、E-cadherin、Cytokeratin (CK) 5、CK14) および間葉系細胞マーカー (vimentin、N-cadherin) の発現を RT-PCR 法、western blotting 法、蛍光免疫細胞染色法を用いて比較検討する。

高転移細胞株 SQUU-B 細胞に Np63 発現ベクターを導入して作製した細胞株 (Np63 過剰発現 SQUU-B 細胞株) および低転移細胞株である HSC-2 細胞に Np63 siRNA を導入して作製した細胞株 (Np63 発現抑制 HSC-2 細胞株) を用いて上述の分子発現について検討する。

(2) Np63 発現抑制細胞および Np63 過剰発現細胞の細胞生物学的特性 (増殖能、遊走能) の検索

HSC-2 細胞と Np63 発現抑制 HSC-2 細胞、SQUU-B 細胞と Np63 過剰発現 SQUU-B 細胞において以下に示す細胞生物学的特性を比較検討する。

増殖能

WST-1 assay および BrdU incorporation assay にて細胞の増殖能を検索する。

遊走能

wound healing assay を用いて細胞の遊走能について検索を行う。

(3) 高転移細胞株 SQUU-B 細胞の細胞生物学的特性の検討

EMT を獲得していると考えている SQUU-B 細胞においてフローサイトメーターを用いて発現強度の違いによる細胞生物学的特性の差異を検討する。

(4) OSCC 組織における Np63 および EMT 関連分子の局在の検索

OSCC 組織における EMT 関連分子 (E-cadherin、vimentin) の局在を免疫組織化学的に検索する。特に、OSCC 原発巣の浸潤先端部における EMT 関連分子の発現について検索する。また、Np63 の局在についても同様に検索する。

4. 研究成果

(1) OSCC 細胞株、EMT 獲得細胞、Np63 発現抑制細胞、および Np63 過剰発現細胞における EMT 関連分子の発現の検索

OSCC 細胞株において Np63 は上皮系細胞マーカーである E-cadherin、cytokeratin (CK) 5 および 14 と同様に多くの細胞株で発現が認められたが、高転移株である SQUU-B 細胞では Np63 の発現は認められず、間葉系細胞マーカーである vimentin および N-cadherin を強発現していた (図 1)。

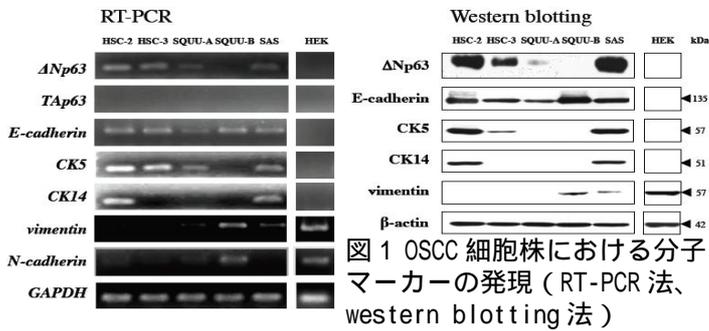


図1 OSCC 細胞株における分子マーカーの発現 (RT-PCR 法、western blotting 法)

また、蛍光免疫細胞染色においても SQUU-B 細胞では Np63 の発現は認められなかったが、E-cadherin の発現が強く、vimentin の発現が弱い細胞や E-cadherin の発現が弱く、vimentin の発現が強い細胞が混在していた (図2)。

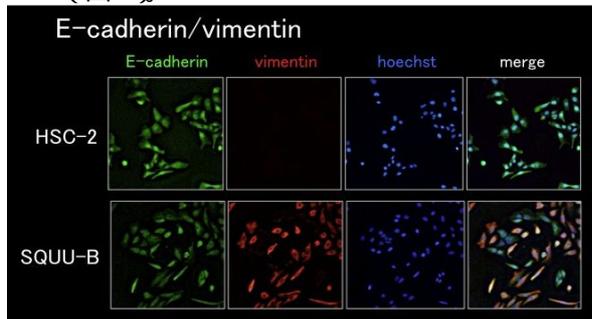


図2 OSCC 細胞株における EMT 関連分子マーカーの発現 (蛍光免疫細胞染色)

