

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861923

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における細胞間接着分子の役割

研究課題名(英文) Role of the adhesion molecules between the cell in invasion, the metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

北原 寛子 (KITAHARA, HIROKO)

金沢大学・大学病院・医員

研究者番号：70507053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)： 癌の浸潤、転移は最も重要な特性であり、癌の浸潤を防ぐことが予後を左右すると思われる。そこで浸潤の初期段階におこる癌細胞間の接着機能の低下、上皮間葉移行(EMT)獲得に着目した。接着因子であるE-cadherinの抑制にて浸潤能、運動能の上昇が認められたことから、結合するbeta-cateninの発現変化を検討すると、核内での発現上昇が認められた。次に、悪性度によるEMTとの関係について検討すると、悪性度が強い細胞でRNA、タンパクの発現を検討した結果、悪性度の強い細胞ではEMTが獲得されている傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)： Invasion and the metastasis of cancer are the most important characteristics, and it is thought that it controls prognosis to prevent the invasion of cancer. Therefore I focus attention on the decrease of the adhesion function between the cancer cell for an initial stage of the invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT). In our previous studies, increase of migration and invasion ability was recognized by knockdown of E-cadherin. Thus we results to be considered altered expression of beta-catenin that binds to E-cadherin, increased in the nucleus was observed. Then, I examined relations with EMT by the malignancy. As a result of having examined expression of protein and RNA with the cell which a malignancy resisted, I recognized the tendency that EMT was acquired with the strong cell of the malignancy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔扁平上皮癌 E-cadherin 上皮間葉移行

### 1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤、転移は最も重要な特性の一つとしてあげられる。また、臨床病理学的に癌細胞の浸潤が転移と密接な関係にあり、転移は予後へと関係することが報告されている。癌細胞の原発巣から周囲組織に発育、進展していく過程において初期段階に癌細胞間の接着機能が低下し、細胞の離脱が生じ、周囲組織への浸潤が始まると考えられている。この癌細胞同士の接着の中心となっている分子に E-cadherin があげられる。細胞間接着において、E-cadherin 同士が結合し、細胞内では細胞骨格と接合する役割を catenin が担っている。なかでも  $\beta$ -catenin は E-cadherin に直接結合して、cadherin の発現に関与していると考えられている。諸臓器の癌において E-cadherin、 $\beta$ -catenin の発現消失または減弱が報告されており (Chow et al, J Cancer Res Clin Oncol, 2001) 浸潤、転移との関連が注目されている。これまでの研究において口腔扁平上皮癌の組織標本を用いて検討したところ E-cadherin、 $\beta$ -catenin の発現低下と転移、予後との間に関連が認められた。また、細胞接着と浸潤との関連を解明するため、E-cadherin に着目し、培養細胞を用いて E-cadherin と癌細胞の浸潤能、運動能について研究を行ったところ E-cadherin 遺伝子を抑制することにより癌細胞の浸潤能、運動能の上昇が認められた。そこで E-cadherin の発現抑制後の細胞の変化を検討するため結合タンパク質である  $\beta$ -catenin に注目して研究を行うこととした。また、細胞間接着に関与しない  $\beta$ -catenin は、核内へ移行、転写因子に作用し増殖促進や上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) を誘導すると考えられている。EMT の獲得は運動性の亢進などをもたらすことから、癌の浸潤との関連も示唆される。また、EMT 獲得には E-cadherin の発現が大きく関与していると考えられている。上皮性細胞の特徴として E-cadherin の発現が大きな特徴と言える。間葉系細胞に移行する際に E-cadherin から N-cadherin へ発現が変化するともいわれている。そこで細胞間接着と浸潤との関係を検討するために EMT に着目し癌浸潤様式との関係について検討することとした。また、E-cadherin の発現の調節に関与する因子として Snail, Twist などの転写因子にも着目し同様に発現について検討することとした。

### 2. 研究の目的

これまでに口腔扁平上皮癌の患者の生検時の組織標本を用いて E-cadherin、 $\beta$ -catenin 免疫組織化学染色を行った結果では E-cadherin、 $\beta$ -catenin とともに低分化症例程陽性率が低く、癌浸潤様式との関係では高い浸潤性を示す症例ほど陽性率は低くなる傾向を示した。また、再発症例、転移症例においても発現が低下し、5 年累積生存率では非

減弱型 (陽性率 70%未満) で生存率は有意に高く、特に E-cadherin の発現と癌浸潤様式が予後に影響していることが認められた。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用い、各細胞の E-cadherin の RNA、タンパク質の発現を検討したところ、浸潤性の高い細胞程 E-cadherin の発現は低くなり、浸潤様式と E-cadherin との関連が認められた。そこで、E-cadherin の抑制実験をおこなったところ、抑制後の浸潤能、運動能が高くなる傾向が認められた。

この結果を踏まえ、E-cadherin の発現が癌の浸潤や転移に重要な因子であることをさらに深く検討するため、E-cadherin の発現の有無により生じる細胞の変化を検討することとした。細胞内での変化を解明するため、注目したのが細胞内で直接結合している  $\beta$ -catenin である。siRNA を導入することで E-cadherin を発現抑制させ、細胞内での  $\beta$ -catenin の発現について検討する。RNA の発現、また  $\beta$ -catenin は発現部位により EMT の進行へ影響を与えられられるため、タンパク質の発現は細胞膜、細胞質、核にわけてそれぞれの発現を検討する。また、EMT についても注目し、検討したいと考えている。各細胞の EMT 進行を確認、EMT の誘導因子についても検討する。上皮系マーカー、間葉系マーカーの発現を浸潤様式別に検討し、浸潤様式と EMT の進行について検討。また、E-cadherin に作用し EMT を促進させると思われる snail、Twist の発現について検討する。以上のように細胞間接着分子に着目し、それらの役割と EMT との関係について詳細に検討してゆき、癌細胞の浸潤機序の始まりについて解明してゆく。

### 3. 研究の方法

細胞株：癌浸潤様式 (山本・小浜分類) に基づいた系統的研究の中でその由来が明確なヒト口腔扁平上皮癌細胞株、山本・小浜分類浸潤様式 3 型細胞：OSC-20 細胞、HSC-2 細胞、HSC-4 細胞、4C 型細胞：OSC-19 細胞、OBC-01 細胞、OTC-04 細胞、4D 型：HOC313 細胞、TSU 細胞、OLC01 細胞を用いる。

細胞培養：各細胞株は 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した最小必要培地 MEM (SIGMA) にて 5%CO<sub>2</sub>、37 °C の条件下で培養する。

siRNA 導入：E-cadherin をターゲットとした mRNA を標的として siRNA (QIAGEN) を合成、精製し、各細胞に導入する。導入には Hyperfect Transfection Reagent (QIAGEN) を使用する。サブコンフルエント (70~80%) に培養した各細胞に Hyperfect Transfection Reagent を混和させた、濃度 5mM の siRNA を添加、均一に分布させ、24 時間インキュベートさせることにより E-cadherin の発現の抑制を行う。抑制の確認

には real-time RT-PCR を用いる。抑制実験のコントロールとしては nonsense siRNA を用い、internal control としては  $\beta$ -actin を用いる。

RNA 抽出および real-time RT-PCR 法: 各細胞の RNA の抽出は Pure Link RNA Mini Kit を用いて抽出する。抽出された RNA より first-strand cDNA を合成する。RNA の発現は蛍光プローブを用いた TaqMan プローブ法による real-time RT-PCR 比較 Ct 法を用いて定量し検討する。

タンパク質抽出および Western blotting 法: 各細胞に M-Per (Thermo) を用いてタンパク質を抽出する。 $\beta$ -catenin においては細胞膜、細胞質、核とそれぞれのタンパク質を抽出したいため、NE-PER (Thermo) を用いて細胞膜、細胞質のタンパク質を、MEM-PER (Thermo) を用いて核のタンパク質をそれぞれ抽出する。抽出したタンパク質より Western blotting 法にて検出する。次に SDS-PAGE, 電気泳動終了後、タンパク質を PVDF 膜に転写する。免疫組織化学的染色を行い、ECL-Western Blotting Analysis system にて各細胞のタンパク質の発現を可視化し、判定療法を用いて各種タンパク質の発現を比較検討する。

E-cadherin の発現が強く、siRNA にて E-cadherin の発現抑制されることが確認済みである、山本・小浜分類浸潤様式 3 型細胞 (OSC-20 細胞) 4C 型細胞 (OSC-19 細胞) に対し siRNA を導入することにより E-cadherin の発現を抑制させる。E-cadherin が抑制された各細胞を用い  $\beta$ -catenin のタンパク質、RNA の発現をそれぞれ比較検討する。 $\beta$ -catenin のタンパク質の発現は、細胞膜、細胞質、核にそれぞれ認められるため、各細胞のタンパク質の発現部位、また E-cadherin 抑制によって発現部位に変化が認められるかを検討する。また、EMT に関し、上皮系マーカーとして E-cadherin、間葉系マーカーとして Vimentin、N-cadherin の発現を検討。検討するために山本・小浜分類浸潤様式 3 型細胞、4C 型細胞、4D 型、各細胞における RNA の発現について検討し、各細胞に EMT が生じているかを検討する。RNA の発現 real-time RT-PCR 法にて発現を比較検討する。

#### 4. 研究成果

(1) E-cadherin 抑制後の  $\beta$ -catenin の発現 E-cadherin 抑制前に各細胞の  $\beta$ -catenin の発現を検討したところ、細胞による差は認められなかった。siRNA 導入にて E-cadherin を抑制したが、コントロール群と siRNA 群の RNA は、ほとんど発現量に変化が認められなかった。次にタンパク質の発現を解析した。各細胞の細胞膜、細胞質、核の発現量

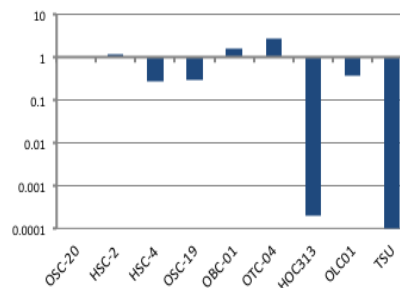
を比較したところ、HOC313 細胞の核で OSC-20 細胞、OSC-19 細胞と比較し発現が強く認められた。次に siRNA による抑制をおこない検討した結果、OSC-20 細胞では細胞核で siRNA 群に発現上昇を認めた。OSC-19 細胞では細胞質、核で発現の上昇が認められた。これらの結果より E-cadherin が低い細胞では  $\beta$ -catenin は核へ移行する傾向があるのではないかと考えられた。

#### (2) 浸潤様式と上皮間葉移行

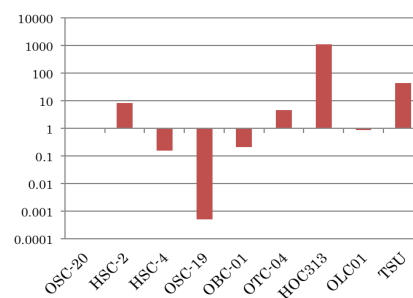
EMT 関連マーカーのタンパク質の発現を各細胞で調べたところ浸潤様式 4D 型 HOC313 細胞、TSU 細胞にてその他の細胞と比較し、E-cadherin の発現が低く、Vimentin、snail の発現が強く認められた。次に RNA の発現を検討した結果 OSC-20 細胞を基準の 1 として他細胞を比較したところ 4D 型である HOC313 細胞 TSU 細胞では E-cadherin が高く、Vimentin の発現が低く認められ、特に HOC313 細胞は N-cadherin の発現も高く認められた (図 1)。

