

論文内容の要旨

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

ヒト口腔扁平上皮癌細胞において TGF- β 1 は BMP-2 により誘導された間葉上皮転換を Smad1/5/9 経路の抑制を介して制御する

(ONCOLOGY REPORTS 平成 29 年掲載予定)

ちば たかひろ
千葉 高大

I. 研究目的

口腔領域において扁平上皮癌は最も発生頻度の高い癌である。癌細胞の転移において、上皮間葉転換 (EMT) は重要な働きを示すことが知られている。Transforming growth factor- β (TGF- β 1) がヒト口腔扁平上皮癌 (hOSCC) 細胞の EMT を促進することをこれまでに見出している。一方、癌細胞の転移においては、EMT により移動が可能になった後、転移先での癌細胞の定着と再増殖が重要であり、再び上皮様細胞の性質を獲得する間葉上皮転換 (MET) の関与が考えられている。Bone morphogenetic protein (BMP) は、MET に関与することが示唆されているが、その機構は明らかではない。さらに、hOSCC における BMP に対する応答の研究は少なく、またその作用も明らかとされてない。そこで、BMP-2 及び TGF- β 1 が hOSCC の EMT/MET 関連遺伝子の発現に対してどのように影響するのかについて研究を行った。

II. 研究方法

hOSCC 細胞として、HSC-2、HSC-3、HSC-4 及び SAS 細胞株を用いた。BMP-2 と TGF- β 1 の応答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により解析した。遊走能の解析は、TGF- β 1 あるいは BMP-2 処理した HSC-4 細胞をチャンバーの上部に播種し、24 時間後にチャンバーを通過した細胞を Mayer's hematoxylin 溶液で染色することで観察した。細胞増殖能は alamar Blue 法により調べた。

III. 研究成績

各 hOSCC において BMP-2 に応答する細胞の検索を Smad6 及び標的遺伝子 ID1 の発現、及び Smad1/5/9 のリン酸化により調べた。その結果、HSC-4 細胞のみで有意な応答が見られたので、以下では HSC-4 細胞を用いた。BMP-2 は、間葉系マーカーである N-cadherin の発現を抑制するのに対し、上皮系マーカーの cytokeratin 9 の発現を上昇させた。一方、両サイトカインで同時刺激した場合には、BMP-2 による上皮系マーカー発現上昇及び間葉系マーカーの発現抑制が、TGF- β 1 により濃度依存的に打ち消された。また BMP による EMT 関連転写因子 Snail の発現抑制及び MET 関連因子である ID1 の発現増大も同様に TGF- β 1 により打ち消された。さらに TGF- β 1 は、BMP シグナル経路の因子である Smad1/9 の発現及びそのリン酸化を抑制した。細胞機能に対しては、BMP-2 は TGF- β 1 とは逆に、HSC-4 細胞の細胞遊走能には影響を与えないが細胞増殖を増大させた。

IV. 考察及び結論

HSC-4 細胞は BMP-2 と TGF- β 1 の両者に応答する hOSCC 細胞として初めて見出した。さらに、BMP-2 は、TGF- β 1 と異なり、上皮系マーカーの発現を促進させ、間葉系マーカーの発現を抑制したこ

とから、EMTではなくむしろMETを誘導することが示唆された。このBMP-2の作用がTGF- β 1により濃度依存的に阻害されること、またTGF- β 1はBMP-Smad1/5/9シグナルを減弱させたことから、TGF- β 1はBMP-2によるMETを抑制することが示された。BMP-2が遊走能を低下させ、且つ細胞増殖を増大させたことは、転移先での癌細胞のコロニー形成をBMP-2が誘導する可能性を示すものと考えられる。この研究を発展させることにより、TGF- β 1とBMP-2シグナル経路のクロストークが明確になり、EMT/METの機構が理解されれば、口腔癌治療のための浸潤・転移に関わる新たな標的分子が見出される可能性は高いと考えられる。

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 石崎 明（生化学講座 細胞情報科学分野）
副査 教授 山田 浩之（口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野）

本研究は口腔扁平上皮癌の間葉上皮転換（MET）にbone morphogenetic protein-2（BMP-2）が及ぼす影響について調べたものである。癌細胞の転移において、上皮間葉転換（EMT）は重要な働きを示すことが知られている。一方、BMP-2はMETに関与することが示唆されているが、その詳細な機構は明らかではない。そこで、BMP-2およびTGF- β 1のヒト口腔扁平上皮癌細胞株のEMT/MET関連遺伝子発現への影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

本研究ではBMP-2に応答するヒト口腔扁平上皮癌細胞株であるHSC-4細胞を用いた。BMP-2は間葉系マーカーであるN-cadherinの発現を抑制するのに対し、上皮系マーカーのcytokeratin 9の発現を上昇させた。一方、BMP-2とTGF- β 1で同時刺激した場合には、BMP-2による上皮系マーカーの発現上昇および間葉系マーカーの発現抑制が、TGF- β 1により濃度依存的に打ち消された。またBMP-2によるEMT関連転写因子Snailの発現抑制およびMET関連転写因子であるID1の発現増大も同様にTGF- β 1により打ち消された。さらにTGF- β 1は、BMPシグナル経路の因子であるSmad1/9の発現およびそのリン酸化を抑制した。細胞機能に対しては、BMP-2はTGF- β 1とは逆に、HSC-4細胞の遊走能には影響を与えないが細胞増殖を増大させた。

以上の結果より、HSC-4細胞においてBMP-2は、TGF- β 1と異なり、上皮系マーカーの発現を上昇させ、間葉系マーカーの発現を抑制したことから、EMTではなくむしろMETを誘導することが示唆された。このBMP-2の作用がTGF- β 1により濃度依存的に阻害されること、またTGF- β 1はBMP-Smad1/5/9シグナルを減弱させたことから、TGF- β 1はBMP-2によるMETを抑制することが示された。BMP-2が細胞遊走能を低下させ、且つ細胞増殖を増大させたことは、転移先での癌細胞のコロニー形成をBMP-2が誘導する可能性を示すものと考えられた。

口腔扁平上皮癌の転移の有無は、患者の予後を左右する最も重要な因子であるため、転移機構の解明に繋がる本研究の基礎的・臨床的意義は非常に高く、学位に値するものと評価された。本研究を発展させることで、TGF- β 1とBMP-2シグナル経路のクロストークが明確になり、EMT/METの機構がより詳細に解明されれば、口腔癌治療のための浸潤・転移に関わる新たな標的分子が見出される可能性も高いと考えられた。

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。工夫された美しいスライドを用いた簡潔で分かりやすいプレゼンテーションであった。研究の背景についても十分な知識を有し、実験の方法および結果をよく理解していた。

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、研究成果の臨床応用への展望も十分に示された。

参考論文 なし