

論 文 要 旨

The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells

転写因子 Snail は口腔扁平上皮癌細胞において E-カドヘリンと Desmoglein 2 の分解を亢進する

久 米 健 一

【序論および目的】

近年、癌細胞が浸潤転移を行う際に、転写因子 Snail の発現が上昇した結果、間葉系性質を獲得する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition ; EMT) が起こっていることが明らかにされてきた。もともと Snail は発生初期に外胚葉細胞が遊走能を持つようになり中胚葉を合成する際に発現が多くみられるタンパクである。口腔癌に限らず、様々な固形癌において浸潤転移を起こすものほど予後が悪いことが言われているが、その詳細な機序は解明されていない。この機序を解明することは患者生存率を上昇させる上で必要であると考えられる。

今回われわれは、口腔扁平上皮癌細胞株 (OSCC 細胞株) である HSC-4 細胞に遺伝子導入し、Snail を発現させた Snail/HSC-4 細胞を新規に樹立、その挙動を分析し、OSCC 細胞株が EMT 性質を獲得し浸潤転移能を亢進する機序を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

- OSCC 細胞株である HSC-4 細胞に、ヘマグルチニン(HA)で標識した Snail 発現ベクターを導入し、Snail 強制発現 HSC-4 細胞(Snail/HSC-4 細胞)を新規に樹立した。コントロールとして HSC-4 細胞に HA で標識した GFP 発現ベクターを導入した GFP/HSC-4 細胞を作製した。これらの細胞を用いて、細胞形態、遊走能(Wound healing assay)、浸潤能(invasion assay)について比較した。
- HSC-4 細胞、GFP/HSC-4 細胞、Snail/HSC-4 細胞に対して、E-カドヘリン、desmoglein 2 などの上皮系マーカーと N-カドヘリン、vimentin などの間葉系マーカーの発現変化を蛍光免疫染色法、免疫ブロット法、RT-PCR 法を用いて比較した。また、HSC-4 細胞と Snail/HSC-4 細胞に対しては同じ上皮系マーカーと間葉系マーカーの発現変化について DNA マイクロアレイ法を用いて比較した。
- Snail/HSC-4 細胞での上皮系マーカーの挙動を調べるためにタンパク合成阻害剤である Cyclohexisimide を加えて、これらのマーカーの経時的な発現量の変化と局在の変化をそれぞれ免疫ブロット法と蛍光免疫染色法を用いて解析した。また、これらのマーカーはエンドサイトーシスによって分解されていることを調べるために dynamin 阻害剤である dynasore 処理を行い免疫ブロット法を施行した。
- Snail は transforming growth factor(TGF)経路の下流で働くタンパクであることが報告されていることから、TGF- β 刺激による HSC-4 細胞の変化を RT-PCR 分析を用いて調べた。

【結果】

1. HSC-4 細胞や GFP/HSC-4 細胞は上皮細胞様の多角形の敷石状形態であったが、Snail/HSC-4 細胞では紡錘形へ形態変化した。また、HSC-4 細胞と比較して Snail/HSC-4 細胞では、遊走能・浸潤能の亢進が見られ、Snail/HSC-4 細胞では約 7.6 倍も浸潤細胞数が多かった。
2. 免疫染色では、Snail/HSC-4 細胞では上皮系マーカーである E-カドヘリンや Desmoglein 2 の発現低下、間葉系マーカーである N-カドヘリンや vimentin の発現上昇が見られた。免疫プロット分析、RT-PCR 分析、DNA マイクロアレイ分析でも上皮系マーカーの発現が低下し、間葉系マーカーの発現が上昇するという同様の結果が得られた。
3. タンパク合成阻害剤(cycloheximide)を加えて、免疫プロット分析を行ったところ、Snail/HSC-4 細胞では、E-カドヘリンと Desmoglein 2 の発現が経時的に減少していた。また、免疫染色による細胞の取り込み実験では、Snail/HSC-4 細胞では E-カドヘリンや Desmoglein 2 のエンドサイトーシスが亢進していた。さらに dynamin 阻害剤である dynasore を加えた実験を行ったところ、E-カドヘリンは dynamin 依存性経路によるエンドサイトーシスが起っていたが、Desmoglein 2 は dynamin 非依存性経路によるエンドサイトーシスが起っていたことが分かった。
4. HSC-4 細胞に対し、TGF- β のみを加えると、細胞表面の E-カドヘリンは減少し、TGF- β と dynasore を同時に加えると細胞表面の E-カドヘリンの減少が抑制された。

