

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861729

研究課題名(和文) Np63による上皮-間葉転換を介した口腔扁平上皮癌の発生および悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation on the molecular mechanisms of the carcinogenesis and malignant transformation of oral cancer via DeltaNp63-mediated epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

松原 良太 (Matsubara, Ryota)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：60615798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000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考えられている上皮-間葉転換(epithelial-to-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(oral squamous cell carcinoma: OSCC)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の発現の低下がEMTを誘導していることが示唆され、さらに Np63がEMT関連分子と考えられているKLK6あるいはmiR-205を制御することにより、浸潤・転移能の獲得に関与していることが推察された。

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

As the results, it is suggested that downregulation of DeltaNp63 induced EMT in OSCC. Furthermore, DeltaNp63 regulates KLK6 and miR-205 regarded as EMT-related molecules, and therefore DeltaNp63 possibly involved in acquirement of the invasion, metastasis of OSCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード： Np63 口腔扁平上皮癌 上皮-間葉転換(EMT) KLK6 miR-205

### 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(癌幹細胞)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、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ΔNp63に焦点を当て、口腔扁平上皮癌(Oral squamous cell carcinoma:OSCC)におけるΔNp63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ΔNp63に着目し、ΔNp63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細胞株におけるΔNp63の転写制御が細胞生物学的特性に与える影響についての検討

ΔNp63の発現を認める低転移株HSC-2細胞ΔNp63 siRNAを導入して作製した細胞株

(ΔNp63 ノックダウン HSC-2 細胞株)とΔNp63の発現が認められない高転移株SQUU-B細胞にΔNp63発現ベクターを導入して作製した細胞株(ΔNp63 過剰発現SQUU-B細胞株)を用いて細胞生物学的特性(増殖能、遊走能、浸潤・転移能)について検討し、ΔNp63の転写制御が細胞生物学的特性に与える影響について検討する。

#### (2) OSCC細胞株におけるΔNp63の転写制御に関するEMT関連分子の同定

SQUU-BO細胞とempty vectorを導入したSQUU-B細胞を用いてマイクロアレイ(DNAマイクロアレイ、miRNAアレイ)を行い、両細胞株間で発現量に差のあるEMT関連遺伝子を同定し、これらの発現と機能解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) OSCC細胞株におけるΔNp63の転写制御が細胞生物学的特性に与える影響についての検討

ΔNp63ノックダウンにより、低転移株HSC-2細胞は多角形から紡錘形の細胞形態に変化が認められ(図1)、さらに増殖活性の低下(図2)、細胞遊走能の亢進を認めた(図3)。

また、ΔNp63過剰発現により、高転移株SQUU-B細胞は紡錘形から多角形の細胞形態に変化し(図4)、増殖活性の亢進(図5)、細胞遊走能の低下(図6)を認めた。

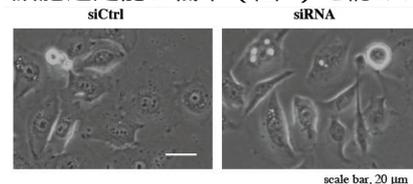


図1 ΔNp63のノックダウンが細胞形態に与える影響

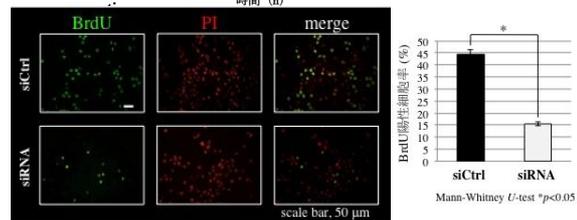
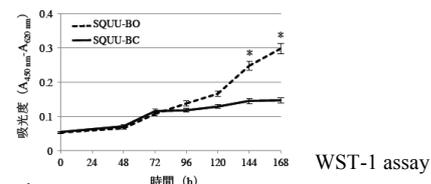