Np63 を強発現していた HSC-2 細胞に Np63 siRNA を導入すると、上皮系細胞マーカーの発現量の減少および vimentin の発現量の増加を認めた。さらに Np63 の発現が認められなかった SQUU-B 細胞に Np63 を過剰発現させると E-cadherin を除く上皮系細胞マーカーの発現量の増加および vimentin の発現量の減少を認めた。

(2) Np63 発現抑制細胞および Np63 過剰発現細胞の細胞生物学的特性 (増殖能、遊走能) の検索

Np63 の発現抑制により低転移株 HSC-2 細胞は多角形から線維芽細胞様の形態に変化が認められ (図3)、さらに細胞増殖活性の低下、細胞遊走能の亢進を認めた (図4)。

また Np63 の過剰発現により高転移株 SQUU-B は線維芽細胞様形態から多角形の細胞に形態変化が認められ (図5)、さらに細胞増殖活性の亢進、細胞遊走能の低下を認めた (図6)。

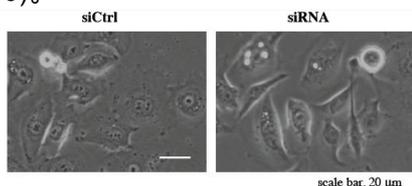


図3 Np63 発現抑制が細胞形態変化に与える影響

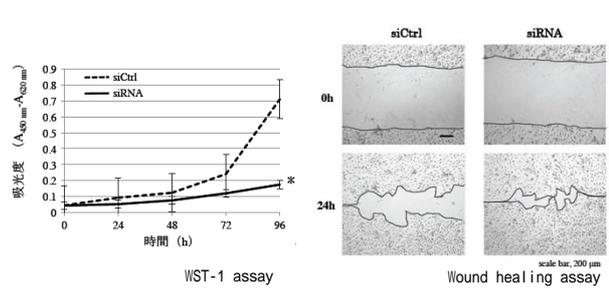


図4 Np63 発現抑制が細胞増殖能、遊走能に与える影響

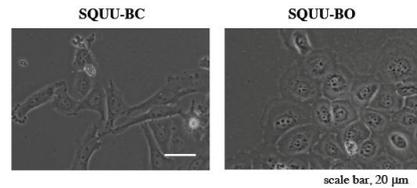


図5 Np63 過剰発現が細胞形態変化に与える影響

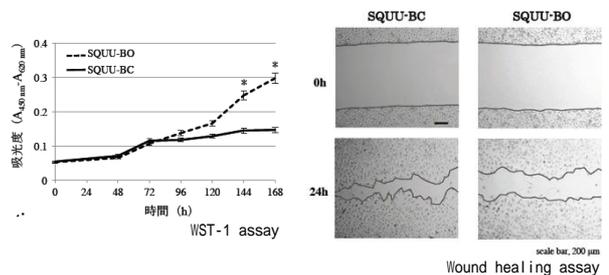


図6 Np63 過剰発現が細胞増殖能、遊走能に与える影響

siCtrl: scramble siRNA 導入群 (コントロール HSC-2 細胞)

siRNA:

Np63 siRNA 導入群 (Np63 発現抑制 HSC-2 細胞)

SQUU-BC:

empty ベクター導入群 (コントロール SQUU-B 細胞)

SQUU-BO:

Np63 発現ベクター導入群 (Np63 過剰発現 SQUU-B 細胞)

(3) 高転移細胞株 SQUU-B 細胞の細胞生物学的特性の検討

研究結果の蛍光免疫細胞染色 (図2) にて SQUU-B 細胞における E-cadherin の発現強度に差異があったことから、フローサイトメーターを用いて SQUU-B 細胞における E-cadherin の発現を検索したところ、E-cadherin の発現が強い細胞と弱い細胞が存在し (図7) 限界希釈法にて E-cadherin 陽性細胞と陰性細胞を分離したところ、E-cadherin 陰性細胞において線維芽細胞様形態を示した (図8)。