【結論及び考察】

今回の研究では、ヒト OSCC 細胞株である HSC-4 細胞において Snail の過剰発現させると EMT の性質に変化することが示された。従来、EMT への変化では Snail はカドヘリンのプロモーターに結合してその転写を抑制し、mRNA レベルで発現を抑制することが言われてきた。しかし、今回われわれの実験結果から、HSC-4 細胞において、Snail は E-カドヘリンや Desmoglein 2 の mRNA 発現を完全には抑制せずに、それらのタンパクの細胞内への取り込みを亢進する事によって分解速度が上昇し、遊走・浸潤能を上昇させていることが分かった。さらに、E-カドヘリンは dynamin 依存性経路、Desmoglein 2 は dynamin 非依存性経路を通じてエンドサイトーシスが起っていることも分かった。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 236 号	学位申請者	久米 健一
審査委員	主査	杉原 一正	学位
	副査	松口 徹也	副査
	副査	小松澤 均	副査
			博士 (歯学)
			古川 龍彦
			佐藤 強志

The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells

(転写因子 Snail は口腔扁平上皮癌細胞において E-カドヘリンとデスモグレイン 2 の分解を亢進する)

口腔扁平上皮癌患者においてリンパ節転移の有無は生存率を最も左右する因子である。しかし、癌細胞が原発巣から浸潤・転移を起こす詳細なメカニズムについてその詳細は明らかでないため、学位申請者らはこのメカニズムを解明することを目的に、舌扁平上皮癌 (以下 OSCC) 由来である HSC-4 細胞株を用いて解析を行った。癌細胞が原発巣から浸潤・転移を起こす際に上皮間葉転換 (以下 EMT) を起こすことが知られており、転写因子 Snail がカドヘリン遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を抑制することが報告されている。そこで、われわれは HSC-4 細胞に Snail 遺伝子を導入した細胞 (Snail/HSC-4 細胞) を樹立し、HSC-4 細胞と Snail/HSC-4 細胞について細胞形態、遊走能、浸潤能の比較と RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、DNA マイクロアレイ法を用いた上皮系マーカーと間葉系マーカーの発現の比較、ならびに細胞膜タンパクの安定性やその取り込み速度の比較を行った。

その結果、Snail/HSC-4 細胞では以下の知見が明らかにされた。

- 1) 上皮様の多角形形態から間葉系の紡錘形形態への変化、遊走能の亢進、浸潤能の亢進がみられた。
- 2) mRNA レベルでもタンパクレベルでも、上皮系マーカーである E-カドヘリンやデスモグレイン 2 の発現が低下し、間葉系マーカーである N-カドヘリンやピメンチンの発現が上昇していた。
- 3) Snail はカドヘリンファミリーの転写を部分的に抑制すると同時に、E-カドヘリンのダイナミン依存性経路によるエンドサイトーシス、ならびにデスモグレイン 2 のダイナミン非依存性経路によるエンドサイトーシスを亢進させ、これらの分解を早めていた。

