

主論文要旨

Disruption of CADM1-dependent cell-cell adhesion in human oral squamous cell carcinoma cells results in tumor progression, possibly through an increase of MMP-2 and MMP-9 expression

ヒト口腔扁平上皮癌細胞における CADM1 依存性細胞間接着の崩壊は、MMP-2 および MMP-9 の発現増大を介して腫瘍の進行をもたらす

(Journal of Oral Biosciences 令和 6 年掲載予定)

氏名 小原 ななみ

I. 研究目的

我々は、HSC-3 細胞が、TGF- β /Smad シグナル経路には応答せず、EMT を誘導しないことを見出している。LMF4 細胞株は、Momose らにより樹立された、HSC-3 細胞株由来の高転移能を有するヒト口腔扁平上皮癌細胞 (hOSCC) 株である。しかし、LMF4 細胞の浸潤・転移能における分子メカニズムに関してはこれまでほとんど理解されていないままである。高転移能を有する LMF4 細胞株を用い、遺伝的バックグラウンドが同一な親細胞株である HSC-3 細胞と比較することにより、浸潤・転移能のキーとなる分子を見出し、その分子の機能解析を行うことにより、浸潤・転移の分子メカニズムを解明し、浸潤・転移抑制の基盤を得ることを目的とする。

II. 研究方法

a) 細胞接着因子の検索： RT-qPCR 法及び Western Blotting 法を用いて、LMF4 細胞、及び HSC-3 細胞において、細胞接着関連因子の発現を比較して、細胞の運動と浸潤に関与する因子として CADM1 を見出した。b) CADM1 の機能解析： HSC-3 細胞における siRNA を用いた CADM1 遺伝子発現のノックダウンによる、浸潤促進因子 MMP の発現変化と、それに関与する細胞内シグナルについて調査した。また抗 CADM1 中和抗体 (抗 CADM1) の投与により、HSC-3 細胞の細胞遊走能・浸潤能がどのような影響を受けるかを調べた。

III. 研究成績

- 1) EMT 関連分子の発現レベルの調査： LMF4 細胞は、HSC-3 細胞と比較して、mRNA レベルで上皮系マーカーが有意に発現低下しておらず、また、間葉系マーカーは有意に発現上昇していなかった。タンパク質レベルにおいても、LMF4 細胞は、HSC-3 細胞と比較して、上皮系マーカーは同等に発現しており、間葉系マーカーは有意に弱く発現することが見出された。
- 2) EMT 関連転写因子の発現レベルの調査： LMF4 細胞は、HSC-3 細胞と比較して、EMT 関連転写因子を同等、あるいは有意に弱く発現することが、mRNA レベルで見出された。
- 3) 腫瘍関連細胞接着分子の発現レベル： LMF4 細胞の高い浸潤・転移性には、EMT が関与しないことが強く示唆されたため、細胞接着因子に関して網羅的に発現量の解析を行なった。この結果、腫瘍抑制因子として知られる CADM1 の発現は、LMF4 細胞では、HSC-3 細胞と比較して mRNA レベル、

タンパク質レベル共に著しく低下していた。また、免疫蛍光染色において CADM1 は HSC-3 細胞および LMF4 細胞共に、主として細胞膜に局在していた。

4) **CADM1 の機能解析**： LMF4 細胞では、HSC-3 細胞と比較して、MMP-2 と MMP-9 の発現が有意に増大していた。そこで、CADM1 に特異的な siRNA (si-CADM1) を用いて、HSC-3 細胞における CADM1 の発現をノックダウンしたところ、MMP-2 と MMP-9 の発現が有意に増大することが判明した。

5) **伝達経路の同定**： CADM1 のノックダウンにより HSC-3 細胞で認められた MMP-2 および MMP-9 の発現増大効果に関与する細胞内シグナル伝達経路について、シグナル伝達阻害剤を用いて調べた。その結果、MEK 阻害剤 U0126 と PI3K 阻害剤 LY294002 は、CADM1 のノックダウンによる MMP-2 の発現上昇効果を抑制した。さらに、JNK 阻害剤 SP600125、p38 MAPK 阻害剤 SB203580、及び LY294002 は、CADM1 のノックダウンによる MMP-9 の発現上昇効果を抑制した。

6) **遊走能・浸潤能の比較**： HSC-3 細胞の遊走能は LMF4 細胞と同等であった。また HSC-3 細胞を抗 CADM1 で処理すると、その遊走能は有意に増強された。一方、HSC-3 細胞の浸潤能は LMF4 細胞よりも有意に低かった。また HSC-3 細胞を抗 CADM1 で処理すると、その浸潤能は有意に増強された。