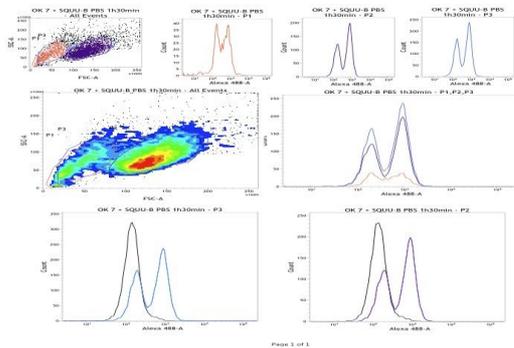


図7 SQUU-B細胞におけるE-cadherinの発現

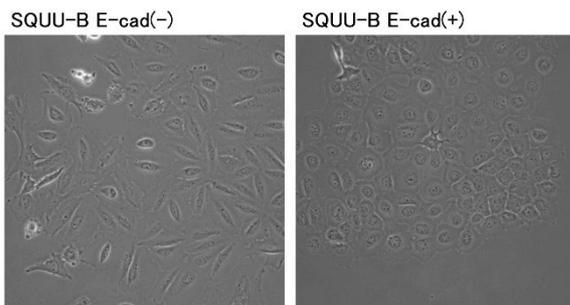


図8 E-cadherinの発現の違いによるSQUU-B細胞の細胞形態

(4)OSCC組織における Np63およびEMT関連分子の局在の検索

OSCC組織を用いて Np63、E-cadherin および vimentin の発現を免疫組織化学的に二重染色法にて検索したところ、OSCCの腫瘍中心部では、Np63 および E-cadherin はほぼ全ての癌細胞に発現を認め、vimentin の発現は認められなかった。一方、浸潤先端部では、Np63 および E-cadherin 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。

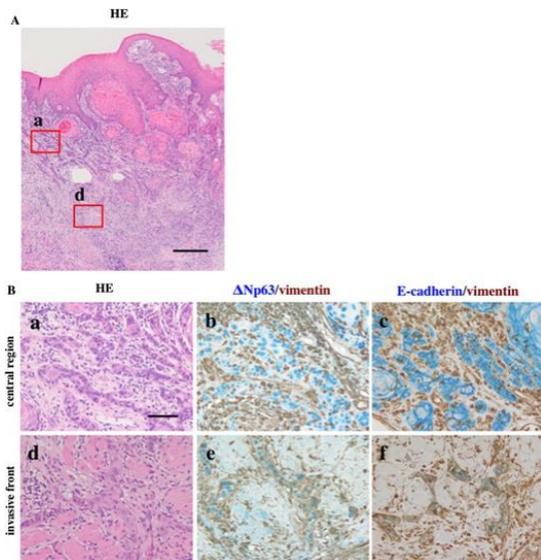


図9 OSCC組織における Np63、E-cadherin および vimentin の発現様式 (A: 弱拡大像、B: 強拡大像、a-c: 腫瘍中心部、d-f: 浸潤先端部)

以上の結果より、Np63の発現減弱あるいは消失がEMTを誘導していることが示唆され、OSCCの浸潤・転移能の獲得に参与している可能性が推察された。

今後は頭頸部扁平上皮癌の治療に使用されている5-FU、シスプラチン、ドセタキセル、パクリタキセル等の抗癌剤あるいはセツキシマブ等の分子標的薬に対する耐性についてOSCC細胞株を用いて検討し、さらには*in vivo*における抗腫瘍効果、浸潤・転移における影響についてもOSCC細胞を同所性移植したCAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrlCrljマウス(BALB/cヌードマウス)にこれら抗癌剤および分子標的薬を投与し、検索を行う予定である。

本研究は、癌の発生および浸潤・転移における分子機構をEMTという現象に着目し、そのEMTの分子機構をこれまでほとんど報告がないNp63に焦点を当ててその解明を行っている。Np63によるEMTを介した癌の発生および浸潤・転移能獲得の分子機構が解明され、Np63がOSCCにおける癌治療の標的となり得るならば、抗癌剤、分子標的薬、外科治療等原発巣の治療が進歩した現在においても治療が困難な頸部再発症例、遠隔転移症例の治療法の開発に大きく貢献できるものと思われる。

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11件)

Hideaki Tanaka, Takeshi Toyoshima, Kenzo Sonoda, Ryoji Kitamura, Masaaki Sasaguri, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Seiji Nakamura

Apoptotic function of tumor-associated antigen RCAS1 in oral squamous cell carcinoma
Journal of Translational Medicine (査読有) in press.

Yuichi Goto, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Takahiro Kiyosue, Mitsuhiro Hirano, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Takeshi Toyoshima, Ryoji Kitamura Hideaki Tanaka, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura

Possible involvement of Np63 downregulation in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype.