本研究は OSCC 細胞株である HSC-4 細胞に、転写因子 Snail を導入した Snail/HSC-4 細胞を樹立し、Snail が引き起こした変化について検討した。過去の多くの報告で、Snail はカドヘリンファミリーのプロモーターに結合、クロマチン構造を変化させて転写を抑制するといわれてきた。しかし、本研究により HSC-4 細胞において Snail は、カドヘリンファミリーの転写を一部抑制することに加えて、これらのファミリーのエンドサイトーシスを亢進し、分解も亢進していることを示した。さらに Snail によるエンドサイトーシスの亢進が E-カドヘリンの場合はダイナミン依存性経路、デスモグレイン 2 の場合はダイナミン非依存性経路の亢進によることも明らかにした。これらの成果は、今後の口腔癌の転移メカニズムの解明に役立つものと思われる。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 236 号		学位申請者	久米 健一
審査委員	主査	杉原 一正	学位	博士 (歯学)
	副査	松口 徹也	副査	古川 龍彦
	副査	小松澤 均	副査	佐藤 強志
<p>主査および副査の5名は、平成 25年 2月 7日、学位申請者 久米 健一 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) この研究によって判明した新たな知見は何になるのか。 (回答) Snail の作用が、E-カドヘリンやデスモグレイン2の転写抑制だけでなく、これらの分子の細胞内への取り込み (エンドサイトーシス) を上昇させ、分解を亢進させることを明らかにした点である。</p> <p>質問2) 実際の癌組織の中で、間葉系細胞へと移行しているものはだいたい何%位になるか。 (回答) 臨床検体を染色していないので詳しい数値を持ちあわせているわけではないが、多くの論文では、N-カドヘリンやビメンチンなどの間葉系マーカーの発現が上昇しているものが多いと報告されている。</p> <p>質問3) EMT を起こした細胞が逆の方向へすすむことがあるのか。 (回答) 生体内では起こり得ることであると思われる。転移した細胞が遠隔臓器へ辿り着き、そこで定着するためには EMT とは逆の反応が起こることが必要であるという事が最近報告された。</p> <p>質問4) EMT が過度に起こった場合、転移細胞のオリジンを同定するためには転移先で上皮の性質を得なければならないか。 (回答) そうだと考える。但し、一度形を変えたものが元に戻ろうとしても同じものに戻れるかは分からない。</p> <p>質問5) 上皮系の細胞では転移して定着するには基底膜に結合する必要があるが、基底膜との関係はどうなっているのか。 (回答) 細胞と基底膜との結合は、インテグリンというタンパクによっておこる。遠隔臓器で基底膜に定着するためには、インテグリンが先に発現する必要がある。詳細な解析はしていないが、マイクロアレイの結果は、インテグリンの発現も変化していることを示唆していた。なお、本研究でみている E-カドヘリンやデスモグレインは細胞同士の接着因子であり、直接基底膜と結合するものではない。</p> <p>質問6) 上皮系の腫瘍はリンパ行性転移が多く、間葉系の腫瘍は血行性の転移が多いが、これらと接着因子の関連性についてはどうか。 (回答) 腫瘍自らリンパ管や血管を新生して転移しやすい環境を作ると言われている。血管やリンパ管の新生には VEGF タンパクが必要であるが、本研究でも Snail 発現細胞では、リンパ管新生に必要な VEGF-C の発現が上昇していることより、より転移しやすい環境を作っていると思われる。</p> <p>質問7) 遺伝子導入を行った時、複数の Cell line を取っていると思うが、一つ一つの line について検索をしているか。それぞれの line について形態が spindle に変化したものの中では Snail の発現に変化があったか。 (回答) まず、HSC-2 と HSC-4 という別の細胞株も調べたが、細胞増殖が遅いなど実験を行う上で、障害となる因子が少ないものは HSC-4 細胞であったため、この細胞 HSC-4 を使用した。Snail あるいは GFP を導入した細胞はそれぞれにつき3クローンを単離し解析を行ったが、クローン間での性質のバラツキは認められなかった。また、形態が明らかに変わっているものについては Snail 発現に大きな差はなかった。</p> <p>質問8) Snail の over expression によってN-カドヘリンなどの間葉系マーカーがたくさん細胞膜上に出ていく経路についてはどうか。 (回答) 今回の実験では上皮マーカーの取り込みについての実験であったので、間葉系マーカーの発現増加についての詳細は分からないが、RT-PCR の結果は転写が亢進した結果、これらのタンパク質の量が増加したことを示している。</p> <p>質問9) Snail 結合塩基配列のコンセンサス配列は分かっているのか。また、コンセンサス配列に結合する Snail 以外の分子は多くあるのか。 (回答) Snail が結合する塩基配列は分かっているし、ひとつの遺伝子にいくつかある場合もあると考えられる。それ以外の分子としては、Slug や Twist がある。</p> <p>質問10) DNA アレイはどのくらいの遺伝子について解析したのか。Snail 非発現株と発現株での比較はどうか。他の因子についてはコンセンサス配列とは一致があったのか。 (回答) すべての遺伝子を網羅した。3万4千あまりの遺伝子について行った。網羅的に解析は行ったが、遺伝子の塩基配列に関しては詳細は見えていない。但し、Snail の導入でいわゆる上皮系マーカーは低下しているものが多く、間葉系マーカーは上昇しているものが多かった。また、細胞外マトリックスを溶解する MMP は発現上昇が見られ、TGF-β 受容体も発現が増えていた。</p>				

