

Title	口腔扁平上皮癌の細胞運動能に対するWnt5bの関与
Author(s)	竹下, 彰範
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34357">https://hdl.handle.net/11094/34357</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 竹下 彰 範 )

## 論文題名

口腔扁平上皮癌の細胞運動能に対するWnt5bの関与

【目的】癌が生命を脅かす大きな要因として、その転移能が挙げられる。口腔扁平上皮癌の場合も、頸部リンパ節転移が予後に大きな影響を及ぼす。癌の転移では、癌細胞の運動能が重要な因子であり、これを制御するシグナル伝達系の研究も進められている。Wntシグナル伝達経路は種を超えて広く保持された伝達経路で、発生や発癌に関与すると考えられている。Wntシグナル伝達経路には $\beta$ -カテニンを介して遺伝子発現を制御する $\beta$ -カテニン経路とこれとは独立して主として細胞骨格系を制御する $\beta$ -カテニン非依存性経路が存在するが、これら伝達経路の口腔扁平上皮癌の転移における役割についてはまだ解明されていない。そこで、ヒト口腔扁平上皮癌細胞から作製された頸部リンパ節転移能が高い細胞株とその親株を用いて、細胞の運動能に対するWntとWntシグナル伝達経路の関与について検討を行った。さらに、細胞運動に関与するサイトカインとしてtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )の口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響についても検討を加えた。

【方法】細胞としてSAS-green fluorescent protein (GFP)とSAS-LM8の2種類の細胞を使用した。SAS-GFPはヒト低分化型舌扁平上皮癌由来SAS細胞にGFP遺伝子を導入し、安定発現させた細胞株である。SAS-LM8はSAS-GFPをマウス舌に接種して腫瘍を形成し、その頸部リンパ節転移巣を培養したのち、フローサイトメトリーでGFP陽性細胞を分離し、さらに培養し舌へ再接種する操作を8回繰り返した頸部リンパ節高転移株である。SAS-GFP, SAS-LM8は森田らにより樹立された細胞株であり、大阪大学名誉教授米田俊之氏より提供された。細胞遊走能はwound healing assayとmigration assay, 細胞浸潤能はinvasion assayで測定した。 $\beta$ -cateninの局在とアクチン細胞骨格は蛍光免疫染色にて観察した。Wntシグナル関連遺伝子はreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)により検出した。低分子量Gタンパク質Rho familyに属するRhoA, Rac1, Cdc42の活性はRho family activation assay kitを用いて測定した。Wnt5bをノックダウンするためsiRNAをリポフェクション法にて導入した。Wnt5bとTGF- $\beta$ は、それぞれrecombinant human Wnt5bとrecombinant human TGF- $\beta$ 1を用いた。

## 【結果】

1. SAS-GFPとSAS-LM8の細胞形態は、それぞれ数石状とやや紡錘形であり、ともに細胞間接着が密なコロニーを形成した。SAS-LM8ではコロニー周囲で細胞突起の伸長が顕著であった。
2. 両細胞の増殖能には差はみられなかったが、遊走能、浸潤能を測定すると、SAS-LM8ではSAS-GFPと比較して遊走能と浸潤能でそれぞれ2.4倍、2.1倍増加していた。
3. アクチン細胞骨格を染色すると、SAS-GFPと比べてSAS-LM8では細胞周囲で仮足様突起の伸長が観察された。細胞骨格を制御するRhoA, Rac, Cdc42のうち、Cdc42とRhoAで活性型が増加していた。
4.  $\beta$ -カテニンはSAS-GFP, SAS-LM8ともに細胞膜と細胞質で認められた。 $\beta$ -カテニン経路の標的遺伝子であるcyclin D1, c-myc, MT1-MMP, uPAR, laminin5 $\gamma$ 2, S100A4, MMP7のmRNA発現に差はなかった。 $\beta$ -カテニン非依存性経路を活性化するWnt5a, Wnt5b, Wnt11の発現をRT-PCRで検出したところ、SAS-LM8におけるWnt5b発現の亢進がみられた。
5. Wnt5bの発現が亢進し、その下流に存在するRho familyの活性化もみられたため、Wnt5bに着目して検討を行った。Wnt5bをsiRNAでノックダウンしたところSAS-GFP, SAS-LM8ともに遊走能の低下を認め、細胞周囲の仮足様突起は減少した。Wnt5bを培養細胞に作用させると遊走能、浸潤能が亢進し、仮足様突起も伸長した。活性型Cdc42, RhoAも増加した。
6. TGF- $\beta$ には上皮間葉移行(EMT:epithelial mesenchymal transition)を誘導し、癌細胞の浸潤・転移を高める働きのあることが知られている。そこで、SAS-GFP, SAS-LM8にTGF- $\beta$ を作用させた。いずれの細胞でも遊走能が亢進し、仮足様突起が伸長し、Wnt5bの発現も亢進した。一方、細胞形態、細胞接着、EMT関連転写因子であるSlug, Snail, Twist, E-カドヘリンの発現に大きな変化はなかった。