図 1 RNA の発現

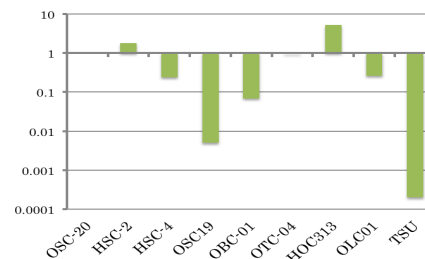
E-cadherin



Vimentin



N-cadherin



次に転写因子である Snail、Twist の発現にても検討した結果 HOC313 細胞では

Snial、Twist 共に高くなり E-cadherin とのは逆の発現を認めた。これらの結果より浸潤様式 4D 型細胞(HOC313 細胞、TSU 細胞)では EMT 獲得傾向にあり、間葉系細胞の性質を獲得しているものが多いと思われるが、3 型、4C 型細胞は上皮系細胞の性質を持つものが多く認められた。

#### 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)

M Yanase, K Kato, K Yoshizawa, N Noguchi, H Kitahara, H nakamura Prognostic value of vascular endothelial growth factors A and C in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 査読有 43 2014 514-520 DOI:10.1111/jop.12167

K Yoshizawa, S Nozaki, A Kato, M Hirai, M Yanase, T Yoshimoto, I Kimura, S Sugiura, A Okamune, H Kitahara, N Noguchi, K Kato, K Ueki, S Kawashiri, Loss of claudin-7 is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. Oncology report 査読有 29 2013 445-50 DOI:10.3892/or 2012.2161

[学会発表](計 7 件)

加藤阿希、吉澤邦夫、吉本泰祐、北原寛子、加藤広祿、野口夏代、中村博幸、川尻秀一 口腔扁平上皮癌における Focal adhesion kinase(FAK)発現の臨床病理学的意義 第 51 回口腔組織培養学会学術大会 2014 年 11 月 15 日 九州歯科大学講堂(福岡)

平井真理子、野口夏代、加藤広祿、北原寛子、木村依世、中村博幸、川尻秀一 口腔扁平上皮癌における Bevacizumab の抗腫瘍効果の実験的検討 第 59 回日本口腔外科学会学術大会 2014 年 10 月 17-19 日 幕張メッセ(千葉)

吉澤邦夫、能崎晋一、柳瀬瑞希、木村依世、北原寛子、野口夏代、加藤広祿、中村博幸、川尻秀一 第 38 回日本頭頸部癌学会総会 2014 年 6 月 12-13 日 東京ファッションタウンビル(東京)

K yoshizawa, H kitahara, N Noguchi, H nakamura, S kawashiri Expression of various canceration related proteins on highly invasive oral squamous cell carcinoma showing type4D 6<sup>th</sup> European Congress on Head and Neck Oncology 2014 年 4 月 24-26 日

Liverpool

加藤広祿、平井真理子、加藤阿希、木村依世、柳瀬瑞希、杉浦史郎、岡宗絢子、北原寛子、野口夏代、吉澤邦夫、中村博幸、川尻秀一 口腔扁平上皮癌における Caveolin-1 発現に関する免疫組織学的検討 第 58 回日本口腔外科学会総会学術大会 2013 年 10 月 11-13 日 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡(福岡)

吉澤邦夫、北原寛子、野口夏代、加藤広祿、中村博幸、川尻秀一 口腔扁平上皮癌浸潤様式 4D 型におけるがん悪性化に関わる各遺伝子発現についての検討 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013 年 6 月 13-14 日 京王プラザ(東京)

柳瀬瑞希、加藤広祿、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、川尻秀一 口腔扁平上皮癌における VEGF-A および VEGF-C 発現の免疫組織学的検討 第 67 回日本口腔外科学会学術大会 2013 年 5 月 22-24 日 栃木県総合文化センター(栃木)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

北原 寛子(KITAHARA, Hiroko)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：70507053