

総 説

ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 における細胞遊走・浸潤能に
関与する TGF- β 1 誘導性上皮間葉転換の分子機構加茂 政晴¹⁾, 齋藤 大嗣²⁾, 樋野 雅文²⁾, 千葉 高大²⁾, 山田 浩之²⁾, 石崎 明¹⁾¹⁾ 岩手医科大学化学講座細胞情報科学分野

(主任: 石崎 明 教授)

²⁾ 岩手医科大学口腔顎顔面再建学講座口腔外科分野

(主任: 山田 浩之 教授)

(受付: 2018年6月19日)

(受理: 2018年8月8日)

抄 録

口腔癌細胞の浸潤の基礎をなしている分子機構は、依然として明らかでない。この総説では、ヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) 細胞における TGF- β 1 により誘導された上皮間葉転換 (EMT) と、EMT 関連の遊走能と浸潤能に関する分子機構について解説する。まず TGF- β が hOSCC 細胞の上皮間葉転換 (EMT) を誘導し細胞遊走能および浸潤能を促進するかどうか調べた。6 種類の hOSCC 細胞の間で、Smad2 リン酸化と TGF- β の標的遺伝子の発現から HSC-4 細胞が TGF- β 1 に最も反応したことを示した。HSC-4 細胞では EMT 関連の転写因子である Slug の発現は TGF- β 1 刺激により上昇し、Slug のノックダウンにより間葉マーカーの発現及び細胞遊走を阻害された。また、TGF- β 1 刺激により細胞遊走に重要な働きを示す Focal adhesion kinase (FAK) を活性化する Integrin α 3 β 1 の結合タンパク質の発現が増大することが見出された。加えて、FAK 阻害剤が細胞遊走を抑制したことから、EMT 及び integrin α 3 β 1/FAK 経路を介した細胞遊走は、Slug により上方制御されていたことが判明した。

一方、TGF- β 1 刺激により matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) の発現上昇が見出され、浸潤能が MMP-1 のノックダウンにより阻害された。また、Slug のノックダウンは MMP-10 の発現を抑制した。従って、TGF- β 1 が Slug 依存的に MMP-10 の発現増大を介して HSC-4 細胞の浸潤を誘導することが示された。一方、Slug のノックダウンは Wnt-5b 発現を抑制した。加えて、Wnt-5b 刺激により MMP-10 の発現が増大することや、Wnt-5b のノックダウンによりこの細胞の浸潤能が抑制されることから、

Molecular mechanism of transforming growth factor- β 1-induced cell migration and invasion of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells
Masaharu KAMO¹⁾, Daishi SAITO²⁾, Masafumi HINO²⁾, Takahiro CHIBA²⁾, Hiroyuki YAMADA²⁾, and Akira ISHISAKI¹⁾

¹⁾ Division of Cellular Biosignal Sciences, Department of Biochemistry, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Akira ISHISAKI)

²⁾ Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Hiroyuki YAMADA)

¹⁾ 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Iwate 028-3694, Japan

²⁾ 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

¹⁾ 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1 (〒 028-3694)

²⁾ 岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒 020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 43 : 107-121, 2018

Wnt-5b を介したシグナルによる MMP-10 の発現増大と浸潤能の増大が示された。

これらの研究成果より, TGF- β 1 は Slug/ α 3 β 1/FAK や Slug/Wnt-5b/MMP-10 シグナル伝達系を介して hOSCC 細胞の遊走能や浸潤能を増大することが示唆された。

緒 言

ヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) は, よく知られた癌¹⁾である。高度に治療が発展しているにもかかわらず, OSCC で苦しんでいる患者は, 未だ予後不良と高い死亡率に直面している。実際のところ, hOSCC 浸潤と転移の機序は十分解明されていない。興味深いことに, 遺伝子発現プロファイリングは, 上皮間葉転換 (EMT) が高リスク頭頸部扁平上皮癌の特徴的な所見であることを示している²⁾。いくつかの hOSCC 細胞株は, *in vitro* での EMT や細胞遊走能として腫瘍形成のモデルとして用いられているが, TGF- β が分子レベルでどのように hOSCC 細胞の EMT に影響を及ぼすかについて調べた研究は少数しかない³⁾。特に, TGF- β により誘導された EMT または EMT に関連した hOSCC 細胞遊走能及び浸潤能の制御に関わる分子機構は, 明らかにされないままである。EMT については非常に多くの研究がなされており, 多くの優れた総説が存在するため⁴⁾, 本稿では網羅的な解説は行わない。本稿は, hOSCC 細胞における TGF- β 1 により誘導された EMT と, EMT 関連の遊走能と浸潤能に関する分子機構を示す最初の報告として, 我々が報告した3編の論文を基にして解説するものである^{5)~7)}。

1. TGF- β と EMT

トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) が上皮細胞の成長を阻害することはよく知られている⁸⁾。加えて, TGF- β は, 上皮細胞から細胞外基質 (ECM) タンパク質の分泌を一般に誘導する⁹⁾。TGF- β は, まず膜貫通のセリン/スレオニン・キナーゼである TGF- β II 型受容体 (T β R-II) と結合することによって, これを活性化して T β R-II キナーゼへと変化させる。こ

のキナーゼ活性を有する T β R-II は TGF- β I 型受容体 (T β R-I) とのヘテロ 4 量体複合体 (2 個の T β R-I と 2 個の T β R-II) を形成するとともに, T β R-I の細胞内ドメインをリン酸化することにより活性化して T β R-I キナーゼへと変化させる。この, T β R-I キナーゼは receptor-regulated Smads (R-Smads) のリン酸化を通して, 特異的な細胞内シグナル経路を媒介する。リン酸化された R-Smads は Smad4 と会合して核移行する。Smad 複合体は, 核において他の転写因子と転写性のコアクチベーターまたはコリプレッサーと協同して標的遺伝子の転写を制御する¹⁰⁾ (図6のまとめを参照のこと)。TGF- β シグナル伝達経路は, ヒト癌の進行において相反した役割を果たす。つまり, TGF- β は, 組織腫瘍化の初期には腫瘍増殖抑制因子として作用するが, 腫瘍化が進んだ組織では腫瘍細胞浸潤, 播種, 及び免疫回避のように, TGF- β は腫瘍の悪性化を促進する¹²⁾。このように癌化が進行中の組織において, TGF- β は上皮間葉転換 (EMT) の誘導を通して, 悪性転換と癌の増悪に関与している¹¹⁾。従って TGF- β に対する上皮組織の応答の両極性は, 癌化の段階に強く依存している⁹⁾。

EMT は分極した上皮細胞を間葉細胞表現型に変換するプロセスであり, 増強された運動性と浸潤性によって特徴づけられる¹¹⁾。加えて, EMT は細胞間接着の破壊, 頂底極性の損失, マトリックス・リモデリング, 及び運動性の増大と侵襲性を引き起こし, それによって腫瘍転移を促進する¹²⁾ (図1)。EMT は, 例えば E-cadherin や cytokeratin の発現抑制による上皮マーカーの減少, 及び N-cadherin と vimentin のような間葉マーカーの発現増大, 線維芽細胞様の運動性及びマトリックス分解酵素 (MMP) の発現などの浸潤表現型の獲得により特徴づけられる¹³⁾。加えて, E-cadherin により形成さ

