

## 論文内容の要旨

Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces invasion ability of HSC-4 human squamous cell carcinomas cells through Slug/Wnt-5b/MMP-10 axis.

TGF- $\beta$ 1 は Slug/Wnt-5b/MMP-10 のシグナル伝達軸により HSC-4 ヒト扁平上皮癌細胞の浸潤能を誘導する

(The Journal of Biochemistry 平成 28 年掲載予定)

ひのまさふみ  
樋野 雅文

### I. 研究目的

これまでに Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) は ヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) 細胞株である HSC-4 細胞において上皮間葉転換 (EMT) を引き起こし、遊走能を増大させる (J. Biochem. 2013;153 (3) :303-315) ことを見出している。本研究では hOSCC 細胞の浸潤・転移能発現機構に解明のために、EMT により誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が TGF- $\beta$ 1 処理した HSC-4 細胞で浸潤能に関与することを示し、その浸潤・転移能発現機構について解明を行う。

### II. 研究方法

浸潤に関与する遺伝子とタンパク質は qRT-PCR およびウェスタンブロットによりそれぞれ解析した。浸潤能の解析には HSC-4 細胞に siRNA を処理し 24 時間培養後、TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) で 72 時間処理した後、invasion chamber を用いて下面に浸潤してきた細胞を DAPI 染色により計測した。

### III. 研究成績

HSC-4 細胞に TGF- $\beta$ 1 を作用させ、その上清中のタンパク質を質量分析により解析したところ matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) の発現上昇を認めた。MMP-10 は基底膜成分の分解および他の MMP の活性化に関与するため MMP-10 と浸潤能の関連を検討した。siRNA を用いて MMP-10 をノックダウンし浸潤能を調べたところ、TGF- $\beta$ 1 刺激を加えたにもかかわらず浸潤能は抑制された。このことにより MMP-10 は HSC-4 細胞の浸潤能に関与していることが見出された。次に転写関連因子である Slug をノックダウンさせて MMP-10 の発現量を調べたところ、TGF- $\beta$ 1 刺激を加えたにも関わらず MMP-10 の発現減少が認められた、Slug が MMP-10 の発現を制御していることが見出された。近年、Wnt シグナルと浸潤能の関係について多くの報告がなされている。そこで、HSC-4 細胞において TGF- $\beta$ 1 刺激により発現上昇する Wnt シグナルを調べたところ、Wnt5b の発現上昇が顕著であったため、Wnt5b と浸潤能の関係を調べた。TGF- $\beta$ 1 刺激を加えたにも関わらず Slug のノックダウンにより Wnt5b の発現量が減少した。さらに Wnt5b のノックダウンにより MMP-10 の発現量も減少した。このことにより Slug が MMP-10 の発現を制御していることが見出された。以上の結果から、HSC-4 細胞において TGF- $\beta$ 1 刺激が Slug を介し MMP-10 を発現させ、浸潤能を上昇させることが示唆された。

### IV. 考察及び結論

HSC-4 細胞に TGF- $\beta$ 1 刺激を加えると、転写関連因子である Slug の発現が上昇した。さらに、Slug の発現上昇に伴い Wnt5b の発現も上昇した。Wnt5b は Wnt 経路を介し MMP-10 を発現し、浸潤能を上

昇させた。HSC-4 細胞において、Slug/Wnt5b/MMP-10 の緊密な関係が浸潤能に関与していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 杉山 芳樹 (口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)  
副査 教授 水城 春美 (口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)  
副査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)

### 研究の背景および目的

これまでの研究で、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の HSC-4 細胞に Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) を作用させると上皮間葉転換 (EMT) が誘導され、さらに integrin $\alpha$ 3 $\beta$ 1/FAK 依存的に誘導される遊走能の亢進が転写因子である Slug の仲介によって起こることが見出されている。この研究では、TGF- $\beta$ 1 処理によって生じる HSC-4 細胞の浸潤に matrix metalloproteinase (MMP) が関与するか否か、また浸潤能の発現における分子機構について解析をおこなった。

### 材料および方法

ヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) 細胞株 HSC-4 細胞を実験に用い、浸潤に関与する遺伝子とタンパク質を qRT-PCR およびウェスタンブロットにより解析した。また、HSC-4 細胞を siRNA で処理し、24 時間培養後、TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) で 72 時間処理したのち、invasion chamber を用いて下面に浸潤してきた細胞を DAPI 染色により計測して浸潤能を解析した。

### 結果および考察

HSC-4 細胞に TGF- $\beta$ 1 を作用させると、matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) の発現が上昇した。MMP-10 が浸潤能に関与していることが示唆された。つぎに、siRNA を用いて Slug をノックダウンするとこれにより MMP-10 の発現が抑制された。加えて、siRNA を用いて MMP-10 をノックダウンしたところ、HSC-4 細胞の浸潤能が抑制されたことから、Slug が MMP-10 の発現を誘導することによりこの細胞の浸潤能を亢進することが示された。一方、HSC-4 細胞に TGF- $\beta$ 1 を作用させると、Wnt の non-canonical 経路に作用する Wnt-5b の発現が有意に増加した。さらに、Wnt-5b によりこの細胞を刺激すると MMP-10 の発現が有意に増加した。加えて、siRNA を用いて Slug をノックダウンすると Wnt-5b の発現が低下することから、Slug が Wnt-5b を介して MMP-10 の発現を制御していることが示唆された。

以上の結果から、HSC-4 細胞において、TGF- $\beta$ 1 刺激によって発現が増大した Slug は Wnt の non-canonical 経路を介して MMP-10 の発現を増加させ、その結果として浸潤能が上昇すると考えられた。

## 試験・試問結果の要旨

はじめにスライドを用いて、本論文の概要が説明された。説明は簡潔で分かりやすく、研究について十分な知識を有し、実験の方法、結果をよく理解していることが伺われた。

続いて、主査、副査から研究の目的、方法、結果の解釈・考察などについて質問が行われたが、いずれ

の質問に対しても的確な回答が得られた。また、研究成果の臨床への応用についての展望が示され、大学院修了後も引き続いて研究を発展させる意欲を持っていると思われた。

**参考論文** なし