図2 ΔNp63ノックダウンが細胞増殖能に与える影響

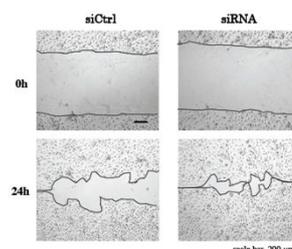


図3 ΔNp63ノックダウンが細胞遊走能に与える影響

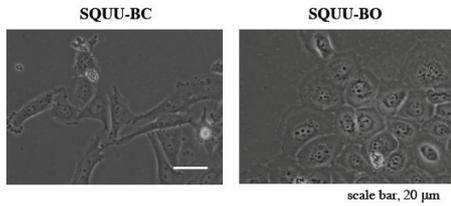


図4 ΔNp63過剰発現が細胞形態に与える影響

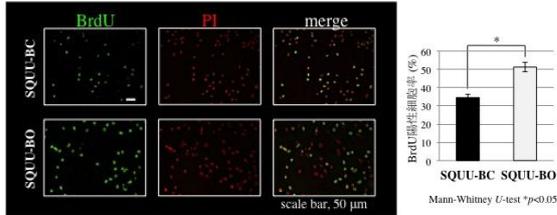
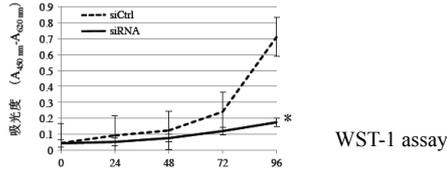


図5 ΔNp63 過剰発現が細胞増殖能に与える影響

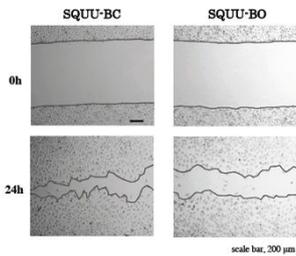


図6 ΔNp63 過剰発現が細胞遊走能に与える影響

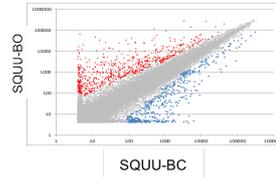
siCtrl:  
scramble siRNA 導入群 (コントロール HSC-2 細胞)  
siRNA:  
ΔNp63 siRNA 導入群 (ΔNp63 発現抑制 HSC-2 細胞)  
SQUU-BC:  
empty ベクター 導入群 (コントロール SQUU-B 細胞)  
SQUU-BO:  
ΔNp63 発現ベクター 導入群 (ΔNp63 過剰発現 SQUU-B 細胞)

(2) OSCC 細胞株における ΔNp63 の転写制御に關与する EMT 關連分子の同定

SQUU-BC 細胞と SQUU-BO 細胞において DNA マイクロアレイと miRNA アレイを行ったところ、SQUU-BC 細胞と比較して SQUU-BO 細胞で最も発現上昇を認めた EMT 關連分子はそれぞれ kallikrein related peptidase 6 (KLK6) と miR-205 であった (図 6, 7)。

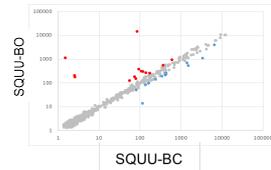
SQUU-BC 細胞と比較して SQUU-BO 細胞では KLK6 が発現上昇しており (図 8) また、ΔNp63 ノックダウン細胞では KLK6 の発現が低下していた (図 9)。また、miR-205 の標的遺伝子のうち、EMT に關連する遺伝子である ZEB1、ZEB2 の発現を検索したところ、SQUU-BC 細胞と比較して SQUU-BO 細胞で

低下していた (図 10)。



順位	gene	Z-score	Ratio
1	KLK6	10.29937407	3866.745078
2	KRT19	10.00321376	81.17118053
3	MAL2	9.885873014	398.7261882
4	CLDN4	9.794408186	230.2605342
5	WFDC2	9.591755618	333.641765

図6 SQUU-BC細胞とSQUU-BO細胞における遺伝子発現差異解析 (DNA マイクロアレイ)



順位	miRNA	Fold change (Ratio)
1	miR-205-5p	786.88
2	miR-200c-3p	176.07
3	miR-200b-5p	86.82
4	miR-200b-3p	71.51
5	miR-584-5p	14.83

図7 SQUU-BC細胞とSQUU-BO細胞における遺伝子発現差異解析 (miRNA アレイ)

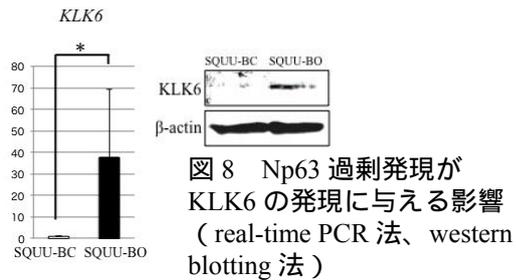


図8 Np63 過剰発現が KLK6 の発現に与える影響 (real-time PCR 法、western blotting 法)

