

論文内容の要旨

YAP/TAZ activation, induced by disruption of E-cadherin-mediated cell-to-cell contact, promotes the cadherin switch by facilitating nuclear translocation of Slug in human oral squamous cell carcinoma HSC-4 cells

—ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 において、E-cadherin を介した細胞間接着の崩壊による YAP/TAZ の活性化が Slug の核移行を促進して cadherin switch を誘導する—

(平野大輔、斎藤大嗣、小松祐子、山田裕之、石崎明、加茂政晴)

(岩手医科大学歯学雑誌 第 45 巻、第 1 号、令和 2 年 4 月掲載予定)

ひらの たいふ
平野 大輔

I. 研究目的

癌細胞の悪性化において、上皮間葉転換(EMT)によって誘導される細胞間接着因子としての cadherin の質的・量的変化である cadherin switch が重要であることが知られている。我々はこれまでに、EMT 関連転写因子の Slug は、TGF- β 1 刺激で発現が上昇し、E-cadherin の発現を抑制するが、N-cadherin の発現には関与しないことを見出している。しかしながら、口腔領域において最も発生頻度の高いヒト口腔扁平上皮癌(hOSCC)細胞において、EMT 誘導性転写因子による cadherin switch の調節機構の詳細は明らかにされていない。一方、癌細胞培養時の密度変化に伴う遺伝子の発現変化は、Hippo 経路により制御されることが知られている。しかし、hOSCC 細胞表面に存在する細胞接着因子による Hippo 経路を介した EMT の制御機構は明らかでない。そこで我々は、hOSCC 細胞の cadherin switch における細胞内シグナル伝達機構について、Slug、細胞接着因子並びに Hippo 経路に注目して調べた。

II. 研究方法

hOSCC 細胞として、HSC-4 細胞株を用いた。cadherin switch に関与する遺伝子とタンパク質は qRT-PCR 及びウェスタンブロット法、蛍光免疫染色法により解析した。

III. 研究成績

1. 蛍光免疫染色法にて 5×10^5 個/well の高密度条件で HSC-4 細胞を培養すると、E-cadherin は細胞膜表面に局在して高発現した。対照的に 1×10^5 個/well の低密度条件では細胞質に点状に観察された。さらに、N-cadherin の発現は高密度条件では観察されなかったが、低密度条件で観察された。RT-qPCR 法では高密度条件よりも低密度条件で 6.5 倍高い N-cadherin の発現を認めた。対照的に、低密度条件では高密度条件よりも E-cadherin の発現は 1/2 に減少した。したがって、低密度条件では、cadherin switch を誘発することが示唆された。加えて、他の hOSCC 細胞株である LMF-4 細胞においても、低密度条件では高密度条件よりも低い E-cadherin の発現が認められた。これらの結果は、E-cadherin および N-cadherin の発現が hOSCC 細胞の細胞密度の変化によって相反的に調節されることを示している。

2. E-および N-cadherin の発現レベルが Hippo 経路のシグナル伝達分子である YAP / TAZ に関与するかどうかを調べた。 YAP および TAZ のそれぞれの遺伝子をノックダウンすると、HSC-4 細胞での E-cadherin 発現は上昇し N-cadherin 発現は減少することが RT-qPCR 法により、明らかとなった。また、蛍光免疫染色では低密度条件下で YAP/TAZ の核内移行が確認された。このことから、HSC-4 細胞株における cadherin switch には Hippo 経路が関与していることが示唆された。
3. EMT に関与することが知られている EMT 関連転写因子 Slug の cadherin switch への影響を調べた。 Slug を siRNA でノックダウンすると E-cadherin の発現が上昇することが RT-qPCR 法により、見出された。さらに、 Slug は低密度条件下で HSC-4 細胞の核に局在することが観察され、高細胞密度では細胞質に局在した。さらに、 siYAP による遺伝子ノックダウンにより Slug の核局在化は抑制された。これらの結果より、EMT 関連転写因子 Slug の核移行は、Hippo 経路のシグナル伝達ターゲット分子である YAP により正に調節され、E-cadherin 発現抑制には Slug が関与することが示された。
4. E-cadherin を含むさまざまなタイプの細胞間接着分子は、その接着機能のために Ca^{2+} を必要とする。まず、培養液の Ca^{2+} 枯渇処理を行い、細胞表面での Ca^{2+} 依存性接着タンパク質の cadherin switch への関与を調べた。HSC-4 細胞では、 Ca^{2+} 枯渇処理 (30 μ M) 後に YAP の核局在化が顕著に観察されたが、通常 Ca^{2+} 培養条件下 (1,800 μ M) では観察されなかった。そこで、E-cadherin を介した細胞間接着の崩壊が YAP の核局在化にどのように影響するかを調べた。E-cadherin の中和抗体投与により、HSC-4 細胞の YAP の核局在化が促進されると共に、N-cadherin の発現上昇および E-cadherin の発現抑制が認められた。

IV. 考察及び結論

1. ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 細胞における E-cadherin から N-cadherin への cadherin switch が、細胞密度依存的であり低密度で顕著に認められることを見出した。
2. 細胞密度が低い場合に認められる cadherin switch では、Hippo シグナル経路のエフェクター分子であると共に転写補助因子である YAP/TAZ が働いて、EMT 関連転写因子である Slug の核内移行を促進することが示された。
3. E-cadherin の細胞間接着の崩壊は、Hippo 経路依存的に cadherin switch を誘導することが示された。