最終試験の結果の要旨

- 質問 1 1) スクラッチアッセイをする細胞では、増殖速度がだいたい同じくらいであることが前提条件であるが、今回の細胞では増殖はどうか。
 (回答) きちんと doubling time の測定は行っていないが、HSC-4 細胞は約 24 時間で 2 倍、GFP-HA 細胞も同程度の増殖で、Snail/HSC-4 は約 48 時間で 2 倍になる。したがって、スクラッチアッセイの違いは増殖速度の違いでは説明できない。
- 質問 1 2) 遺伝子を導入した細胞で増殖が悪くなるのは一般的なのか。それとも Snail に特異的なのか。
 (回答) Snail を導入した別の細胞でも増殖の低下が見られていて、GFP を導入しても増殖の低下は認められない。したがって、Snail に特異的であると考えられる。
- 質問 1 3) エンドサイトーシスが起る契機としてはどのようなものが考えられるか。
 (回答) Snail の直接の関与なのか、間接の関与なのかは分からないが、考えられる理由にカドヘリンのリン酸化であるとか、細胞内のアダプタータンパクが集合できずに、結果カドヘリンの機能が悪化することは考えられる。
- 質問 1 4) ダイナミン非依存性のエンドサイトーシスについてどんなものがあるのか。
 (回答) エンドソームを構成するのにクラスリンというタンパクが働き、細胞膜とエンドソームを切り離すのにダイナミンが働くと考えられている。他のタンパクによるエンドソームの形成には、カベオリンというタンパクが働くと言われている。
- 質問 1 5) 今回の研究の臨床応用についてはどのような研究を予定しているか。
 (回答) 原発巣の癌細胞と転移巣の癌細胞が同一の性質を持つものであるのかを遺伝的に解析したいと考えている。
- 質問 1 6) 上皮から間葉への変化がおこる最初のステップは TGF- β で説明可能か。
 (回答) 最も大きな因子としては TGF- β が最初の引き金になると思うが、実際の癌組織では、増殖が早いので、低酸素や低栄養環境下に陥りやすい。例えば、そこでは HIF-1 などのタンパクによって Snail の発現を促進することも考えられる。
- 質問 1 7) MET を起こす際に、どのような経路で Snail 発現が低下するのか。
 (回答) MET の機構自体がよくわかっていないので、今後の課題であると考えるが、TGF- β にもファミリー分子が多く存在し、MET に働く分子があるという報告もある。
- 質問 1 8) 皮膚疾患でも Snail が関与するものが多いのか。
 (回答) 皮膚に出来るメラノーマではケラチノサイトでの Snail の発現により EMT が起こっているという報告がある。天疱瘡のような疾患でも細胞間の接着性が著しく低下するが、この場合にはデスモグレインに対する自己抗体ができて、病変が引き起こされることが報告されている。
- 質問 1 9) EMT を誘導するのは Snail 以外にどんなものがあるのか。
 (回答) Snail ファミリーの Slug や別のファミリーの Twist 等が EMT を誘導する。
- 質問 2 0) Snail 発現細胞でデスモグレイン 2 だけなのか。他にも下がっているファミリーがあるのか。下がっているものにはコンセンサス配列があるのか。
 (回答) マイクロアレイの結果からは他のデスモグレインファミリーも低下していた。Snail のファミリーの Slug というタンパクも上昇が見られたので、このタンパクが働いている可能性もある。もちろんデスモグレイン分子にも E-カドヘリンと同じようにコンセンサス配列があるものと思われる。
- 質問 2 1) 一般的に粘膜ではデスモグレイン 1 と 2 が発現しているため、デスモグレイン 1 についてどうであったか。
 (回答) 市販の抗体で、免疫染色やウエスタンブロット解析に使える優れた抗体がなかったため、ウエスタンブロットは行っていないが、マイクロアレイではデスモグレイン 1 も Snail 発現株では低下していた。
- 質問 2 2) 癌細胞ではない正常上皮細胞に Snail を導入すると、今回のような結果が得られると考えられるか。
 (回答) イヌの正常腎上皮細胞である MDCK 細胞に Snail を導入した実験では、E-カドヘリンの発現がなくなり、EMT が誘導されることが報告されている。
- 質問 2 3) 論文では親株に TGF- β 処理した実験も行っていたが、Snail を発現した場合と細胞形態や遊走能、浸潤能に同じような結果が得られたか。
 (回答) 形態は紡錘形に変化した。遊走能、浸潤能は調べていないが、別のグループの報告によれば、おそらく同じような結果が得られたと考える。E-カドヘリンやデスモグレインの mRNA に関しては TGF- β 処理で低下していたことを確認している。
- 質問 2 4) TGF- β はさまざまな作用を持っており、一方でそのうちの一つの現象として起る Snail の upregulation が同じような表現型を取るのか。
 (回答) 御指摘の通り TGF- β はさまざまな機能を持っており、Snail はその下流の一つのタンパクにすぎない。しかし、観察された結果としては、細胞形態や接着因子の mRNA 発現に同じ様な変化が起きていた。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。