Clinical and Experimental Metastasis (査読有) 31(3): 293-306, 2014.

松原良太、川野真太郎、清島保、平野充広、丸瀬靖之、中村誠司

頸部再発に対し放射線併用超選択的動注化学療法が奏功した舌扁平上皮癌の1例
日本口腔外科学会雑誌 (査読有) 60(2):

76-81, 2014.

Eiji Mitate, Shintaro Kawano, Tamotsu Kiyoshima, Toru Chikui, Yuichi Goto, Ryota Matsubara, Seiji Nakamura
Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the upper lip: A case of an unusual malignant component of squamous cell carcinoma.

World Journal of Surgical Oncology (査読有) 11(1): 234, 2013.

Shiori Kanda, Takeshi Mitsuyasu, Yu Nakao, Shintaro Kawano, Yuichi Goto, Ryota Matsubara, Seiji Nakamura
Anti-apoptotic role of sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma.

International Journal of Oncology (査読有) 43(3): 695-702, 2013.

Hiroe Kakehashi, Shintaro Kawano, Tamotsu Kiyoshima, Mayumi Shimizu, Masafumi Moriyama, Ryota Matsubara, Takahiro Kiyosue, Yuichi Goto, Hideki Shiratsuchi, Seiji Nakamura

Parotid gland myoepithelioma with remarkable cystic formation: A case report.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology (査読有) 25(2): 183-188, 2013.

Takahiro Kiyosue, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Mitsuhiro Hirano, Teppei Jinno, Takeshi Toyoshima, Ryoji Kitamura, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura
Immunohistochemical localization of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma.

International Journal of Clinical Oncology(査読有)18(1): 154-163, 2013.

Ryoji Kitamura, Takeshi Toyoshima, Hideaki Tanaka, Shinaro Kawano, Takahiro Kiyosue, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Mitsuhiro Hirano, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura

Association of cytokeratin 17 expression with differentiation in oral squamous cell carcinoma.

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology (査読有) 138(8): 1299-1310, 2012.

Ryota Matsubara, Shintaro Kawano, Toru Chikui, Takahiro Kiyosue, Yuichi Goto, Mitsuhiro Hirano, Teppei Jinno, Tetsuji Nagata, Kazunari Oobu, Koichiro Abe, Seiji Nakamura

Clinical significance of combined assessment of the maximum standardized

uptake value of F-18 FDG PET with nodal size in the diagnosis of cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma.

Academic Radiology (査読有) 19(6): 708-717, 2012.

[学会発表](計6件)

神野哲平、川野真太郎、松原良太、後藤雄一、清島保、丸瀬靖之、神野彰子、金子直樹、坂本泰基、橋口有真、森山雅文、大部一成、杉浦剛、中村誠司
口腔扁平上皮癌における IL-6 の発現と機能～抗癌剤抵抗性獲得への関与について～

第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会

2014.05.08.

東京都新宿区

坂本泰基、後藤雄一、川野真太郎、今藤彰子、松原良太、神野哲平、丸瀬靖之、金子直樹、橋口有真、大部一成、杉浦剛、中村誠司

唾液腺悪性腫瘍の臨床病理学的検討

第 32 回 日本口腔腫瘍学会総会

2014.01.23.

北海道札幌市

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、今藤彰子、森山雅文、大部一成、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 32 回 日本口腔腫瘍学会総会

2014.01.24.

北海道札幌市

金子直樹、大部一成、後藤雄一、川野真太郎、橋口有真、松原良太、神野哲平、丸瀬靖之、坂本泰基、田中秀明、杉浦剛、中村誠司

口腔扁平上皮癌頸部転移に対する術後治療の有用性についての検討

第 32 回 日本口腔腫瘍学会総会

2014.01.24.

北海道札幌市

松原良太、川野真太郎、清末崇裕、北村亮二、後藤雄一、平野充広、神野哲平、大部一成、杉浦剛、中村誠司

上部消化管内視鏡検査にて重複癌を認めた口腔扁平上皮癌症例の検討

第 58 回 日本口腔外科学会総会・学術大会

2013.10.11.

福岡県福岡市

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
2013.06.07.
福岡県福岡市

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 良太 (MATSUBARA, Ryota)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：60615798

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：