IV. 考察及び結論

研究成績 1) と 2) より、LMF4 細胞の高い転移能は、EMT により獲得されたものではないことが示唆された。研究成績 3) と 4) より、浸潤能増強因子として知られる MMP の発現が HSC-3 細胞と比較して LMF4 細胞で高いことや、HSC-3 細胞の遺伝子ノックダウンによりこの細胞の MMP の発現が増大されることから、細胞接着分子 CADM1 の発現低下が、LMF4 細胞における高い浸潤・転移活性の獲得に関与することが示唆された。研究成績 5) より、HSC-3 細胞では、CADM1 の発現低下に伴い認められた MEK/PI3K シグナル伝達の活性化を介して、MMP-2 の発現が誘導されること、また CADM1 の発現低下に伴い認められた JNK/p38 MAPK/PI3K シグナル伝達の活性化を介して、MMP-9 の発現が誘導されることが示唆された。研究成績 6) より、HSC-3 細胞と比較して LMF4 細胞は高い浸潤能を持つこと、また HSC-3 細胞での CADM1 の接着機能の抑制によりこの細胞の浸潤能が増大することから、LMF4 細胞での CADM1 の発現低下がこの細胞の浸潤能を増大することが示唆された。

以上の研究成果は、癌抑制因子と報告されている CADM1 の発現低下が、hOSCC 細胞の浸潤および転移活性を EMT 非依存的、且つ促進的に制御していることを強く示唆している。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 小笠原正人教授

(薬理学講座 病態制御学分野)



副査 1 石崎明教授

(生化学講座 細胞情報科学分野)



副査 2 山田 浩之教授

(口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)



論文審査の結果の要旨

口腔扁平上皮癌細胞株の中で HSC-3 細胞は TGF- β /Smad シグナル経路には応答せず、EMT を誘導しないことが報告されている。LMF4 細胞は HSC-3 細胞株由来の高転移能を有する細胞株で、Momose らにより樹立されたものである。親細胞株の HSC-3 細胞と LMF4 細胞を比較することにより高転移能獲得の分子基盤を明らかにし、浸潤・転移抑制の新たな治療戦略とすることを目的とした。明視野において細胞形態の変化に着目し、EMT 関連分子の mRNA 及び蛋白レベルの発現レベルの検討を行った。LMF4 細胞は HSC-3 細胞と比較し、上皮系マーカーの mRNA の発現は有意に上昇していたが、蛋白レベルでの発現に有意差は認められなかった。また間葉系マーカーの有意な上昇は mRNA レベル、蛋白レベルで認められなかった。また、EMT 関連転写因子の検討を行っている。転写因子レベルでは LMF4 細胞で Slug, Snail の有意な低下を認めたが、Sox9, Twist1 の発現に変化は認めなかった。これらの解析結果より、LMF4 細胞の高転移能に EMT は関与しないことが強く示唆された。そこで細胞接着因子に注目し、網羅的 mRNA 解析量の比較検討を行い、LMF4 細胞では腫瘍抑制因子として知られる CADM1 の低下を見出した。RT-qPCR にて CADM1 の低下、western blot にて蛋白レベルの発現低下を確認した。また、HSC-3 と LMF4 の mRNA の比較で MMP-2, MMP-9 の有意な増加を確認した。さらに親細胞株 HSC-3 の CADM1 をノックダウンすることで MMP-2, MMP-9 の有意な増加を明らかにした。MMP-2, MMP-9 増加に関与する細胞内シグナル伝達経路の検討を行った。MEK 阻害剤 U0126 と PI3K 阻害剤 LY294002 は、CADM1 のノックダウンによる MMP-2 の発現上昇効果を抑制した。さらに、JNK 阻害剤 SP600125, p38MAPK 阻害剤 SB203580, 及び LY294002 は CADM1 のノックダウンによる MMP-9 の発現上昇効果を抑制した。さらに、遊走能・浸潤能の比較検討を行った。Boyden chamber 法にて遊走能を検討したが、HSC-3、LMF4 細胞で有意差は認めなかった。そこで抗 CADM1 抗体処理後の遊走能を検討し、HSC-3 細胞では有意な増強を認めた。また、Matrigel-coated membrane を用いた浸潤能の検討では HSC-3 の浸潤能は有意に低かったが、抗 CADM1 抗体処理では HSC-3 細胞の有意な浸潤能の増加が認められた。

以上の研究成果により以下のような考察がなされた。

1. LMF4 細胞の高い転移能は EMT により獲得されたものではなく、腫瘍抑制因子として知られ細胞接着分子 CADM1 の発現低下が MMP-2, MMP-9 の発現を増大させ、高い浸潤・転移

能の獲得に関与したものと考えられた。

2. MMP-2 発現誘導には MEK/PI3K シグナル伝達系の活性化が関与し、また、MMP-9 の発現誘導には JNK/p38,MAPK/PI3K シグナル伝達経路の活性化が関与することを明らかにした。
3. HSC-3 細胞の抗 CADM1 抗体処理により浸潤能の増大が認められ、癌抑制因子 CADM1 の発現低下が EMT 非依存的に浸潤・転移能を高めていることが示唆された。

試験・試問結果の要旨

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・副査から多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

問：CADM1 は細胞膜上に存在するものと説明があったが、HSC-3 細胞の蛍光免疫染色では細胞質に発現しているように見える。この点に関してどう考えるか？

答：CADM1 は細胞接着因子で細胞膜上にホモ 2 量体として存在し、発現することが知られている。蛍光免疫染色の写真を撮影した際の環境条件により細胞質に発現しているように見えている可能性があると思われる。また細胞によっては、その細胞で発現した因子に関して、その細胞自身で細胞内に取り込み消化するといったものも存在する。CADM1 が発現増大した細胞において、細胞膜上に高発現した CADM1 がその細胞の働きにより細胞質に取り込まれるといった可能性もあるかもしれない。今後その可能性も含めて検討していきたい。

問：HSC-3 細胞と比較し、LMF4 細胞で細胞の形が紡錘形を呈していることに関して、EMT は関与していないとの結論に至ったわけだが、何が原因で LMF4 細胞がこのような形態を呈していると考えられるか？

答：細胞接着因子が関与しているものではないかと思われる。HSC-3 細胞も LMF4 細胞も播種した時点での細胞数は同じだが、HSC-3 細胞では細胞接着因子が大量に発現しているため、LMF4 細胞に比較して細胞接着が密で敷石状に見えるものと思われる。LMF4 細胞では E カドヘリンの発現は HSC-3 細胞と変わらないものの、CADM1 の発現が特に低い。このため、数ある細胞接着因子の中でも CADM1 が LMF4 細胞において LMF4 細胞の細胞接着に大きく影響を及ぼし、形態的な差異が出た可能性がある。

問：Twist1 の棒グラフに関して LMF4 細胞でエラーバーがすごく大きく見える。このことに関してどのように考察するか？

答：Twist1 に関しては今回示したデータの他にも数回検定を行なっている。今回は全ての Twist1 のデータの中で一番まとまりのあるものをスライドに示した。エラーバーが大きくなってしまったことの原因としては、サンプル数が $n=4$ と比較的少なかったことが考えられる。 n 数を増やすことで HSC-3 細胞においても LMF4 細胞においても更にデータのまとまりは出てくるものと考えられる。HSC-3 細胞も LMF4 細胞もどちらも $n=4$ で検定を行なったが、HSC-3 細胞では偶然に 4 因子に関してデータのばらつきが少なくまとまったため、LMF4 細胞に比べるとエラーバーは小さくなった。しかし、LMF4 細胞に関しては HSC-3 細胞よりもデータのばらつきが出ていたことが

本データにおける誤差の原因と思われる。

問：MMPsの中で特にMMP-2, MMP-9に着目した理由は何か？

答：MMP-2, MMP-9はそれぞれゼラチナーゼAとゼラチナーゼBで細胞外マトリックスを分解することが知られている。また、MMP-2, MMP-9はともにヒト口腔扁平上皮癌細胞において特に有名な因子として知られている。MMP-2, MMP-9は体内で分解されたコラーゲンを更に低分子化することが知られている。特にMMP-2, MMP-9はIV型コラーゲンを分解することでも知られており、IV型コラゲナーゼと言われている。IV型コラーゲンは基底膜の成分にも含まれており、IV型コラゲナーゼによってIV型コラーゲンが分解されることで基底膜の破壊を亢進し浸潤能が増大すると考える。これらの理由によりMMPsの中で特にMMP-2とMMP-9に着目した。また、Invasionアッセイにて使用されるマトリゲルの成分にもIV型コラーゲンは含まれており、in vitroで行う実験についてもヒトの基底膜に模した環境でHSC-3細胞とLMF4細胞の浸潤能の解析を行えているものと考察する。

問：CADM1は様々な腫瘍で発現は報告されており、エキソン8にsplicing variantsが知られているが、本研究では検討されましたか？

答：CADM1はhomo-homoの接着をしており、機能に影響する可能性が在るが、まだ検討はしていない。今後検討したいと考えています。

問：腫瘍細胞は継代培養する中で転座や塩基置換などが起こる可能性が在り、CADM1の発現低下はCADMのプロモーター活性の低下によるのか、またはCADM1mRNAの不安定化による可能性もあるが、CADM1の塩基配列は検討しましたか？

答：CADM1の発現低下はプロモーターのメチル化によるエピジェネティックな変化と、CADM1mRNAに途中でターミネーションコドンが入り、mRNAが不安定になった可能性がある。まだCADM1の塩基配列は検討していないので今後検討したい。