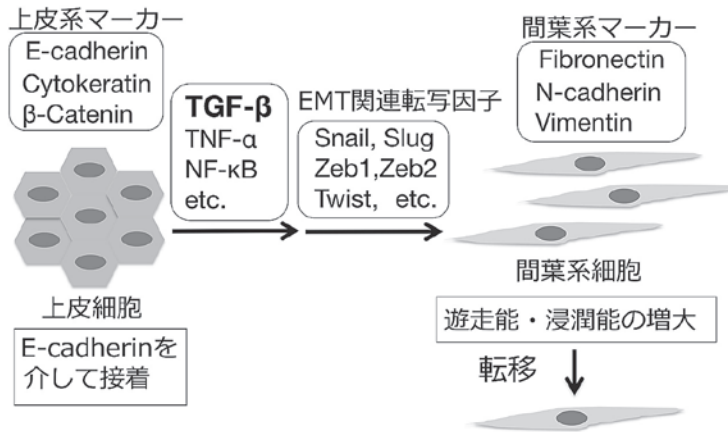


図1：腫瘍細胞の転移における上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition (EMT)) の機構

れる接着接合の破壊によって、細胞膜から細胞質への β -catenin の移行が起こる。 β -catenin は核に移行し、canonical Wnt シグナル伝達経路を介して遺伝子の転写促進を行う¹⁴⁾。このように、Wnt/ β -catenin 活性化は、EMT を引き起こすには不可欠な要素である¹⁵⁾。一方 TGF- β 、NF- κ B、Notch などを含む種々のシグナル伝達経路は、EMT に関与している¹⁶⁾。これらのシグナルに制御される多くの転写因子が EMT に関与することが知られており、例えば、Snail¹⁷⁾、Slug¹⁸⁾、及び Twist¹⁹⁾ などである。しかしながら、これらの転写因子の EMT における発現は、正常細胞、あるいは腫瘍細胞の種類により様々であることが知られている²⁰⁾、²¹⁾。また、EMT を誘導するサイトカインも腫瘍細胞の種類に依存することが知られているため¹⁶⁾、ヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) 細胞におけるシグナル伝達経路を明らかにすることは重要である。

2. EMT と ECM タンパク質

TGF- β により誘導された EMT により、いくつかの ECM タンパク質の発現が見られる²⁰⁾。Thrombospondine-1 (TSP-1) は、細胞-細胞間と細胞-マトリックス間相互作用を行う接着性糖タンパク質である²²⁾。Plasminogen 活性化システムは plasminogen activator inhibitor 1

(PAI-1, 別名 SERPINE1) により、負に調整を受ける。また PAI-1 は urokinase 型 plasminogen activator (uPA) と結合することによって、uPA の活性を阻害する²³⁾。TGF- β -inducible gene-h3 (β ig-h3, 別名 TGFBI) は、主要な TGF- β 応答遺伝子として知られる ECM タンパク質である²⁴⁾。Fibronectin は、EMT における TGF- β 誘導性の ECM タンパク質として認められている²⁵⁾。腫瘍生物学の最近の研究は、腫瘍組織に隣接した ECM が形作る腫瘍細胞の微小環境による複雑な作用が腫瘍発生及びその進行に重要な役割を担っていることを明らかにしている²⁶⁾。従って、腫瘍細胞と ECM 間の相互作用は、腫瘍細胞の EMT や細胞遊走能力や組織浸潤能力の獲得などの腫瘍の悪性化に必要な多くの点を制御するようである。また、MMP-2 や MMP-9 を含むいくつかの matrix metalloproteinase (MMP) は、腫瘍浸潤と転移のために重要な役割を果たすことが知られている²⁷⁾。加えて、TGF- β は、ECM 成分を消化するプロテアーゼの発現を刺激することによって、腫瘍細胞の浸潤を促進する。いくつかのタイプの MMP、例えば MMP-1, -3, -9 と -10 は、TGF- β 刺激により発現が増大する²⁸⁾。Stromlysin-2 としても知られる MMP-10 (EC3.4.24.22) は、IV 型 collagen, gelatin, elastin, fibronectin, laminin や

proteoglycan などを含む ECM タンパク質の分解, 及びプロ MMP-1, -7, -8, -9 と -13 の活性化行²⁹⁾. 特に, MMP-10 の異所性過剰発現は, hOSCC 細胞の浸潤を誘発することが報告されている³⁰⁾.

3. Wnt

Wnt 情報伝達経路は, 発生と癌にとって重要である³¹⁾. 糖タンパク質の Wnt ファミリーは, ヒトでは 19 種の Wnt リガンドから成る³²⁾. Wnt リガンドは, 10 種類の Frizzled (FDZ) 受容体, 低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 (LRP) 5/6 及び非定型受容体型チロシンキナーゼ (RTK) である PKT7, ROR2 や RYK などの膜結合型の受容体に結合する³³⁾. Wnt シグナル伝達系は, 大まかに 2 つの経路に分けられ, それらは β -catenin 依存的な “canonical” 経路と β -catenin 非依存的な “non-canonical” 経路である³⁴⁾. Canonical 経路では, Wnt リガンドが FDZ 受容体及び補助受容体 (LRP5/6) に結合することにより, 細胞質基質における β -catenin の安定化 (分解抑制効果) を誘導する. 細胞質基質の β -catenin は核に移行した後, T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) と結合して, 標的遺伝子の転写を引き起こす. 興味深いことに hOSCC 細胞の組織浸潤では, その浸潤先端部位の腫瘍細胞において, Wnt-3 の刺激により β -catenin が主として核に局在することが示された³⁵⁾. 一方, Wnt-5a³⁶⁾ と Wnt-5b³⁰⁾ は, non-canonical 経路のシグナル伝達を活性化するリガンドである. 気道平滑筋細胞では Wnt-5a のシグナル伝達は, TGF- β によって誘導されて ECM の産生を制御する³⁶⁾. この non-canonical 経路は, カルシウム経路と平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) 経路から成る. カルシウム経路では, 例えば calcineurin, Ca^{2+} /calmodulin 依存的なプロテインキナーゼ II (CaMKII) 及びプロテインキナーゼ C (PKC) のようなカルシウム依存性分子が活性化される. PCP 経路では, 低分子 Rho-GTP 加水分解酵素と c-Jun N 末端キナーゼ

(JNK) または Rho- キナーゼのシグナル伝達の活性化を含む³³⁾. 興味深いことに, Deraz らは, hOSCC において Wnt-5b が MMP-10 の発現を促進すると報告している³⁰⁾.

4. TGF- β に応答する hOSCC 細胞株の同定

我々は, まず TGF- β に応答する hOSCC 細胞株を同定するために, HO-1-N-1, HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS 及び OSC-19 株を用いて, TGF- β 1 刺激後, Smad2 のリン酸化, 及び TGF- β の標的遺伝子である Smad7, fibronectin と PAI-1 の遺伝子発現を調べた³⁷⁾. TGF- β 1 は, HSC-4 と SAS 細胞において Smad2 のリン酸化を明らかに誘導した⁵⁾. このうち, HSC-4 細胞が TGF- β 1 刺激に最も反応した⁵⁾. 加えて, HSC-4 細胞の TGF- β 1 刺激によるリン酸化は, 60 分で最大となり 3 時間まで続いた (図 2A). 一方, TGF- β 1 受容体阻害剤 SB431542 により, 明らかに抑制された (図 2B). 3 種類の標的遺伝子の発現レベルは, TGF- β 1 刺激後, HSC-4,

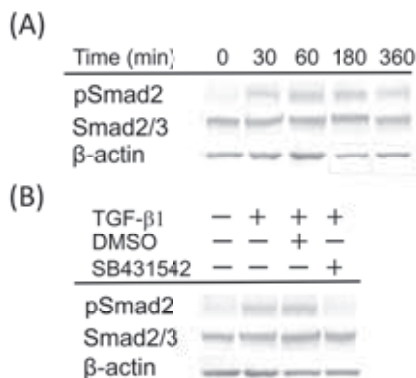


図2: HSC-4 細胞における TGF- β に対する応答

(A) HSC-4 細胞株において, ウェスタンブロット法による Smad2 のリン酸化 (P-Smad) を調べた. 10 ng/mL の TGF- β 1 で 360 分まで各時間で作用させた細胞を用いた. 細胞溶解液の β -actin をコントロールとして用いた. (B) HSC-4 細胞に 10 ng/mL の TGF- β 1 処理あり, または処理なしで 1 時間作用させた後, Smad2 のリン酸化レベルをウェスタンブロット法により分析した. 対照の細胞は, TGF- β 1 添加の 60 分前に DMSO または 10 μ M の SB431542 で処理した.