以上より、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 細胞において、E-cadherin の細胞間接着の崩壊による YAP/TAZ の活性化は Slug の核内移行を促進することにより cadherin switch を誘導することが示され、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の悪性化に関与する EMT の機構の一端を解明することができた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査	入江 太朗	教授	(病理学講座 病態解析学分野)
副査	山田 浩之	教授	(口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)
副査	石崎 明	教授	(生化学講座 細胞情報科学分野)

上皮間葉転換(EMT)は、癌の悪性度と密接に関係する。Cadherin switch とはこの上皮間葉転換の際に E-cadherin の発現が減少し、N-cadherin の発現が増加することである。この cadherin switch は Slug や EMT 関連転写因子により誘導されることが報告されている。また、既に transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) がヒト口腔扁平上皮癌(hOSCC)細胞における E-cadherin の発現を抑制し、EMT を誘導することが明らかにされている。さらに TGF- β 1 により誘導される Slug は N-cadherin の発現には影響しないことも知られており、hOSCC 細胞における EMT の際に N-cadherin の発現の増加をもたらす EMT 関連転写因子が何であるのかは知られていない。一方、Hippo 経路は細胞密度を感知するシグナル伝達系である。この経路を構成する代表的な分子が、transcriptional co-activator with a PDZ-binding motif (TAZ) や yes-associated protein (YAP) である。Hippo 経路は乳癌細胞の EMT を制御することが示されているものの、hOSCC においては Hippo 経路が EMT にどの様に関わるのかは明らかにされていない。本研究では、細胞接着と Hippo 経路における YAP、TAZ の関係と、YAP、TAZ と EMT 関連転写因子であるところの Slug との関わりを検討すること、さらにそれらがヒト口腔扁平上皮癌において EMT とどの様に関わっているのかを明らかにすることを目的として解析を行った。用いた細胞は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(hOSCC HSC-4, hOSCC LMF-4)2種類である。YAP、TAZ のノックダウンにはそれらの siRNA を用いた。E-cadherin、N-cadherin、Slug の転写産物の発現を RT-qPCR で、E-cadherin、N-cadherin、YAP、TAZ、Slug の細胞内局在を免疫蛍光染色により検討した。

その結果、ヒト口腔癌細胞においては細胞密度により cadherin switch が制御されていること、Hippo 経路における YAP、TAZ が cadherin switch を制御すること、EMT 関連転写因子の Slug の核移行は YAP/TAZ により制御されていること、E-cadherin を含めた「接着」が Hippo 経路を制御することを明らかにした。

本研究は E-cadherin を含めた細胞間接着が Hippo 経路を介して cadherin switch を誘導することの詳細を明らかにしたものである。癌の浸潤・転移や悪性傾向獲得の仕組みの一端を説明し得るものであり、新たな癌治療戦略の創出に繋がる結果と考えられる。

試験・試問の結果の要旨

最初に本論文の目的、概要について説明がなされた。次いで研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から複数の質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

問：HSC-4 を高密度下で培養した場合と低密度で培養した場合の E-cadherin の局在パターンの違いの特徴はいかなるものか知見を述べよ。

答：高密度下で培養した場合は E-cadherin は主として細胞膜に局在するパターンを示しているが、低密度の場合には細胞質内の特に核周囲に顆粒状のシグナルが集まるパターンを示しており、もしかすると膜輸送が低下した状態を反映しているのかもしれないと考える。

問：Fig. 1 では E-cadherin と N-cadherin の局在パターンの違いをもって細胞密度と cadherin switch の関係性を示しているが、Hippo 経路が直接的に関わるのであれば、YAP, TAZ をノックダウンした際に E-cadherin の局在パターンは細胞密度に影響しなくなるのか？

答：YAP, TAZ をノックダウンした際の E-cadherin と N-cadherin の局在パターンの変化については検討していないが、おそらく影響はなくなるものと考ええる。

問：HSC-4 と LMF-4 の細胞株を用いた理由は何か？

答：両細胞株ともに TGF- β 1 応答性があり既に同様の実験に用いていたこと、さらに LMF-4 は高転移能を有する細胞株であり、EMT を起こしやすい株と考えられることから本実験に適していると考え用いた。

問：低カルシウム培地や E-cadherin 中和抗体を使用しているが、複数の方法を用いている理由は何か？

答：低カルシウム培地を用いることで広くカルシウム依存性の接着を阻害することを意図しており、E-cadherin の中和抗体を用いることは、E-cadherin に的を絞った阻害を意図しており、それらの方法による違いも把握することができると考えたが、結果としては大きな違いは認められなかった。

問：本研究結果では細胞間接着が失われることで Hippo 経路を介した cadherin switch が作動することを示しているが、生体内で癌が浸潤を開始する際に生じるどのような現象をこれは説明することになるのか？

答：扁平上皮癌として浸潤を開始する前の状態として異形成がありますが、異形成においては病変内において細胞間に離開傾向が生じることも特徴の 1 つとされている。その様な状況下において cadherin switch が作動し、浸潤能獲得に至り、異形成から扁平上皮癌へと移行するのではないかと考える。

問：実際のヒト口腔扁平上皮癌において TGF- β 1 はいずれの細胞が産生しているのか？

答：癌細胞自身も産生しているが、一番の産生源となるのは M2 マクロファージである。