

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463014

研究課題名(和文)上皮間葉転換による口腔癌の浸潤・転移機構の解明 -特にZEB1,2に着目して-

研究課題名(英文)A study on the mechanism of invasion and metastasis thorough epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cel 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、口腔癌の浸潤の際に Np63 の発現が減弱し上皮間葉転換(EMT)が誘導されることを示したが、詳細は不明であった。本研究では、EMTに關与するmicroRNA(miR)を同定するために、口腔癌高転移株に Np63 を強制発現させてmiRマイクロアレイ解析を行ったところ、最も発現が上昇したのはmiR-205であった。そこで、miR-205のinhibitorを添加したところ、ZEB1、ZEB2の発現が上昇し、EMTが誘導され、浸潤・遊走能が亢進していた。以上より、口腔癌の浸潤には Np63 とmiR205の発現減弱により、ZEBの発現が上昇することが重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Previously, microRNA (miR) microarray analyses were performed to identify the responsible gene for epithelial-mesenchymal transition (EMT) mediated by Np63 in oral squamous cell carcinoma (OSCC). As the results, we focused on miR-205 that is up-regulated by Np63 -forced expression. The inhibitor for miR-205 was thus added into the culture supernatant of OSCC cells strongly expressing Np63 . And then, expression of zinc finger E-box binding homeobox (ZEB)1 and ZEB2 was up-regulated, epithelial markers including cytokeratin 19 and E-cadherin were also down-regulated, mesenchymal markers were up-regulated. Furthermore, capacities of invasion and migration were enhanced by the treatment of inhibitor for miR-205. These results showed tumor-suppressive roles of Np63 and miR-205 by inhibiting EMT thorough modulating ZEB1 and ZEB2 expressions in OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：浸潤 転移 口腔癌 上皮間葉転換 ZEB1 ZEB2 delTaNp63

1. 研究開始当初の背景

上皮-間葉転換 (epithelial to mesenchymal transition: EMT) とは、上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得する現象である。EMT は器官形成のさまざまな局面で観察されているが、がん細胞の悪性化や浸潤・転移のプロセスにおいても重要な役割を担うことが明らかになってきた。EMT が誘導された癌細胞では、1. 線維芽細胞様の形態変化、2. 上皮系マーカー (E-cadherin、cytokeratin など) の発現低下、3. 間葉系マーカー (vimentin、fibronectin など) の発現亢進、4. 細胞遊走能および浸潤能の亢進が認められる。最近の研究により、これらの細胞形質の獲得に転写因子である Snail や Slug が関与している可能性が示されているが、いまだ詳細な解明には至っていない。

これまでに我々は、p53 ファミリーの1つである転写因子 Np63 に着目し、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 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。それにより以下のような研究結果を得た。(Matsubara R, *et al* (2012). *Int J Oncol*; Goto Y, *et al* (2014). *Clin Exp Metastasis*)

Np63 は上皮細胞マーカーである cytokeratin 5、14 と同様に多くの OSCC 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、fibronectin、N-cadherin を強く発現していた。

Np63 を強発現していた HSC-2 細胞に Np63siRNA を導入すると、上皮細胞マーカーの発現量減少および vimentin、fibronectin の発現量増加を認めた。

Np63siRNA 導入細胞では、紡錘形の線維芽細胞様の形態を示しており、増殖活性の低下、細胞遊走能の亢進が認められた。

SQUU-B 細胞に、Np63 の isoform の1つで機能がほとんど分かっていなかった Np63 を過剰発現させると、上皮系マーカーの発現量増加、間葉系マーカーの発現量低下、細胞遊走能の亢進を認め、上皮細胞の形質を再獲得していた。

これらのことから、高転移株である SQUU-B は間葉系細胞の形質を有しており、その形質獲得に Np63 が関与している可能性が示唆された。

そこで我々は、EMT を制御する遺伝子として Zinc finger E-box-binding homeobox (ZEB) ファミリーに着目した。ZEB ファミリーには、構造の類似した2つのタンパク (ZEB1 および ZEB2) があり、これらは