HO-1-N-1 及び SAS 細胞において明らかに発現上昇した⁵⁾。これらの結果により、HO-1-N-1、HSC-4 及び SAS 細胞は TGF- β 1 に応答する hOSCC 細胞であることが明らかとされた。また TGF- β 標的遺伝子の発現レベルの増加は、TGF- β 1 に SB431542 により抑制された^{5), 6)}。

5. hOSCC 細胞における EMT 関連マーカー発現に対する TGF- β 1 の効果

hOSCC 細胞における TGF- β 1 に対する応答性と TGF- β 1 誘導性 EMT の進行との間に相関性が認められるかを調べるために、RT-qPCR 法を用いて 4 で述べた 6 種類の細胞において、EMT 関連遺伝子の発現に対する TGF- β 1 の効果を調査した。TGF- β 1 による上皮マーカー E-cadherin ならびに cytokeratin 18 の発現抑制は、すべての hOSCC 細胞で観察されなかったが⁵⁾、間葉マーカー N-cadherin の発現誘導が、HSC-4 と SAS 細胞において認められた⁵⁾。また間葉マーカーの vimentin は、TGF- β 1 処理後 HSC-4 と HO-1-N-1 細胞で明らかにその発現が増大した⁵⁾。従って、HSC-4 細胞は TGF- β 1 に

よく応答して間葉マーカーを最も強く発現する hOSCC 細胞であった。

6. TGF- β 1 処理 HSC-4 細胞における EMT 関連のマーカー・タンパク質の発現と局在

TGF- β 1 刺激 HSC-4 細胞において、EMT マーカーのタンパク質レベルの発現を調べた。ウェスタンブロット法を用いて、N-cadherin と vimentin の発現レベルが TGF- β 1 処理後 48 時間で有意に上昇することが示された⁵⁾。しかしながら、E-cadherin と cytokeratin 18 の発現レベルは、TGF- β 1 によりほとんど影響を受けなかった⁵⁾。興味深いことに、免疫蛍光染色分析によると、TGF- β 1 で刺激された HSC-4 細胞の細胞表面の E-cadherin (図 3) と β -catenin が内部移行することが示された⁵⁾。EMT 進行中における E-cadherin の内部移行は、すでに報告されている³⁸⁾。さらに Chen らは、ヒト大腸癌細胞またはヒト前立腺癌細胞において、TGF- β 誘導 EMT 進行中に、TGF- β /Smad シグナル経路が E-cadherin と β -catenin の内部移行に関与していると報告した³⁹⁾。しかしながら、HSC-4 細胞において Smad2 が TGF- β により誘導された E-cadherin と β -catenin の内部移行を仲介するのは、明らかではない。一方免疫蛍光染色分析においても、間葉マーカーである N-cadherin と vimentin が TGF- β 処理 HSC-4 細胞において、発現することが示された (図 3)。

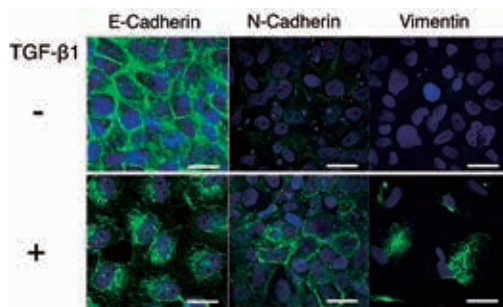


図 3 : TGF- β 1 処理 HSC-4 細胞における EMT 関連のマーカー・タンパク質の発現と局在

EMT 関連のマーカー・タンパク質の発現と局在を、蛍光免疫染色法を用いて調べた。HSC-4 細胞を 10 ng/mL の TGF- β 1 を含むまたは含まない無血清培地で 48 時間培養した後、共焦点顕微鏡を用いて観察した。上皮マーカーの検出には抗 E-cadherin 抗体、及び間葉マーカーの検出には抗 N-cadherin と抗 vimentin 抗体を用いて、細胞を蛍光免疫染色した後、核を DAPI で染色した。スケール・バーは、25 μ m を示す。

7. Slug による HSC-4 細胞における TGF- β 1 誘導性 EMT の制御

TGF- β が hOSCC 細胞において、上皮マーカーの発現抑制、間葉マーカーの発現誘導、及び EMT 関連転写因子の発現増加に特徴付けられる EMT を誘導することはすでに報告されている³⁾。また、種々の転写因子が様々な細胞において EMT に関連している^{17)~21)}。しかしながら、hOSCC 細胞においてどの EMT 関連転写因子が EMT マーカーの表現にどのように影響するかの詳細は、明らかにされていない。そこで、qRT-PCR 法を用いて、TGF- β 1 刺激された

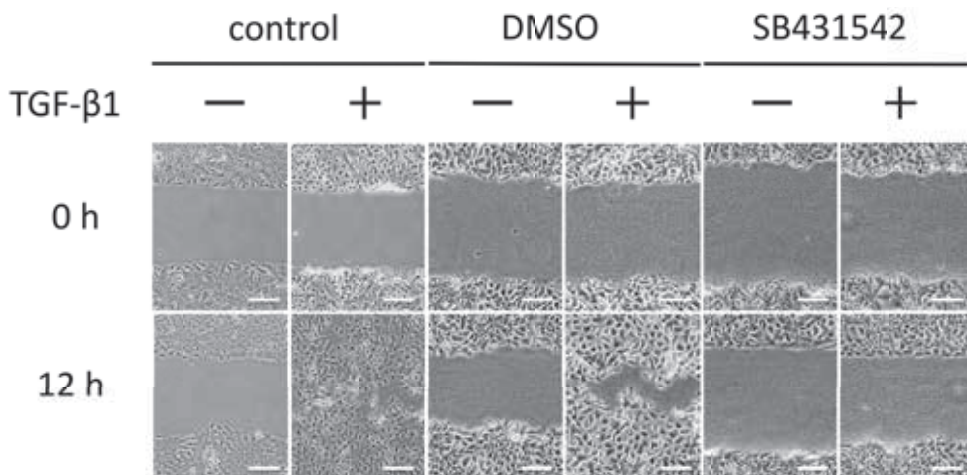


図4：HSC-4細胞におけるTGF- β 1誘導的な細胞遊走能

HSC-4細胞の細胞遊走能は、wound healing assayを用いて分析した。HSC-4細胞をchamber slide上で10 μ M SB431542の処理またはDMSO処理した後、10 ng/mLのTGF- β 1で48時間刺激した。一部の細胞をかき取った残りの細胞を、12時間培養した後、細胞の画像を、位相差顕微鏡を用いて撮影した。スケール・バーは、200 μ mを示す。

HSC-4細胞におけるEMT関連転写因子の発現レベルがこの細胞のEMTにどのように影響するかについて調査した。Slugの発現レベルは、TGF- β 1刺激後、90分で一過性に増加したのち、再び24時間後に有意に発現が増大した⁶⁾。Snailの発現レベルもTGF- β 1刺激により増大が認められたが⁷⁾、その発現量自体はSlugと比較すると非常に低かった。一方、Twist1/2、ZEB1、ZEB2及びFOXC2の発現の増大は、TGF- β 1刺激後6時間または48時間では観察されなかった(未発表データ)。これらのデータは、SlugがTGF- β 1刺激HSC-4細胞における、重要なEMT関連の転写因子であることを示唆する。加えて、Slugのノックダウンにより、HSC-4細胞において、有意にTGF- β 1により誘導されたvimentin発現は抑制されたが、TGF- β 1により誘導されたN-cadherinの発現は影響されなかった⁵⁾。これらの結果は、SlugがHSC-4細胞におけるTGF- β 1誘導性EMTの進行中に、間葉マーカー遺伝子の発現を促進することを示唆した。なお、TGF- β 1刺激HSC-4細胞におけるSnailの機能については、現在調査中である。

8. HSC-4細胞のTGF- β 1誘導性EMTにおけるSlugによる細胞遊走能の制御

細胞遊走能はEMTに関連していると広く認められており、腫瘍浸潤と転移に関与している⁴⁰⁾。EMT関連転写因子であるSlugは、角膜上皮細胞の遊走能を増強すると報告されている⁴¹⁾。しかしながら、hOSCC細胞のEMTに関連した遊走能に関するSlugの効果は、明らかにされていなかった。TGF- β 1で刺激されたHSC-4細胞の細胞遊走能は、図4に示すようにwound healing assayを用いて調べられた。この方法では、まず培養細胞をチャンバースライド上で、コンフルエントになるまで培養した後、一部をチップの先で細胞を引き剥がす(図4, 0 h)。細胞遊走能が強いほど、速くこの'傷'が消失あるいは、小さくなる(図4, 12 h)。この結果、HSC-4細胞の細胞遊走能は、TGF- β 1刺激により増加したが、SB431542またはSlug siRNAにより阻害された(図4)。この細胞遊走能の抑制は、細胞が通過できる穴の開いたインサート上に播種された細胞が、穴を通過して下部に移動した細胞数を調べるBoyden chamber assayでも観察された⁵⁾。通常、細胞接着は細胞運動において基本

的役割を果たしている。細胞外基質と細胞表面のインテグリンをはじめとした複合タンパク質との間で形成される focal adhesion (接着斑) の生成は、細胞移動の際に働く葉状仮足または糸状仮足が安定して機能するために必要である⁴²⁾。接着斑部位で、vinculin は細胞外基質と結合する integrin と actin 細胞骨格との間の機械的連

結に関与している⁴³⁾。TGF- β 1 未刺激の HSC-4 細胞と比較して TGF- β 1 刺激された HSC-4 細胞において、多くの接着斑の形成が、葉状仮足様の構造付近の vinculin の斑点状スポットとして検出された (図5)。興味深いことに、vinculin の若干のスポットは actin stress fiber と共存しているのが観察された。それは葉状仮足様の構造の周辺で一般的に見出された。従って我々は、これらの斑点状の vinculin が HSC-4 細胞において TGF- β 1 による細胞遊走誘導効果を助長する役割を果たすと考えている。

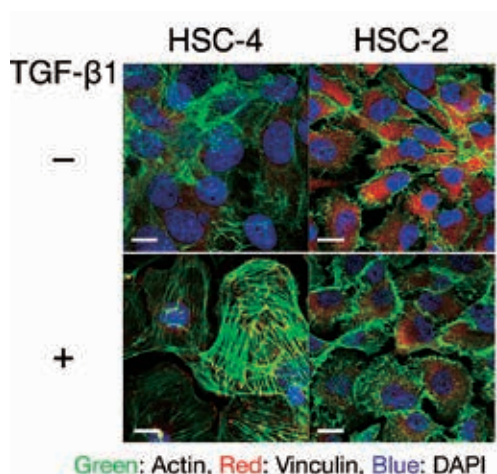


図5：細胞運動関連分子の細胞内分布

HSC-4 細胞を 10 ng/mL の TGF- β 1 を含むまたは含まない無血清培地で 48 時間培養した後、細胞運動関連タンパク質の局在を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。蛍光 phalloidin (actin, 緑色) および抗 vinculin 抗体 (赤色) を用いて細胞を免疫染色した後、核を DAPI で染色した。スケール・バーは、10 μ m を示す。

表1 TGF- β 1 処理 HSC-4 細胞から分泌が増大した ECM タンパク質の同定

10 ng/mL の TGF- β 1 有り無しで処理した HSC-4 細胞を、48 時間の無血清培地で培養した。得られた培養上清を Microcon-10 フィルターを用いて限外ろ過により濃縮した。TGF- β 1 処理または未処理の細胞からの細胞外タンパク質は、SDS-PAGE で分離した後、Flamingo 蛍光ゲル染色法 (BIO-RAD) で染色により検出した。TGF- β 1- 処理により増加したタンパク質バンドを LC-MS/MS を用いて分析し、同定を行なった。

Molecules	Target Proteins
TGFBI (β ig-h3)	Integrin α 3 β 1
PAI-1	Integrin α 3 β 1, Integrin α v β 3
Thrombospondine-1	CD36, CD47, Integrin α 3 β 1
Fibronectin	Integrin α 3 β 1, Integrin α 5 β 1
Laminin α 3	Integrin α 3 β 1, Integrin α 6 β 4
MMP-1	Collagen type I, II, III, VII, VIII, X, Aggrecan
MMP-10	Aggrecan, Collagen type IV, Fibronectin, Laminin, ProMMP

(表1). Fibronectin, PAI-1, β ig-h3 及び TSP-1 の発現レベルは, TGF- β 1 刺激後, 増大した. これらの結果は, 抗 fibronectin, 抗 PAI-1, 抗 β ig-h3 及び抗 TSP-1 抗体を用いたウェスタンブロット法により確認された⁵⁾.

TSP-1 の N 末端の領域は, 内皮細胞表面上で, integrin α 3 β 1 と結合し, 内皮細胞の増殖と血管新生を誘導する⁴⁴⁾. PAI-1 関連分子である uPAR は, integrin α 3 β 1 と複合体を形成して, 上皮細胞の遊走を誘導する⁴⁵⁾. β ig-h3 は, integrin α 3 β 1 を介して, 多数の細胞種で相互作用を仲介する複数の細胞接着のモチーフを持つ⁴⁶⁾. ヒトメラノーマ細胞の integrin α 3 β 1 は, fibronectin と結合し, 細胞の浸潤能を増加させる⁴⁷⁾. 従って, TGF- β 1 刺激後 fibronectin, PAI-1, β ig-h3 及び TSP-1 の発現増加が, integrin α 3 β 1 を介して HSC-4 細胞の遊走能に影響を及ぼすことが考えられた. 我々の予想通りに integrin α 3 または β 1 に対する中和抗体は, TGF- β 刺激による HSC-4 細胞の細胞遊走能を明らかに抑制した⁵⁾. 従って, TGF- β 刺激による HSC-4 細胞の細胞遊走能は, integrin α 3 β 1 に依存することが判明した. 興味深いことに, integrin α 3 と β 1 発現レベルは, HSC-4 細胞への TGF- β 1 刺激後, 72 及び 96 時間で増大した⁵⁾. このことは, TGF- β により誘導された integrin α 3 β 1 の発現が細胞遊走を増大する役割を果たすことを示唆した.

10. TGF- β 1 誘導性 EMT により亢進した HSC-4 細胞の細胞遊走能における integrin と FAK の役割

TGF- β 1 により誘導された細胞外タンパク質である TSP-1, β ig-h3, fibronectin, 及び PAI-1 と関連がある urokinase 型 plasminogen 活性化因子受容体 (uPAR) は, integrin α 3 β 1 と相互作用が報告されている分子である^{44)~46)}. そこで, HSC-4 細胞の細胞膜上の integrin α 3 β 1 がどのように TGF- β 1 誘導細胞遊走能に影響を及ぼすかについて調べた. Integrin α 3 及び β 1 に対する中和抗体を用いて, TGF- β 刺激 HSC-4 細胞

の細胞遊走能が, wound healing assay と Boyden chamber assay により調べられた⁵⁾. TGF- β 刺激細胞遊走能の活性は, integrin α 3 及び β 1 の中和抗体により, 明らかに抑制された⁵⁾. また TGF- β 1 刺激 HSC-4 細胞において, integrin α 3 及び β 1 の RNA レベルでの発現が調べられた. その結果, integrin α 3 と β 1 の発現は, TGF- β 1 刺激後, 72 または 96 時間で有意に上昇した⁵⁾.

FAK は細胞が遊走するための重要な制御因子であり, 癌細胞の浸潤と転移に必要とされる⁴⁸⁾. 通常, FAK は integrin によって活性化され, 細胞遊走のプラス制御因子として機能する⁴⁸⁾. この活性化 FAK は, Rho ファミリータンパク質の活性化を促進する調節タンパク質と結合して, 細胞遊走を促進することが知られている⁴⁹⁾. そこで, HSC-4 細胞における TGF- β 誘導細胞遊走能に対する FAK inhibitor I の効果を評価した. wound healing assay を用いて調査したところ, TGF- β 誘導 HSC-4 細胞の細胞遊走能は, 10 ng/mL の FAK inhibitor I により明らかに阻害された⁵⁾. これらの結果は, TGF- β により誘導された細胞遊走亢進シグナルが integrin α 3 β 1/FAK 経路を介して伝達されたことを示唆する.

11. hOSCC 細胞における TGF- β 1 刺激による MMP-10 の発現

hOSCC 細胞が浸潤するためには, 単に遊走能の増大だけではなく, さらに基底膜を分解して結合組織に進展する必要がある. そこで, どのような分解酵素が浸潤に関与しているかについて調べるために, TGF- β 1 で刺激された HSC-4 細胞の培養上清のプロテオミクス解析をさらに進めた (表1). TGF- β 1 刺激のない対照の培養上清との比較により, TGF- β 1 刺激により MMP-1 と -10 の培養上清中への分泌が強く促進されることが示された. TGF- β 1 刺激により誘導された MMP-10 タンパク質の発現増加は, ウェスタンブロット法によっても確認された⁶⁾. MMP-10 は, 結合組織への腫瘍細胞浸潤

を妨げる基底膜の重要な構成要素であるIV型コラーゲンを分解する作用、並びに他の pro-MMP の活性化作用をもつ²⁹⁾。なお、qRT-PCR を用いた分析では、HSC-4 細胞の他の hOSCC 細胞株である HSC-2、HSC-3 及び SAS 細胞では、HSC-4 細胞のような MMP-10 の強い発現増加は見られなかった⁶⁾。

他の上皮系細胞においても、TGF- β 1 は EMT を誘導するとともに MMP-10 の発現増大を示すことが報告されている。HaCaT II-4 ケラチノサイトにおいて、EGF と TGF- β 1 の共刺激が MMP-10 と MMP-1 の発現を誘導し、細胞の浸潤能を増進することが示されている⁵⁰⁾。加えて、マウスとヒトの乳腺上皮細胞 (NmuMG 及び MCF10A) では、TGF- β 刺激が筋細胞エンハンサー因子 (MEF) -2A を介して MMP-10 の発現を増大することが示されている⁵¹⁾。

一方、MMP-1 のタンパク質レベルの発現は MMP-10 より低く、HSC-4 細胞においては、MMP-10 が TGF- β 1 により誘導される EMT に深く関与することを示唆している⁶⁾。興味深いことに、内在性の MMP 阻害剤である TIMP1 及び TIMP2 の発現レベルは、TGF- β 1 刺激後 24 時間では、有意に発現が抑制された (未発表データ)。これは、HSC-4 細胞において TGF- β 1 により誘導された浸潤能の増加が、MMP の発現増大並びに TIMPs の発現抑制により、共同的に制御されることを示唆する。

一般的に、MMP-2 及び MMP-9 が浸潤と転移に関与していることが知られている²⁷⁾。HSC-4 細胞においては、MMP-2 及び MMP-9 の mRNA の発現レベルが TGF- β 1 刺激後 24 及び 48 時間後に、有意に増加した⁶⁾。従って MMP-2 及び MMP-9 が、MMP-10 により誘導される浸潤能と協力して促進するという可能性が考えられた。しかしながら、膜結合型の MMP として浸潤能に関与することが報告されている MMP-14²⁷⁾ の mRNA の発現レベルは、HSC-4 細胞において TGF- β 1 刺激により変化しなかった (未発表データ)。TGF- β 1 刺激された HSC-4 細胞における MMP-1、MMP-2 及び

MMP-9 の浸潤能に対する影響については、今後の検討が必要である。

12. TGF- β 1 により発現誘導された MMP-10 による HSC-4 細胞の浸潤能の増大

MMP-10 の発現が HSC-4 細胞の浸潤能に影響を及ぼすかどうかを調べるために、siRNA を用いて MMP-10 遺伝子をノックダウンさせた⁶⁾。浸潤能の分析には、基底膜マトリックス (Matrigel matrix) を細胞遊走能の分析に利用したインサートにコートした Boyden chamber を使用し、基底膜マトリックスを超えてインサート下部に到達した細胞数を調べた⁶⁾。興味深いことに、MMP-10 の siRNA により、TGF- β 1 により誘導された HSC-4 浸潤能の促進効果は阻害された⁶⁾。これらの結果から、この細胞の TGF- β 1 により誘導された浸潤能は、MMP-10 の発現によって媒介されていることが示唆された。

MMP-10 が頸部腫瘍において腫瘍の進行と浸潤を誘導することがこれまでに報告されている⁵²⁾。hOSCCs に由来する 3 種の細胞株である HSC-2、HSC-4 及び SAS の浸潤能を比較すると、TGF- β 1 刺激により、HSC-2 細胞では浸潤能を促進させないが、HSC-4 細胞と SAS 細胞では浸潤能を促進することが示された (未発表データ)。加えて、HSC-4 細胞において MMP-10 の発現は TGF- β 1 により極めて顕著に増大したが、HSC-2、HSC-3 及び SAS 細胞ではあまり見られなかった⁵⁾。これらの結果は、TGF- β 1 で刺激された SAS 細胞では MMP-10 以外の他の因子が働いてこの細胞の浸潤能が亢進される可能性を示唆するものである。

13. TGF- β 1 による Slug 依存的な MMP-10 の発現増加

次に Slug が TGF- β 1 によって誘導された MMP-10 の発現及び HSC-4 細胞の浸潤能に影響を及ぼすかどうかを調べた。TGF- β 1 によって誘導された MMP-10 の発現は、Slug の siRNA を用いたノックダウンにより有意に抑制

された⁶⁾。また興味深いことに、TGF- β 1 により誘導された細胞の浸潤能は Slug siRNA 導入により、有意に抑制された⁶⁾。これらの結果は、TGF- β 1 が Slug 依存的に HSC-4 細胞の MMP-10 の発現を増加させることを示している。従って、TGF- β 1 による MMP-10 の発現の Slug 依存的な誘導は、HSC-4 細胞の浸潤能の制御において重要な役割を果たしていると考えられた。

14. TGF- β 1 による MMP-10 の発現と non-canonical Wnt シグナルとの関連

HSC-4 細胞において、TGF- β 1 が canonical あるいは non-canonical Wnt シグナル伝達に関与するかどうか調査するために、TGF- β 1 が canonical 経路で作用する Wnt-3a 並びに non-canonical 経路に作用する Wnt-5a と Wnt-5b の mRNA レベルでの発現に与える影響について調べた。その結果、TGF- β 1 により有意に Wnt-5b の発現は増大したが、Wnt-3a と Wnt-5a の

発現には影響を及ぼさなかった⁶⁾。加えて、両経路に作用する Wnt シグナル阻害剤である Dvl-PDZ Domain Inhibitor II は、TGF- β 1 により誘導された MMP-10 の mRNA レベルの発現を有意に抑制した⁶⁾。これに対して、補助受容体 LRP5/6 に結合して canonical Wnt シグナル伝達を特異的に阻害するタンパク質である DKK-1 は、TGF- β 1 で誘導された MMP-10 の発現レベルに影響を及ぼさなかった⁶⁾。また、Wnt-5b による刺激により HSC-4 細胞において MMP-10 の発現が有意に増大されることを確認した⁶⁾。これらの結果は、Wnt-5b が誘起する non-canonical Wnt シグナル伝達が、TGF- β 1 による MMP-10 の発現の誘導を媒介することを示唆している。以上の結果から、Slug は TGF- β 1 刺激に応答して、Wnt-5b の発現を誘導し、誘導された Wnt-5b は、オートクリン及び、あるいはパラクリンによるシグナル伝達を通して non-canonical Wnt 経路を惹起させて、その後 MMP-

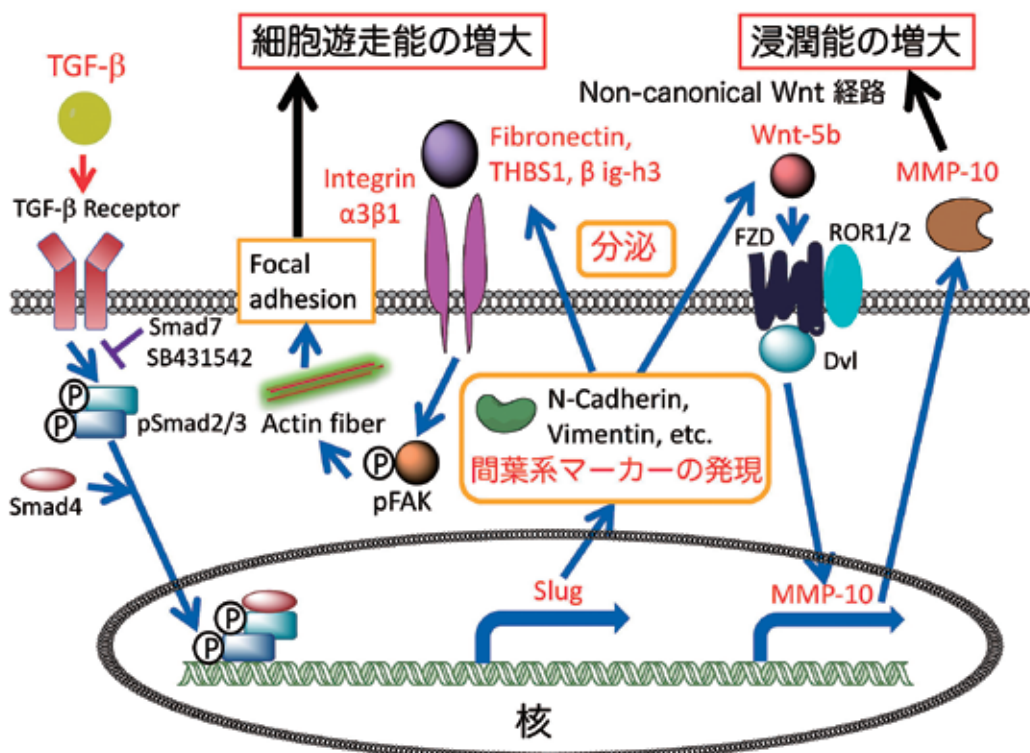


図6：HSC-4 細胞における TGF- β 1 による EMT とそれに伴う細胞遊走・浸潤に関わる分子機構

10 の発現を増大することが示された。さらに興味深いことに、Wnt-5b がノックダウンされた HSC-4 細胞において、TGF- β 1 処理に応答した浸潤能の増大が抑制されることが示された⁶⁾。

癌における Wnt-5b の機能は十分に理解されておらず、TGF- β 1 により刺激したヒトの下垂体腫瘍細胞において Wnt-5b の発現増大が示された報告⁵³⁾などしか知られていない。対照的に、癌における Wnt-5a の機能は、比較的よく調べられており、Wnt-5a の発現の増大と患者の生存率減少の関連が示されている⁵⁴⁾。また興味深いことに、Wnt-5a の発現と増加は黒色腫、胃、卵巣および結腸癌の浸潤能を増大させることが示されている⁵⁴⁾。加えて、Kumawat らは³⁶⁾、気道平滑筋細胞において、TGF- β 1 は Wnt-5b でなく、Wnt-5a の発現を誘導すると報告している。

15. TGF- β 1 刺激された HSC-4 細胞における Slug, Wnt-5b 及び MMP-10 の mRNA 発現の経時変化

HSC-4 細胞においては TGF- β 1 による刺激後、Slug, Wnt-5b, MMP-10 の順で発現誘導されることが qRT-PCR 法により明らかとされた⁶⁾。すなわち、最初に Slug の発現レベルが TGF- β 1 刺激後 1.5 時間で有意に増大し、続いて Wnt-5b の発現レベルが TGF- β 1 刺激の後、6 から 24 時間の間で有意に増大し、そして最後に、MMP-10 の発現が TGF- β 1 刺激後 24 から 48 時間の間に有意に増大した⁶⁾。これらの結果と、これまでに述べた TGF- β 1 により Slug の発現が誘導され、その Slug が Wnt-5b の発現を誘導し、また Wnt-5b が MMP-10 の発現を誘導するという結果とを合わせて考えると、TGF- β 1 は Slug/Wnt-5b/MMP-10 シグナル伝達軸により HSC-4 細胞の浸潤能を増大させることが強く示唆された。Slug が hOSCC 細胞において MMP-10 と Wnt-5b の発現を制御するかどうかは、これまで検討されていなかったが、我々の研究により Slug が hOSCC 細胞において Wnt-5b と MMP-10 の発現を介して浸潤能を誘導することが初めて証明された⁶⁾。

16. 結論

図 6 に、得られた結果をまとめて示した。6 種の hOSCC 細胞株を用いて、TGF- β 1 への応答を調べたところ、HSC-4 細胞が最も顕著に反応した。HSC-4 細胞では、TGF- β 1 は、T β R を介して Smad2/3 シグナルを活性化し、EMT を誘導した。この EMT 誘導により、1) 間葉マーカーの N-cadherin や vimentin の高発現、並びに integrin α 3 β 1 の標的タンパク質の発現レベルを増大させることにより細胞の遊走性を増大させていた。2) non-canonical Wnt シグナル経路に関与する Wnt-5b の発現増大を介して MMP-10 の発現増大を引き起こした。この MMP-10 は EMT に関連した細胞の浸潤能の増大に関与することが示された。またこれら細胞遊走能及び浸潤能の増加には、TGF- β 1 に誘導された転写因子 Slug の発現増大が関与していた。従って、転写因子 Slug を介して細胞遊走及び、浸潤に関与する分子の発現増加により、HSC-4 細胞の浸潤能が増大することが示された。本研究は、hOSCC 細胞における、TGF- β 1 により誘導された EMT と EMT に関連した細胞遊走、及び浸潤の基盤を構成している分子機構を調査した最初の報告である。今後は、この分子機構が hOSCC 細胞以外の他の腫瘍細胞にも EMT に関与するのかを調べる必要があると考えている。

hOSCC 細胞において MMP-10 の発現増加が腫瘍の病理学的プロセスや浸潤能に依存することはこれまでに示唆されていたが⁵⁵⁾、これまでに実証はされておらず、今回の我々の知見により hOSCC 細胞の浸潤能が MMP-10 の発現レベルに依存することが初めて示された。我々の研究成果により、特異的な MMP-10 に対する阻害剤は、研究ツールとして用いられるだけでなく、ヒト口腔扁平上皮癌の治療への臨床適用のために期待される。しかしながら、MMP-10 の特異的で有用な阻害剤は、現在まで開発されていない。

今回同定された TGF- β 1/Smad/Slug/integrin α 3 β 1/FAK ならびに TGF- β /Smad/Slug/Wnt-5b/MMP-10 シグナル伝達系を分子標的として

口腔癌浸潤を抑制しうる薬剤の開発が期待できると考えられる。

これまでの我々の一連の研究により, 細胞内のシグナル伝達経路のみではなく, 細胞外へ分泌されたECMタンパク質がオートクリンあるいはパラクリンに働き, 細胞遊走や癌細胞の浸潤に寄与することが示された。一方, TGF- β シグナル経路には, Smadを介さない, non-Smad経路が存在することが知られている⁵⁶⁾。この経路には, TGF- β 受容体から1)細胞遊走に関与するRhoAなどのsmall GTPasesの経路, 2)細胞増殖, 細胞分化や細胞死などに関与するErk, p38及びJNKのMAPK経路, 3)細胞増殖に関与するPI3K/Akt/mTOR経路, 及び4)様々な遺伝子発現に関与しているNF- κ B経路とリンクしている⁵⁶⁾。これらの経路を介して non-Smad経路もEMTに関与しているため⁵⁶⁾, 今後は non-Smad経路についても調べる必要があると考えている。さらに, 癌細胞はその微小環境(ニッチ)が重要であり, ニッチには癌関連線維芽細胞(CAF)の存在が明らかとなっている⁵⁷⁾。従って, 癌細胞とCAF間の相互作用にも, これらのEMTにより誘導された分泌タンパク質が関与する可能性がある。今後は, 癌細胞同士の相互作用による腫瘍の悪性化の研究に加えて, CAFや他のニッチ細胞との相互作用についても研究を進めていく必要があると考えられる。

謝 辞

本研究に際して, ご支援並びにご協力を頂きました細胞情報科学分野および口腔外科学分野の皆様方に感謝いたします。

本研究の一部は文部科学省科学研究費(課題番号23592896, 26293426, 26462823, 26670852, 16H05534と17K11851)および文部科学省私立大学戦略的基盤形成支援事業(未来医療開発プロジェクト)の助成によって実施された。

利 益 相 反

本研究において, 利益相反はない。

引 用 文 献

- 1) Lambert, R., Sauvaget, C., de Camargo Cancela, M., and Sankaranarayanan, R.: Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 23: 633-641, 2011.
- 2) Graves, C. A., Abboodi, F. F., Tomar, S., Wells, J., and Pirisi, L.: The translational significance of epithelial-mesenchymal transition in head and neck cancer. *Clin Transl Med.*, 3: 60, 2014.
- 3) Richter, P., Umbreit, C., Franz, M., Berndt, A., Grimm, S., Uecker, A., Böhmer, F. D., Kosmehl, H., and Berndt, A.: EGF/TGF β 1 co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332. *J. Oral Pathol. Med.*, 40: 46-54, 2010.
- 4) Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R.: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15: 178-196, 2014.
- 5) Saito, D., Kyakumoto, S., Chosa, N., Ibi, M., Takahashi, N., Okubo, N., Sawada, S., Ishisaki, A., and Kamo, M.: Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin α 3 β 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. *J. Biochem.*, 153: 303-315, 2013.
- 6) Hino, M., Kamo, M., Saito, D., Kyakumoto, S., Shibata, T., Mizuki, H. and Ishisaki, A.: Transforming growth factor- β 1 induces invasion ability of HSC-4 human oral squamous cell carcinoma cells through the Slug/Wnt-5b/MMP-10 signalling axis. *J. Biochem.*, 159: 631-40, 2016.
- 7) Chiba, T., Ishisaki, A., Kyakumoto, S., Shibata, T., Yamada, H., and Kamo, M.: Transforming growth factor- β 1 suppresses bone morphogenetic protein-2-induced mesenchymal-epithelial transition in HSC-4 human oral squamous cell carcinoma cells via Smad1/5/9 pathway suppression. *Oncol. Rep.*, 37: 713-720, 2017.
- 8) Wang, X., Sun, W., Bai, J., Ma, L., Yu, Y., Geng, J., Qi, J., Shi, Z., and Fu, S.: Growth inhibition induced by transforming growth factor-beta1 in human oral squamous cell carcinoma. *Mol. Biol. Rep.*, 36: 861-869, 2009.
- 9) Meulmeester, E., and Dijke, T. P.: The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J. Pathol.*, 223: 205-218, 2011.
- 10) Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., and Miyazono, K.: Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 7: 1191-1204, 2002.
- 11) Papageorgis, P.: TGF β signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis. *J. Oncol.*, 2015: 587193-15, 2015.

- 12) Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., and Ford, H. L.: Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia*, 15: 117-134, 2010.
- 13) Thiery, J. P., and Sleeman, J. P.: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7: 131-142, 2011.
- 14) Kim, K., Lu, Z., and Hay, E. D.: Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol. Int.*, 26: 463-476, 2002.
- 15) Nelson, W. J., and Nusse, R.: Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*, 303: 1483-1487, 2004.
- 16) Jing, Y., Han, Z., Zhang, S., Liu, Y., and Wei, L.: Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Microenvironment. *Cell Biosci.*, 1:29, 2011.
- 17) Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De, H. A.: The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in the epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.*, 2: 84-89, 2000.
- 18) Medici, D., Hay, E. D., and Olsen, B. R.: Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol. Biol. Cell*, 19: 4875-4887, 2008.
- 19) Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A.: Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117: 927-939, 2004.
- 20) Zeisberg, M., and Neilson, E. G.: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.*, 119: 1429-1437, 2009.
- 21) Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A.: Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer*, 7: 415-428, 2007.
- 22) Yee, K. O., Connolly, C. M., Duquette, M., Kazerounian, S., Washington, R., and Lawler, J.: The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat.*, 114: 85-96, 2009.
- 23) Smith, H. W., and Marshall, C. J.: Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11: 23-36, 2010.
- 24) Oh, J. E., Kook, J.-K., and Min, B. M.: Beta ig-h3 induces keratinocyte differentiation via modulation of involucrin and transglutaminase expression through the integrin alpha3beta1 and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 280: 21629-21637, 2005.
- 25) de longh, R.U., Wederell, E., Lovicu, F.J., and McAvoy, J.W.: Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs.*, 179: 43-55, 2005.
- 26) Ungefroren, H., Sebens, S., Seidl, D., Lehnert, H., and Hass, R.: Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun. Signal.*, 9: 18, 2011.
- 27) Duffy, M. J., Maguire, T. M., Hill, A., McDermott, E., and O'Higgins, N.: Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.*, 2: 252-257, 2000.
- 28) Kim, H.-S., Shang, T., Chen, Z., Pflugfelder, S. C., and Li, D.-Q.: TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, 79: 263-274, 2004.
- 29) Nakamura, H., Fujii, Y., Ohuchi, E., Yamamoto, E., and Okada, Y.: Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur. J. Biochem.*, 253: 67-75, 1998.
- 30) Deraz, E. M., Kudo, Y., Yoshida, M., Obayashi, M., Tsunematsu, T., Tani, H., Siriwardena, S. B. S. M., Kiekhäe, M. R., Qi, G., Iizuka, S., Ogawa, I., Campisi, G., Lo Muzio, L., Abiko, Y., Kikuchi, A., and Takata, T.: MMP-10/stromelysin-2 promotes invasion of head and neck cancer. *PLoS ONE*, 6: e2543857, 2011.
- 31) Clevers, H.: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127: 469-480, 2006.
- 32) Kim, W., Kim, M., and Jho, E.-H.: Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem. J.*, 450: 9-21, 2013.
- 33) Angers, S. and Moon, R. T.: Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol. Cell Biol.*, 10: 468-477, 2009.
- 34) Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Yamamoto, S.: Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol.*, 204: 17-33, 2011.
- 35) Uraguchi, M., Morikawa, M., Shirakawa, M., Sanada, K., and Imai, K.: Activation of WNT family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J. Dent. Res.*, 83: 327-332, 2004.
- 36) Kumawat, K., Menzen, M. H., Bos, I. S. T., Baarsma, H. A., Borger, P., Roth, M., Tamm, M., Halayko, A. J., Simoons, M., Prins, A., Postma, D. S., Schmidt, M., and Gosens, R.: Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF- β -induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *FASEB J.*, 27: 1631-1643, 2013.
- 37) Akiyoshi, S., Ishii, M., Nemoto, N., Kawabata, M., Aburatani, H., and Miyazono, K.: Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oli-