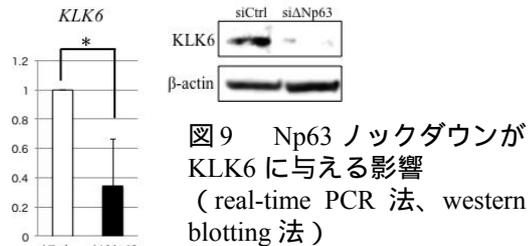


図9 Np63 ノックダウンが KLK6 に与える影響 (real-time PCR 法、western blotting 法)

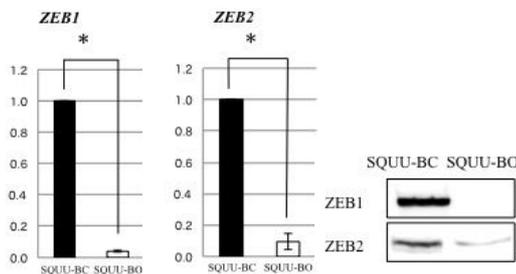


図10 Np63 過剰発現が ZEB1 および ZEB2 の発現に与える影響 (real-time PCR 法、western blotting 法)

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、さらに Np63 が KLK6 あるいは miR-205 を制御することにより、浸潤・転移能の獲得に関与していることが推察された。

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<sup>tm</sup>/CrIcrlj 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 12 件)

1. 金子直樹、松原良太、川野真太郎、清島保、見立英二、中村誠司  
舌下腺に生じた多形腺腫の 1 例  
日本口腔内科学会雑誌 (査読あり) 22(2): 80-83, 2016.
2. 見立英二、川野真太郎、松原良太、橋口有真、金子直樹、坂本泰基、中村誠司  
陰圧閉鎖療法により治療した頸部郭清術後リンパ漏の 2 例  
日本口腔腫瘍学会雑誌 (査読あり) 28(3): 155-160, 2016.
3. Naoki Kaneko, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Masakazu Iida, Seiji Nakamura.  
Tongue squamous cell carcinoma producing both parathyroid hormone-related protein and granulocyte-colony-stimulating factor: a case report and literature review  
World Journal of Surgical Oncology (査読あり) 14(1), 161, 2016.
4. Shohei Yoshimoto, Hiromitsu Morita, Ryota Matsubara, Takeshi Mitsuyasu, Yuko Imai, Shunichi Kajioaka, Masahiro Yoneda, Yushi Ito, Takao Hirofujii, Seiji Nakamura, Masato Hirata.

Surface vacuolar ATPase in ameloblastoma contributes to tumor invasion of the jaw bone  
International Journal of Oncology (査読あり) 48(3): 1258-1270, 2016.

5. Shintaro Kawano, Yanqun Zheng, Kazunari Oobu, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Toru Chikui, Tadamasu Yoshitake, Tamotsu Kiyoshima, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Eiji Mitate, Ryoji Kitamura, Hideaki Tanaka, Takeshi Toyoshima, Tsuyoshi Sugiura, Seiji Nakamura.  
Clinicopathological evaluation of preoperative chemoradiotherapy with S-1 for locally advanced oral squamous cell carcinoma  
Oncology Letters (査読あり) 11(5): 3369-3376, 2016.
6. 金子直樹、川野真太郎、松原良太、笹栗正明、丸瀬靖之、三上友理恵、清島保、森山雅文、中村誠司  
舌粘膜疹と皮疹を認めた第 2 期梅毒の 1 例  
日本口腔内科学会雑誌 (査読あり) 21(2): 38-42, 2015.
7. Yasuyuki Maruse, Shintaro Kawano, Tamotsu Kiyoshima, Yuichi Goto, Ryota Matsubara, Toru Chikui, Daigo Yoshiga, Seiji Nakamura.  
Case of mucoepidermoid carcinoma of the sublingual gland accompanied with extensive dystrophic calcification and intratumoral bone formation  
Head & Neck (査読あり) 37(11): E161-164, 2015.
8. Teppei Jinno, Shintaro Kawano, Yasuyuki Maruse, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Naoki Kaneko, Hideaki Tanaka, Ryoji Kitamura, Takeshi Toyoshima, Akiko Jinno, Masafumi Moriyama, Kazunari Oobu, Tamotsu Kiyoshima, Seiji Nakamura.  
Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma  
Oncology Reports (査読あり) 33(5): 216-218, 2015.
9. 太田美穂、松原良太、川野真太郎、大部一成、緒方謙一、中村誠司  
抜歯後出血を契機として明らかとなった慢性播種性血管内凝固症候群の 1 例  
日本口腔内科学会雑誌 (査読あり) 20(2): 47-51, 2014.
10. 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 (査読あり) 12: 112, 2014.
11. 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  $\Delta$ Np63 downregulation in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype Clinical and Experimental Metastasis (査読あり) 31(3): 293-306, 2014.
  12. **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 (査読あり) 60(2): 76-81, 2014.
- [学会発表] (計 11 件)
1. **松原良太**  
蝶形骨に転移をきたした下顎骨中心性扁平上皮癌への対応  
日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
2017.01.26.  
福岡県福岡市
  2. 金子直樹, 川野真太郎, **松原良太**, 後藤雄一, 神野哲平, 丸瀬靖之, 坂本泰基, 橋口有真, 松村万由, 服部多市, 田中秀明, 大部一成, 中村誠司  
口腔扁平上皮癌における kallikrein related peptidase 6 の発現と機能に関する研究  
日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
2017.01.27.  
福岡県福岡市
  3. **Ryota Matsubara**, Shintaro Kawano, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Naoki Kaneko, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura  
Clinical evaluation of oral squamous cell carcinoma patients with the synchronous second cancer detected by upper gastrointestinal fiberoscopy.  
The 28th Conference of the Taiwan Association of Oral and Maxillofacial Surgeons  
2016.03.05.  
台湾台中市
  4. Taiki Sakamoto, Shintaro Kawano, **Ryota Matsubara**, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Naoki Kaneko, Yuma Hashiguchi, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura  
Involvement of Wnt5a-Ror2 signaling in migration of oral squamous cell carcinoma cells through  $\Delta$ Np63 down-regulation  
The 28th Conference of the Taiwan Association of Oral and Maxillofacial Surgeons  
2016.03.05.  
台湾台中市
  5. Naoki Kaneko, Shintaro Kawano, **Ryota Matsubara**, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Yuichi Goto, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Ryoji Kitamura, Hideaki Tanaka, Seiji Nakamura  
Expression and function of kallikrein-related peptidase 6 in oral squamous cell carcinoma: the association with epithelial-mesenchymal transition mediated by  $\Delta$ Np63  
The 28th Conference of the Taiwan Association of Oral and Maxillofacial Surgeons  
2016.03.05.  
台湾台中市
  6. Yuma Hashiguchi, Shintaro Kawano, Yuichi Goto, **Ryota Matsubara**, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Naoki Kaneko, Taiki Sakamoto, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura  
A function of microRNA-205 associated with  $\Delta$ Np63 in oral squamous cell carcinoma  
The 28th Conference of the Taiwan Association of Oral and Maxillofacial Surgeons  
2016.03.05.  
台湾台中市
  7. 坂本泰基, 川野真太郎, **松原良太**, 後藤雄一, 神野哲平, 丸瀬靖之, 金子直樹, 橋口有真, 大部一成, 中村誠司  
口腔扁平上皮癌における  $\Delta$ Np63 を介した浸潤・転移の分子機構に関する研究 ~ Wnt5a-Ror2 シグナル経路との関連 ~  
第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
2016.01.21.  
神奈川県横浜市
  8. Yasuyuki Maruse, Shintaro Kawano, **Ryota Matsubara**, Yuichi Goto, Teppei Jinno, Naoki Kaneko, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura  
PD-1/PD-L1 coexpression is associated with poor prognosis in the oral squamous cell carcinoma patients  
第 63 回国際歯科研究学会 (JADR) 総会・学術大会  
2015.10.30.  
福岡県福岡市
  9. Teppei Jinno, Shintaro Kawano, **Ryota Matsubara**, Yasuyuki Maruse, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Naoki Kaneko, Akiko Jinno, Masahiko Morioka, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura  
A study on the expression and function of interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma ~ its possible involvement in chemotherapeutic resistance ~  
第 39 回日本頭頸部癌学会 第 4 回アジア頭頸部癌学会  
2015.06.03.  
兵庫県神戸市

10. 丸瀬靖之、川野真太郎、後藤雄一、清島 保、**松原良太**、神野哲平、金子直樹、坂本泰基、橋口有真、大部一成、中村誠司  
口腔扁平上皮癌における共刺激分子 programmed cell death ligand 1 の発現と臨床病理学的所見に関する検討  
第 69 回日本口腔科学会学術集会  
2015.05.13.  
大阪府大阪市
11. 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、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 68 回日本口腔科学会学術集会  
2014.05.07.  
東京都新宿区

(4)研究協力者

( )

〔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・歯学研究院・助教  
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：