E-cadherin のプロモーター領域の E-box に結合し、その転写を制御することが分かっている。また、我々が行った予備実験では、ZEB1/ZEB2 は SQUU-B 細胞にのみ発現しており、他の OSCC 細胞株では発現を認めなかった。これらのことから、OSCC の EMT 形質獲得に Np63 と ZEB1/ZEB2 の関連が示唆された。

一方、最近の研究により、microRNA (miR) が癌における EMT のプロセスにも関与していることが知られているが、Np63 と miR との関連については明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

このような学術的背景から、OSCC が Np63 の発現減弱により EMT を起こすことが示唆されるものの、そのメカニズムは不明である。本研究では、OSCC における Np63 の発現減弱を誘導する責任分子を明らかにするために miR に着目し、ZEB との関連について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Np63 を介した EMT に関与する miR の同定

・miR マイクロアレイ法

(2) Np63 ノックダウンならびに miR-205 inhibitor 添加が OSCC の浸潤、遊走、増殖に与える影響

・MTT アッセイ

・Matrigel invasion アッセイ

・wound healing アッセイ

(3) miR-205 inhibitor 添加が各種分化マーカーと EMT 関連遺伝子の発現に及ぼす影響

・RT-PCR 法

・real-time PCR 法

・western blotting 法

(4) miR-205 過剰発現が OSCC に与える影響

(5) OSCC 生検組織における ZEB1 と ZEB2 の発現と臨床病理学的因子との関連

・免疫組織化学的染色法

4. 研究成果

(1) OSCC 細胞株における miR-205 の発現と機能に関する研究

Np63 の発現を認めず、EMT 形質を有する OSCC 高転移株 SQUU-B 細胞に、Np63 発現ベクターを導入した Np63 強制発現細胞株 (SQUU-B0) とコントロールベクターを導入した陰性対照細胞株 (SQUU-BC) を用いて miRNA マイクロアレイ解析を行った (図1)。その結果、Np63 の強制発現により最も発現上昇の変動幅が大きかった miR-205 を、

Np63 を介した EMT に関与する miRNA として着目し、OSCC 細胞株における発現と機能を

検討した。

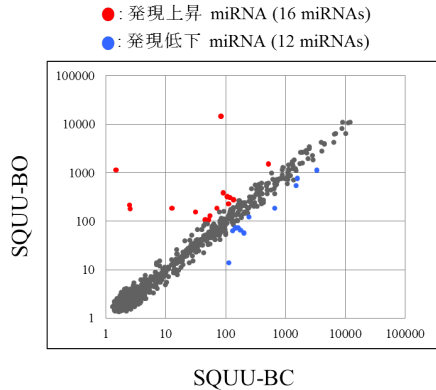


図1 microRNA マイクロアレイ解析

OSCC 細胞株 (HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS) における miR-205 の発現量を real-time PCR 法により検索したところ、miR-205 の発現は Np63 の発現と正の相関を示し、ほとんどの OSCC 細胞で高い発現を認めたが、SQUU-B 細胞で最も発現が低かった。また、

Np63 を高発現している低転移株 SQUU-A 細胞に Np63 のノックダウンを行うと、miR-205 の発現低下を認めた。次に、miR-205 の標的遺伝子として、E-cadherin の発現抑制に関わる転写因子である ZEB1 および ZEB2 に着目し、OSCC 細胞株における発現を real-time PCR 法、western blotting 法および免疫細胞化学染色法にて検索した。その結果、ZEB1 と ZEB2 はともに SQUU-B 細胞で最も発現が高く、他の OSCC 細胞ではほとんど発現が認められず、miR-205 の発現と逆相関していた。免疫細胞化学染色法では、ZEB1 と ZEB2 は、主に SQUU-B 細胞の核に発現していたが、E-cadherin の発現は認められなかった。一方、SQUU-A 細胞では、細胞膜に E-cadherin の発現を認めるものの、ZEB1 と ZEB2 の発現はほとんど認められなかった。

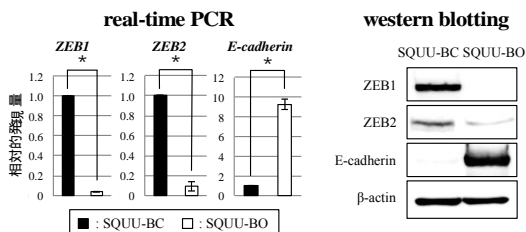


図2 Np63 強制による ZEB1/2、E-cadherin の発現

さらに、SQUU-B 細胞へ miR-205 mimic を遺伝子導入し、miR-205 を強制発現させると、ZEB1 と ZEB2 の発現低下と、E-cadherin を含む上皮系マーカーの発現亢進、間葉系マーカーの発現低下、遊走能および浸潤能の低下を認めた。