- gonucleotide arrays. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 257–268, 2001.
- 38) Chandler, H.L., Colitz, C.M., Lu, P., Saville, W.J., and Kusewitt, D.F.: The role of the Slug transcription factor in cell migration during corneal re-epithelialization in the dog. *Exp. Eye Res.*, 84: 400–411, 2007.
 - 39) Chen, Z., Zhang, D., Yue, F., Zheng, M., Kovacevic, Z., and Richardson, D.R.: The iron chelators Dp44mT and DFO inhibit TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of N-Myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1). *J. Biol. Chem.*, 287: 17016–17028, 2012.
 - 40) Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J. W., Akhurst, R. J., and Derynck, R.: TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J. Cell Sci.*, 125: 1259–1273, 2012.
 - 41) Aomatsu, K., Arai, T., Abe, K., Kodama, A., Sugioaka, K., Matsumoto, K., Kudo, K., Kimura, H., Fujita, Y., Hayashi, H., Nagai, T., Shimomura, Y., and Nishio, K.: Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 53: 751–756, 2012.
 - 42) Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F.: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84: 359–369, 1996.
 - 43) Humphries, J. D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M. J., and Ballestrem, C.: Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.*, 179: 1043–1057, 2007.
 - 44) Ren, B., Yee, K. O., Lawler, J., and Khosravi-Far, R.: Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1765: 178–188, 2006.
 - 45) Wei, Y., Eble, J. A., Wang, Z., Kreidberg, J. A., and Chapman, H. A.: Urokinase receptors promote β 1 integrin function through interactions with integrin α 3 β 1. *Mol. Biol. Cell*, 12: 2975–2986, 2001.
 - 46) Reinboth, B., Thomas, J., Hanssen, E., and Gibson, M. A.: Beta 1-glycan interacts directly with biglycan and decorin, promotes collagen VI aggregation, and participates in ternary complexing with these macromolecules. *J. Biol. Chem.*, 281: 7816–7824, 2006.
 - 47) Pocheć, E., Lityńska, A., Amoresano, A., and Casbarra, A.: Glycosylation profile of integrin α 3 β 1 changes with melanoma progression. *Biochim. Biophys. Acta*, 1643: 113–123, 2003.
 - 48) Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D.: Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6: 56–68, 2005.
 - 49) Narumiya, S., Tanji, M., and Ishizaki, T.: Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.*, 28: 65–76, 2009.
 - 50) Wilkins-Port, C. E., Ye, Q., Mazurkiewicz, J. E., and Higgins, P. J.: TGF- β 1 + EGF-initiated invasive potential in transformed human keratinocytes is coupled to a plasmin/MMP-10/MMP-1-dependent collagen remodeling axis: role for PAI-1. *Cancer Res.*, 69: 4081–4091, 2009.
 - 51) Ishikawa, F., Miyoshi, H., Nose, K., and Shibamura, M.: Transcriptional induction of MMP-10 by TGF- β , mediated by activation of MEF2A and downregulation of class IIa HDACs. *Oncogene*, 29: 909–919, 2010.
 - 52) Zhang, G., Miyake, M., Lawton, A., Goodison, S., and Rosser, C. J.: Matrix metalloproteinase-10 promotes tumor progression through regulation of angiogenic and apoptotic pathways in cervical tumors. *BMC Cancer*, 14: 310, 2014.
 - 53) Ruebel, K. H., Leontovich, A. A., Tanizaki, Y., Jin, L., Stilling, G. A., Zhang, S., Coonse, K., Scheithauer, B. W., Lombardero, M., Kovacs, K., and V. Lloyd, R. V.: Effects of TGF β 1 on gene expression in the HP75 human pituitary tumor cell line identified by gene expression profiling. *Endocrine*, 33: 62–76, 2008.
 - 54) Anastas, J. N. and Moon, R. T.: WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13: 11–26, 2013.
 - 55) Mashhadiabbas, F., Mahjour, F., Mahjour, S. B., Fereidooni, F., and Hosseini, F. S.: The immunohistochemical characterization of MMP-2, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2, and podoplanin in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, 114: 240–250, 2012.
 - 56) Mu, Y., Gudey, S. K., and Landström, M.: Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.*, 347: 11–20, 2012.
 - 57) del Pozo Martin, Y., Park, D., Ramachandran, A., Ombrato, L., Calvo, F., Chakravarty, P., Spencer-Dene, B., Derzsi, S., Hill, C. S., Sahai, E. and Malanchi, I.: Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization. *Cell Rep.*, 13: 2456–69, 2015.

Molecular mechanism of transforming growth factor- β 1-induced cell migration and invasion of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells

Masaharu KAMO¹⁾, Daishi SAITO²⁾, Masafumi HINO²⁾, Takahiro CHIBA²⁾, Hiroyuki YAMADA²⁾, and Akira ISHISAKI¹⁾

¹⁾ Division of Cellular Biosignal Sciences, Department of Biochemistry, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Akira ISHISAKI)

²⁾ Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Hiroyuki YAMADA)

[Received : June 19 2018 : Accepted : August 8 2018]

Abstract : The underlying molecular mechanism of oral cancer invasion is not apparent. In this review, we explain the molecular mechanism for the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and EMT-related cell migration and invasion by TGF- β in human oral squamous cell carcinoma (hOSCC) cells. We examined whether TGF- β -induced EMT of hOSCC cells, and cell migration and invasive potential. Among six kinds of hOSCC cells, HSC-4 cells responded to TGF- β 1 the most from the upregulations of Smad2 phosphorylation and the expression of target genes against TGF- β . The expression of Slug, which is an EMT-related transcription factor, was increased by TGF- β 1 stimulation. The expression suppression of Slug by RNA interference inhibited the expression of the mesenchymal marker and the cell migration of the HSC-4 cells. The expressions of binding proteins for integrin α 3 β 1, which activates the focal adhesion kinase (FAK) to relay signals for the promotion of migratory activity, were increased by TGF- β 1 stimulation. Thus, EMT and cell migration through the integrin α 3 β 1/FAK pathway were upregulated by TGF- β 1-induced Slug.

On the other hand, the expression of matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) was increased by TGF- β 1 stimulation, and the invasive potential was inhibited by MMP-10 siRNA. Slug siRNA suppressed the expression of MMP-10, indicating that the invasion of HSC-4 cells was induced through Slug-dependent upregulation of MMP-10 expression by TGF- β 1 stimulation. In addition, Slug siRNA suppressed Wnt-5b expression. Wnt-5b stimulation upregulated MMP-10 expression in HSC-4 cells. Moreover, Wnt-5b siRNA suppressed invasive potential and MMP-10 expression in HSC-4 cells.

Consequently, TGF- β 1 induced the migratory activity and invasive ability of hOSCCs by Slug/ α 3 β 1/FAK and Slug/Wnt-5b/MMP-10 signal transduction systems, respectively.

Key words : epithelial-mesenchymal transition, invasion, squamous cell carcinoma, Slug, Wnt