

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17237

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の細胞接着によるHippo経路活性化に着目した抗浸潤転移療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of anti-invasive and metastasis therapy focusing on Hippo pathway activation by cell adhesion of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

齋藤 大嗣 (SAITO, DAISHI)

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号：40805876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-4細胞において、低細胞密度の条件下では、E-cadherinを介した細胞間接着の崩壊により、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の活性化が示された。このYAP/TAZの活性化により、上皮間葉転換に関連する転写因子であるSlugの核内移行を促進させて、E-cadherinからN-cadherinへのcadherinの発現変化であるcadherin switchを誘導することが示された。以上の結果から、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の悪性化に関与する上皮間葉転換の機構がHippo経路にも関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞の悪性化において、上皮間葉転換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。我々はこの”cadherin switch”を誘導する細胞間接着因子を介したHippo経路の活性化に伴うEMT制御機構の一部を明らかにした。これらの機構は、口腔癌細胞の浸潤・転移を抑制する新規治療戦略樹立のための新たな基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In human oral squamous cell carcinoma cell HSC-4 cell, YAP/TAZ, which was the effector molecule and transcriptional co-factor in the Hippo signaling pathway, were activated by the disruption of E-cadherin-mediated cell-to-cell contact under the low cell-density condition. The cadherin switch which was an expression change of cadherin from E-cadherin to N-cadherin was induced by activation of YAP/TAZ promoting a nuclear translocation of Slug which was the epithelial-mesenchymal transition-related transcription factor. These results indicated that the mechanism of epithelial-mesenchymal transition which involved in the malignant transformation of the human oral squamous cell carcinoma cell participated in the Hippo signaling pathway.

研究分野：口腔外科学分野

キーワード：HSC-4 EMT cadherin switch Hippo経路 YAP/TAZ E-cadherin N-cadherin

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌細胞の悪性化において、細胞間接着因子としての cadherin の質的・量的な変化である E-cadherin から N-cadherin への変換としての "cadherin switch" が重要であることが知られており 1)、癌組織の病理学的な解析から、癌の悪性度に伴い起こることが認められている 2)。しかし、この cadherin switch による口腔癌細胞間接着様式の質的あるいは量的な変化がどのような細胞内シグナルを介して EMT 誘導性転写因子の発現に関わるのかについて報告した例はない。一方、癌細胞培養時の細胞密度の変化に伴う遺伝子発現変化は、Hippo 経路により制御されていることが近年の研究から示唆されており 3)、そのシグナル伝達分子である YAP(Yes-associated protein)/TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)は、癌細胞における細胞間接着強度のセンサーあるいはメディエーターであることが予測されている。しかし、とくに口腔扁平上皮癌細胞表面に存在する如何なる細胞接着因子がこの Hippo 経路あるいはその他の細胞内シグナルを介してこの細胞の EMT を制御するのかの全容は明らかとされていない。これまでは、口腔扁平上皮癌以外の癌細胞において数種の接着因子 (E-cadherin あるいは Crumbs 複合体や Fat など) が EMT に関与しているとの報告がされているのみである 4,5)。そこで、今回我々は、cadherin switch をはじめとした種々の細胞間接着機構により制御される EMT 誘導性細胞内シグナル伝達機構の全容を解明し、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移メカニズムを分子レベルで明らかにしたい。

### 2. 研究の目的

癌細胞の悪性化において、上皮間葉転換 (EMT) により誘導される細胞間接着因子としての cadherin の質的・量的な変化である cadherin switch が重要である。我々はヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) 細胞では、EMT 関連転写因子の Slug は、TGF- $\beta$ 1 刺激で発現が上昇し、EMT を誘導することを見出している 6)。しかし Slug は E-cadherin の発現を抑制するが、N-cadherin の発現には関与せず、cadherin switch の調節機構は明らかでない。そこで、N-cadherin の発現に関わる転写因子の同定を行なう。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。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。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、EMT 誘導性転写因子、細胞接着因子並びに Hippo 経路に注目して、解析を行う。

### 3. 研究の方法

hOSCC 細胞として HSC-4 細胞株、SAS 細胞株、HO-1-N1 細胞株、及び LMF-4 細胞株を用いたが、Hippo 経路を介した EMT の制御機構の解析には HSC-4 細胞株を用いた。cadherin switch に関する遺伝子発現は qRT-PCR で解析した。またタンパク質については、発現レベルの解析には、ウェスタンブロット法を用い、細胞内局在性の解析には、蛍光免疫染色法を用いて行なった。シグナル伝達経路の解析には、YAP/TAZ、Slug 及び Sox9 の siRNA を用いて解析を行なった。Sox9 のリン酸化については、阻害剤として H-89 及びオカダ酸を用いて解析した。細胞遊走能の測定には、Boyden chamber を用いて、底面に移動した細胞を固定後 DAPI 染色した後、細胞数を計測した。

### 4. 研究成果

(1) TGF- $\beta$ 1 は HSC-4 細胞において Sox9 の発現を上昇させた (図 1A)。また Sox9 の遺伝子ノックダウンにより N-cadherin の発現が抑制された (図 1B)。さらに Sox9 を遺伝子ノックダウンした HSC-4 細胞の遊走能を調べたところ有意に低下した (図 1C)。以上の結果により、Sox9 は N-cadherin の発現の増大に関与する転写因子であることが示された。

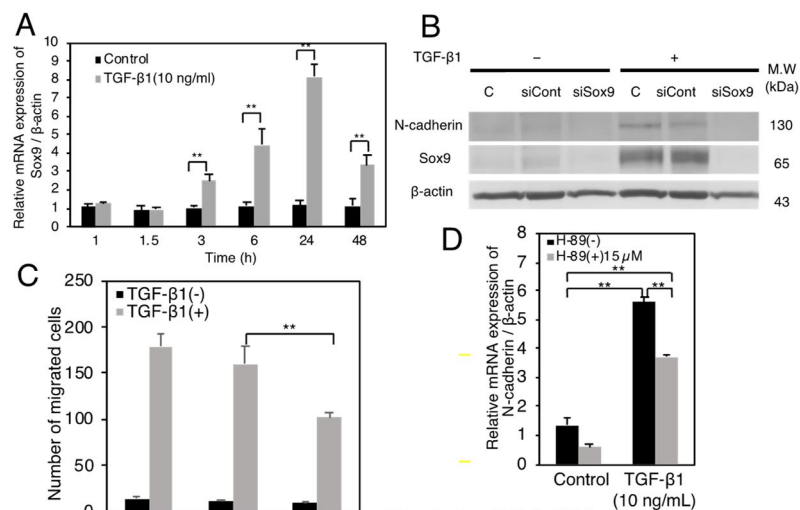


図1 Sox9の発現と機能

(2) TGF- $\beta$ 1 は、Sox9 の細胞質から核への移行を誘導することが示された。またこの Sox9 の核移行にはサイクリック AMP 依存性タンパク質キナーゼ (PKA) 依存的なリン酸化が必要であることが PKA 阻害剤である H-89 により、Sox9 の核移行が抑制されたこと、及び N-cadherin の発現が抑制されたことから示された (図 1D)。

(3)  $5 \times 10^5$  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  $1 \times 10^5$  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 (図 2A)。従って、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。

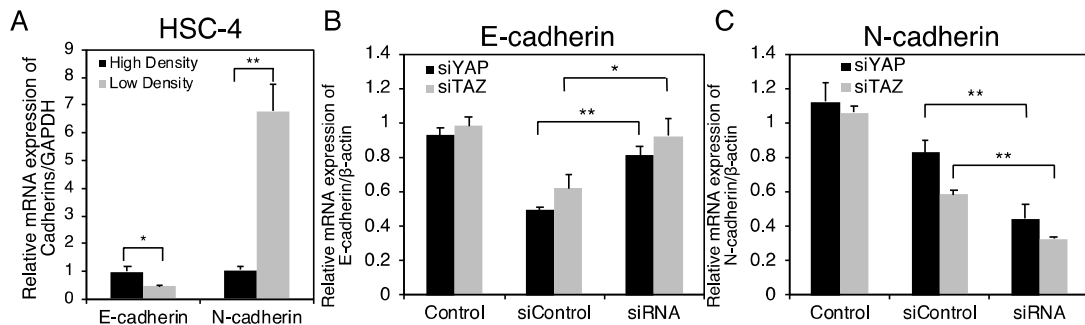


図2 Hippo経路のCadherin switchへの関与

(4) 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 (図 2B, C)。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。

(5) 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 (図 3A)。加えて、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。

(6) 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  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とする。まず、培養液の  $\text{Ca}^{2+}$  枯渇処理を行い、細胞表面での  $\text{Ca}^{2+}$  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、 $\text{Ca}^{2+}$  枯渇処理 (30  $\mu\text{M}$ ) 後に YAP の核局在化が顕著に観察されたが、通常  $\text{Ca}^{2+}$  培養条件下 (1,800  $\mu\text{M}$ ) では観察されなかった。従って、Ca 依存的な細胞表面の接着分子の関与が示唆された。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。

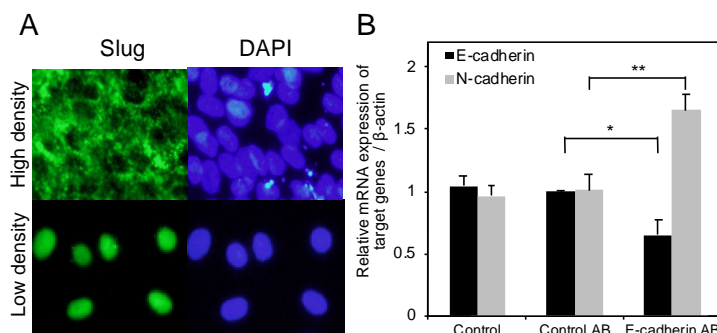


図3 Slugの細胞局在化とE-cadherinの細胞間接着の阻止によるcadherin switch

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 (図 3B)。以上より、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。

これらの結果をまとめると、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た。また EMT において、転写因子である Slug と Sox9 は、それぞれ E-cadherin 及び N-cadherin の発現の変化を引き起こし、cadherin switch を誘導することが示された。以上の結果により、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。なお、(1)-(2)の結果は、*Oncol Lett*, 20:474-482, 2020.に、(3)-(6)の結果については、*Dent J Iwate Med Univ*,45:23-34, 2020 にて発表した。

<引用文献>

- 1) Wheelock, M.J., Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto, and K.R. Johnson. 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci.* 121:727-735.
- 2) Lade-Keller, J., R. Riber-Hansen, P. Guldberg, H. Schmidt, S.J. Hamilton-Dutoit, and T. Steiniche. 2013. E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. *Br J Dermatol.* 169:618-628.
- 3) Zhao, B., K. Tumaneng, and K.-L. Guan. 2011. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol.* 13:877-883.
- 4) Kim, N.-G., E. Koh, X. Chen, and B.M. Gumbiner. 2011. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:11930-11935.
- 5) Zhang, X., J. Liu, X. Liang, J. Chen, J. Hong, L. Li, Q. He, and X. Cai. 2016. History and progression of Fat cadherins in health and disease. *Oncotargets Ther.* 9:7337-7343.
- 6) Saito, D., S. Kyakumoto, N. Chosa, M. Ibi, N. Takahashi, N. Okubo, S. Sawada, A. Ishisaki, and M. Kamo. 2013. Transforming growth factor- 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin 3 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. *J Biochem.* 153:303-315.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirano T, Saito D, Komatsu Y, Yamada H, Ishisaki A, Kamo M.	4. 巻 45
2. 論文標題 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.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Journal of Iwate Medical University.	6. 最初と最後の頁 23-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirano, T., D. Saito, H. Yamada, A. Ishisaki, and M. Kamo.	4. 巻 20
2. 論文標題 TGF- 1 induces N-cadherin expression by upregulating Sox9 expression and promoting its nuclear translocation in human oral squamous cell carcinoma cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters.	6. 最初と最後の頁 474-482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野大輔、齋藤大嗣、小松祐子、千葉高大、樋野雅文、横田聖司、客本斉子、帖佐直幸、山田浩之、石崎 明、加茂政晴
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換におけるHippo経路の関与
3. 学会等名 日本生化学会 東北支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野大輔、武田 啓、齋藤大嗣、柴田敏之、山田浩之、石崎 明、加茂政晴
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるSox9とHippo経路の上皮間葉転換への関与
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----