一方、miR-205 を高発現している SQUU-A 細胞に miR-205 inhibitor を遺伝子導入し、

miR-205 のノックダウンを行うと、ZEB1 と ZEB2 の発現の増加と、E-cadherin の発現低下、間葉系マーカーの発現亢進および遊走能の亢進が認められた (図3)。また、SQUU-B 細胞に miR-205 mimic と ZEB1 または ZEB2 の target protector を共導入し、miR-205 が ZEB1 と ZEB2 の発現を直接的に制御しているのかについて検討を行った結果、ZEB1 と ZEB2 ともに miR-205 強制発現による発現量の減少が抑制されていた。

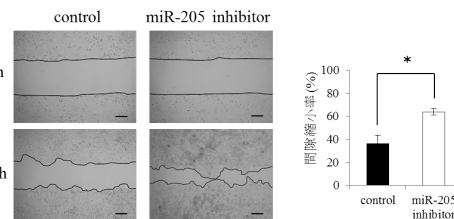


図3 miR-205 inhibitor 添加が OSCC 細胞の遊走能へ与える影響

2. OSCC 生検標本における ZEB1 および ZEB2 の免疫組織化学的検討

OSCC 組織における ZEB1 と ZEB2 の発現を検索するため、OSCC 患者 94 名の生検標本を用いて免疫組織化学的染色を行った。ZEB1 および ZEB2 ともに正常口腔粘膜上皮では発現が認められなかったが、OSCC では主に腫瘍浸潤先端部の癌細胞の核に強い発現を認めた。腫瘍浸潤先端部の癌細胞の核における ZEB1 と ZEB2 の陽性細胞率 (labeling index: LI) を算出した後、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いた解析によりカットオフ値 (cut-off value: COV) を設定し、症例を $LI \geq COV$ 群と $LI < COV$ 群の 2 群に分け、臨床病理学的所見および予後との関連について検討した。その結果、ZEB1 ($LI \geq COV$) 群 (60 例) は、ZEB1 ($LI < COV$) 群 (34 例) と比較して局所再発およびリンパ節転移の発生頻度が高く、疾患特異的累積 5 年生存率が有意に低かった。また、ZEB2 ($LI \geq COV$) 群 (22 例) も同様に、ZEB2 ($LI < COV$) 群 (72 例) と比較して局所再発の頻度が高く、疾患特異的累積 5 年生存率が有意に低かった。

以上の結果より、Np63 は、miR-205 を介して ZEB1 および ZEB2 の発現を制御することで、OSCC の EMT の誘導に関与していることが示唆された。また、OSCC 浸潤先端部における ZEB1 および ZEB2 の発現上昇は、癌細胞の遊走能および浸潤能の亢進に関与し、その結果、癌の進展に寄与しているものと推察された。

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 2 件)

Sakamoto T, Kawano S, *et al.* Critical roles of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma and production of matrix metalloproteinase-2 via Np63B-mediated epithelial- mesenchymal transition. *Oral Oncol* 69: 15-25, 2017.

Kawano S, Zheng Y, *et al.* Clinicopathological evaluation of pre-operative chemoradiotherapy with S-1 as a treatment for locally advanced oral squamous cell carcinoma. *Oncology* 1et. 11: 3369-3376, 2016.

〔学会発表〕(計 2 件)

口腔扁平上皮癌における miR-205 の発現と機能に関する研究～特に Np63 との関連について～. 橋口有真、川野真太郎、他 8 名. 第 70 回日本口腔科学会学術集会. 2016.4.17. 福岡市

口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における Np63 が導く上皮間葉転換の関与. 後藤雄一、川野真太郎、他 11 名. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015.10.10. 名古屋市.

〔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

<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

豊嶋 健史 (TOYOSHIMA, Takeshi)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：20546569

中村 誠司 (NAKAMURA, Seiji)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60189040

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし