

論文要約

平成 18 年入学

医歯学総合研究科先進治療科学専攻

研究分野 感覚器病学講座皮膚科学

氏 名 下川 充芳

【タイトル】

The transcription factor Snail expressed in cutaneous squamous cell carcinoma induces epithelial-mesenchymal transition and down-regulates COX-2

転写因子 Snail は皮膚扁平上皮癌細胞株に epithelial-mesenchymal transition (EMT) を誘導し COX-2 を抑制する。

【序論および目的】

紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌は稀だが非常に悪性度の高い皮膚癌で、角化傾向を示さず紡錘形の細胞がびまん性に増殖する特徴を有し、皮膚扁平上皮癌が Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT: 上皮-間葉移行) を起こして生じる可能性が考えられる。EMT とは上皮細胞が間葉系様細胞に形態的及び機能的に変化する現象であり、個体発生における原腸陥入や器官形成、創傷治癒、癌の浸潤・転移などの過程で観察される。EMT を起こした細胞では、上皮系から間葉系への発現マーカーの変化やアクチンストレスファイバーの再構築が誘導され、運動能や浸潤能が著しく亢進する。EMT を誘導する代表的な転写因子のひとつが Snail である。私たちはこれまでに皮膚扁平上皮の分化・発癌に cyclooxygenase-2 (COX-2) が深く関与していることを明らかにしてきた。紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌と通常の皮膚扁平上皮癌における COX-2 の発現を免疫組織化学染色で観察したところ、紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌では COX-2 発現の減少が認められた。COX-2 は様々な癌で上昇していることが過去に報告されており、COX-2 の発現低下は想定外の結果であった。本研究の目的は COX-2 の発現低下と Snail との関連を明らかにするため、Snail の遺伝子導入により表皮ケラチノサイト細胞株 (HaCaT, A431, HSC5 細胞) に EMT を誘導し、COX-2 の転写制御機構に関し分子生物学的解析を行うことである。

【材料および方法】

鹿児島大学皮膚科で 1990 年から 2010 年に行われた手術症例より、紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌 6 例と皮膚扁平上皮癌 3 例を選び、免疫組織化学染色でタンパク発現に関し評価を行った。上皮系のマーカーの E-cadherin、間葉系のマーカーの Vimentin、Snail、また COX-2 の抗体を用い、avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 法にて染色し diaminobenzidine (DAB) による発色を行った。HaCaT 細胞、A431 細胞、HSC-5 細胞への Snail 発現ベクター (pC-SnailHA) の導入は、リン酸カルシウム法により行った。対照細胞株は Snail cDNA を含まない pCAGGSneo を細胞に導入して作成した。ベクター導入後、G418 存在下で培養を継続してクローンの選択を行った。各細胞株における Snail の発現量をウェスタンブロットで確認し、蛍光免疫染色で核内に Snail の発現が認められたクローンをその後の実験に使用した。各クローンでの E-cadherin、Vimentin、COX-2 の発現をウェスタンブロットにより確認した。COX-2 mRNA の発現は A431-Snail 細胞と A431-Neo 細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応後、RT-PCR により観察した。

COX-2 のプロモーター領域の解析は転写開始部位を+1 とした際、Snail の結合部位である E-box(CANNTG)4ヶ所を含む-1432 から+59 まで、E-box2ヶ所を含む -327 から+59 まで、E-box 1ヶ所を含む -134 から +59 までの3つの reporter plasmid を HEK293T 細胞にリポフェクタミン・プラス試薬を用いたリポフェクション法で導入し、デュアルルシフェラーゼアッセイにて、その発現を検討した。また同時に E-cadherin のプロモーター活性についても -178 から +66 までの reporter plasmid を用いて検討した。

【結果】

まず免疫組織化学染色によるヒト組織でのタンパク発現に関しては、通常の皮膚扁平上皮癌では上皮系マーカーである E-cadherin が発現しており間葉系マーカーである Vimentin、Snail の発現は認められなかった。紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌においては E-cadherin の細胞膜での発現が減少しており、Vimentin の細胞質での発現、Snail の核内での発現が認められた。COX-2 は通常の皮膚扁平上皮癌の細胞質で局所的に強い発現が認められたが、紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌では減少していた。

次に、ケラチノサイト系細胞(HaCaT,A431,HSC5 細胞)への Snail 発現ベクター導入の結果、安定して Snail を発現する細胞の形態は紡錘形に変化し、ウェスタンブロットにより E-cadherin の発現減少と Vimentin の増加と共に、COX-2 の減少が認められた。COX-2 の mRNA の発現も抑制される事が Snail 発現 A431 細胞において RT-PCR で認められた。

COX-2 のプロモーター領域の解析では E-box4ヶ所を含む (-1432/+59) reporter plasmid の導入時に Snail によるプロモーター活性の低下が認められ、同時に E-cadherin のプロモーター活性も低下が認められた。異なるサイズのプロモーター領域を持つレポーターを使った実験の結果、E-box2ヶ所を含む(-327/+59) reporter plasmid では Snail による抑制が認められたが、E-box1ヶ所を含む(-134/+59) reporter plasmid では著しい抑制は認められなかった。従って -327 と-134 の間にある E-box (-188 to -183)に Snail が結合していると考えられた。

【結論及び考察】

本研究において紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌では上皮系マーカーである E-cadherin の細胞膜での発現減少と間葉系マーカーである Vimentin の細胞質での発現、Snail の核内での発現が認められたことより、通常の皮膚扁平上皮癌が EMT を起こし紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌が生じることが示唆された。ケラチノサイト系細胞への Snail 遺伝子導入で EMT が誘導されたことはそれを強く支持する結果と考えられる。新たに得られた知見としては、Snail によって EMT を誘導した細胞では、COX-2 の発現が mRNA、タンパクレベルで抑制されることが確認された。また COX-2 のプロモーター解析で、Snail は-188 to -183 の E-box に結合して COX-2 のプロモーター活性を低下させていることが明らかとなった。これまでの過去の報告では、Snail によって COX-2 の発現は増強されるとされてきたが、本研究において COX-2 の発現は Snail によって抑制される事が明らかになった。過去の報告との解離に関しては、使用しているベクターの違いによる影響が考えられ、我々の使用した HA タグを用いたベクターは Snail が E-cadherin のプロモーター活性を低下させる際に必要なヒストンデアセチラーゼや補助抑制因子である mSin3A、Snail の補助活性化因子である CtBP や p300 などの結合への影響がより少ない可能性が考えられる。COX-2 の代謝産物である PGE₂ に関し肺線維症の進行を抑えるとの報告や、腎尿細管上皮細胞で EMT を抑制するとの報告があり、本研究の結果と矛盾しないものと考えられた。

(Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 430, Issue 3, 18 January, 2013:1078-1082 掲載)