【考察】 SAS-LM8はSAS-GFPと比較して、遊走能、浸潤能が亢進しており、リンパ節転移能の差はこれら細胞性状の違いによると考えられた。β-カテニン経路はβ-カテニンの細胞核集積を介して癌化、増殖に関連する。β-カテニンの局在ならびにβ-カテニン経路の標的遺伝子の発現にも差がないことから、この経路が細胞遊走能に重要な役割を果たすことはないと考えられた。そこで、β-カテニン非依存性経路のWnt遺伝子を調べたところ、リンパ節高転移性のSAS-LM8ではWnt5bの発現が顕著に亢進しており、その下流に存在するRho familyを構成するCdc42とRhoAの活性型も増加していた。Wnt5bの発現亢進がみられたため、Wnt5bをsiRNAでノックダウンしたところ、細胞周囲の仮足様突起は減少し、遊走能も低下した。一方、Wnt5bを細胞に作用させると細胞周囲の仮足様突起が増加し、遊走能、浸潤能が亢進し、活性型Cdc42と活性型RhoAの発現は増加した。以上より、SAS-LM8ではβ-カテニン非依存性経路のWnt5bが重要であり、Cdc42とRhoAを活性化して細胞運動能を亢進すると考えられた。

次にEMTを誘導し細胞運動能を亢進させるTGF-βのこれら細胞の運動能に及ぼす影響を調べた。いずれの細胞でも、TGF-βによる細胞形態、細胞間接着、EMT関連因子の発現に変化はなかったが、遊走能は亢進し、仮足様突起の伸展に加えてWnt5b発現の亢進がみられた。したがって、TGF-βはWnt5bの発現を誘導し、β-カテニン非依存性経路の活性化を通じて細胞運動能の亢進に関与する可能性が考えられた。

【結論】本研究から、Wnt5bはWntシグナル伝達経路のうちβ-カテニン非依存性経路を介し口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能に関与しており、その下流に存在するCdc42とRhoAの活性化が重要であることが示唆された。TGF-βによる細胞運動能の亢進にもWnt5bの発現誘導が関与すると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 竹下彰範 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 由良 義明
	副 査 教 授 豊澤 悟
	副 査 准教授 前田 隆史
	副 査 講 師 相川 友直
<b>論文審査の結果の要旨</b>	
<p>本研究は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞から作製された頸部リンパ節転移能が高い細胞株とその親株を用いて、細胞の運動能に対する Wnt と Wnt シグナル伝達経路の関与について検討を行った。さらに、細胞運動に関与するサイトカインとして transforming growth factor-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>) の口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響についても検討を加えた。</p> <p>その結果, Wnt5b は Wnt シグナル伝達経路のうち <math>\beta</math>-カテニン非依存性経路を介し口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能の亢進に関与しており, その下流に存在する Cdc42 と RhoA の活性化が重要であることが示唆された。TGF-<math>\beta</math>による細胞運動能の亢進にも Wnt5b の発現誘導が関与すると考えられた。</p> <p>以上の結果は, 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移のメカニズムの解明に重要な知見を与えるものであり, よって, 博士 (歯学) の学位論文として価値のあるものと認める。</p>	