



Title	口腔扁平上皮癌におけるFatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) の役割
Author(s)	李, 篤史
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34363
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

口腔扁平上皮癌における
Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) の
役割

2014 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科
統合機能口腔科学専攻（口腔外科学第一教室）

李 篤史

略語一覧

ATP, adenosine triphosphate

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

Erk, extracellular signal-regulated kinase

FABPs, fatty acid binding proteins

FABP4, fatty acid binding protein 4

FBS, fetal bovine serum

GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

MAPK, mitogen-activated protein kinase

p-ERK, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase

PBS, phosphate buffered saline

PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma

siRNA, small interfering RNA

SCC, squamous cell carcinoma

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

緒言

Fatty acid binding proteins (FABPs) は脂質シャペロン分子として様々な生理機能を有していることが知られており、少なくとも 9 つのファミリー分子が同定されている¹⁻³⁾。それぞれの FABPs は特異的に臓器や細胞に発現しており、主として脂質を細胞内の特定の場所へ輸送することで細胞の機能に関与している。たとえば、脂肪滴における脂質の貯留、小胞体における膜形成やシグナル伝達、細胞質における酵素活性、核における転写、ミトコンドリアにおける β 酸化、ペルオキシソームにおける酸化などその機能は多岐にわたる¹⁻³⁾。このうち fatty acid binding protein 4 (FABP4) は脂肪細胞、マクロファージ、樹状細胞に特異的に発現していることが知られており^{1, 4)}、これらの細胞において脂質の代謝、炎症反応の制御に関わっている。さらに動脈硬化やメタボリックシンドロームの進展に関わっているとの報告もなされている⁴⁻⁶⁾。

扁平上皮癌は口腔癌の大部分を占める悪性新生物であり、その発生率は年々上昇の一途をたどっている⁷⁻⁹⁾。これまでの扁平上皮癌の研究¹⁰⁻¹⁶⁾において、DNA マイクロアレイによる遺伝子変化の網羅的解析から、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) やそれによって転写制御されている様々な分子、aquaporin、endothelin 等が癌細胞の増殖に関与することを見出してきた¹⁰⁻¹³⁾。さらに、FABP4 の転写の一部も PPAR γ によって制御されていることも明らかになっている^{2, 17)}。近年、FABP4 が卵巣癌や膀胱癌で発現していることが報告され^{18, 19)}、癌においても何らかの重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、口腔癌においては FABP5 が癌細胞の増殖や転移に関与するという報告がなされている^{20, 21)}が、FABP4 の扁平上皮癌における役割についての報告はほとんどないのが現状である。そこで口腔扁平上皮癌における FABP4 の発現、およびその機能を解明することを目的に、舌扁平上皮癌組織及び舌扁平上皮癌由来培養細胞 SAS を用いた研究を行った。

舌扁平上皮癌組織の免疫組織化学染色において、同一組織切片上の非癌部組織と比較して癌部において FABP4 が高発現していることを確認した。また、FABP4 特異的 small interfering RNA (FABP4-siRNA) を設計し、培養細胞における FABP4 発現のノックダウンによる細胞増殖能を検討した。その結果、siRNA 処置群はコントロール群に比べ有意に細胞増殖が抑制された。細胞増殖抑制のメカニズムとして、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介した細胞増殖のシグナルが抑制されることで扁平上皮癌の増殖抑制が引き起こされることが示唆された。また、FABP4 発現ノックダウンにより cleaved-caspase3 の発現が見られ、細胞増殖抑制が apoptosis の影響を受けたことが確認された。しかしながら、細胞あたりの adenosine triphosphate (ATP) 産生量には有意な差はなく、エネルギー代謝の低下による細胞増殖の抑制は確認できなかった。

これらの研究成果は、臨床において困難を極める癌治療に対し、現在治療に使用され

ている抗癌剤が標的とする分子とは異なった分子である FABP4 をターゲットとする新たな抗癌剤の開発の可能性を提示するとともに、今後の FABP4 に関する研究に対し、有用な基礎的情報を提供しうるものと考え、ここに学位論文としてまとめた次第である。

実験材料と方法

1. 組織切片及び免疫組織化学染色

大阪大学歯学部附属病院で倫理委員会の承認後にインフォームドコンセントを取得し、術前化学療法・放射線療法を行っていない舌扁平上皮癌手術症例あるいは転移リンパ節症例のうち、パラフィンブロックとして十分な量の組織検体が残っており、同一切片上で癌と非癌部があるもの、診療録や患者情報がそろっている 27 例をとした（表 1）。27 例のうち男性 17 例、女性 10 例であり、初診時年齢は 30 歳から 92 歳、平均 61.6 ± 16.4 歳（S.D.）であった。組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液（和光純薬、大阪、日本）にて固定し、エタノールによる脱水、キシレンによる透徹、組織包埋用パラフィンによる浸透および包埋を行った。包埋後、厚さ $3 \sim 5 \mu\text{m}$ のパラフィン切片を作製した。脱パラフィン処理の後、インスタントクエン酸緩衝液（三菱化学メディエンス、東京、日本）にて 100°C 1 時間インキュベート後、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて免疫染色を行った。すなわち、3% H₂O₂ 20 分にて内因性ペルオキシダーゼを失活させ、2.5% ウマ血清 30 分にてブロッキング後、100 倍希釈した抗 FABP4 抗体（Bioss Inc., Woburn, MA）を作用させ 4°C で 16 時間インキュベートした。2 次抗体として anti-rabbit / mouse IgG Universal antibody を 30 分間、次いで ABC Reagent を 30 分間反応させた後、3,3'-diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories) を用いて標的タンパクを茶色に発色させた。さらにヘマトキシリソル（武藤化学、東京、日本）にて対比染色を行った。FABP4 の発現強度の判定は、永田・草山・石本らの判定基準を用いた¹⁰⁻¹³。すなわち、0（陽性細胞 10% 以下）、1+（10%～20%）、2++（20%～50%）、3+++（50% 以上）の 4 段階で評価し、ダブルブラインドによりスコア化して評価した。

2. 細胞培養における FABP4 タンパク発現の検討

本研究では舌扁平上皮癌由来培養細胞 SAS を用いて検討を行った。10% ウシ胎仔血清 (FBS: fetal bovine serum, JRH BIOSCIENCES, Lenexa, KS) を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) にて 37°C 5% CO₂ 存在下で培養した。

また、 1×10^6 に調整し、24 時間培養を行った SAS を回収した。PBS にて洗浄後、プロテアーゼインヒビター (Sigma-Aldrich Japan) を含む溶解液 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) にて可溶化し、4°C にて 30 分静置した。その後 4°C 14,000×g で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。上清のタンパク量を Bradford 法にて測定後、Laemmli 法にて 5 分間煮沸し、各々タンパク量 50 μ

g をウェスタンブロッティングの試料とした。これらの試料を SDS-PAGE にて分離後、Immobilon-P Transfer Membranes (Millipore, Bedford, MA) に転写し、5 % スキムミルク (Amersham Biosciences, London, UK) にて 60 分ブロッキングを行った。一次抗体として抗 FABP4 抗体 (Bioss Inc.), 抗 GAPDH (Trevigen, Gaithersburg, MD) を使用し、4 °C で 16 時間インキュベートを行った。二次抗体に HRP 標識 goat 抗 rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) を用いて反応させた後、化学発光法 (ECL detection kit, American Biosciences) にてタンパクの発現を検出した。

3. FABP4 特異的 siRNA 処置による細胞増殖に与える影響の検討

25 塩基の FABP4 特異的 small interfering RNA: FABP4-siRNA を 3 シーケンス (Sequence1, sense strand 5'-CACCAUUAAAUCUGAAAGUACCUUU-3', antisense 5'-AAAGGUACUUUCAGAUUUAAUGGUG-3', Sequence2, sense strand 5'-GAAAGUCAAGAGCACCAUAACCUUA-3', antisense 5'-UAAGGUUAUGGUGCUCUUGACUUUC-3', Sequence3, sense strand 5'-AGGAGUGGGCUUUGGCCACCAGGAAA-3', antisense 5'-UUUCCUGGUGGCAAAGCCCACCUU-3',) (Invitrogen Japan, Tokyo, Japan) 作製した。これらを Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Japan) を用い、最終濃度が 5~40nM となるように FBS (-) のメディウムと混和し、室温にて 20 分インキュベートした。FABP4-siRNA のコントロールとして negative control-siRNA (Stealth RNAi Negative Control Duplex, Invitrogen Japan) と Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Japan) を用い、最終濃度が 5~40nM となるように FBS (-) のメディウムと混和し、室温にて 20 分インキュベートした。それぞれを約 1×10^5 に調整した SAS にトランスフェクションした。処置後 24 時間で FBS (+) のメディウムに交換し、さらに 72 時間培養後に Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Eugene, OR) でセルカウントを行い細胞増殖抑制の評価を行った (図 1)。未処置群の細胞数を 100% とし、FABP4-siRNA 処置群と negative control-siRNA 処置群の細胞増殖の抑制を比較検討した。これら 3 シーケンスのうち、最も効果があったシーケンスを前述の方法で以後の実験で用いた。

4. FABP4-siRNA 処置による MAPK 活性化の検討

SAS に対して FABP4-siRNA、negative control-siRNA (40 nM) を処置し、24 時間後に回収した。前述 2. と同様にウェスタンブロッティングの試料を調製した。各々タンパク量 30 μ g を SDS-PAGE にて分離後、Immobilon-P Transfer Membranes (Millipore, Bedford, MA) に転写し、5 % スキムミルク (Amersham Biosciences, London, UK) にて 60 分ブロッキングを行った。一次抗体として抗

extracellular signal-regulated kinase (Erk) 抗体、抗 p-Erk 抗体 (Cell Signaling), 抗 GAPDH (Trevigen) を使用し、4 °Cで 16 時間インキュベートを行った。二次抗体に HRP 標識 goat 抗 rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling Technologies) を用いて反応させた後、化学発光法にてタンパクの発現を検出した。

5. FABP4-siRNA 処置による apoptosis 経路活性化の検討

SAS に対して FABP4-siRNA、negative control-siRNA (40 nM) を処置し、24 時間後に回収した。前述 4. と同様にウェスタンブロッティングの試料を調製した。各々タンパク量 50 µg を SDS-PAGE にて分離後、前述 4 と同様の過程を行った。一次抗体として抗 Cleaved-caspase 3 抗体 (Cell Signaling)、抗 GAPDH (Trevigen) を使用した。二次抗体を反応させた後、化学発光法にてタンパクの発現を検出した。

また、Lab-Tek II Chamber Slides (Nalge Nunc International, Penfield, NY) 上に SAS を播種し、FABP4-siRNA、negative control-siRNA (40 nM) を 24 時間作用させた後、4%パラホルムアルデヒドにて 15 分固定を行った。その後、VECTASHIELD Mounting Medium with PI (Vector Laboratories) を滴下し propidium iodide による核の染色を行い、蛍光顕微鏡 (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて Apoptosis による核の形態観察を行った。

6. FABP4-siRNA 処置による ATP 産生量へ与える影響の検討

SAS に対して FABP4-siRNA、negative control-siRNA (40 nM) を処置し、24 時間後に回収し、細胞数を Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) でセルカウントカウントした。セルカウントで使用した細胞懸濁液 100µl を『細胞の』 ATP 測定試薬 (東洋ビーネット、東京、日本) 100µl と 96 穴プレートで混合し、TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader (Berthold Japan, Tokyo, Japan) で発光量の測定を行った。発光量から ATP 量を定量し細胞あたりの ATP 量を算出した。

7. 統計処理

統計処理として、Student-t 検定、あるいは一元配置分散分析 (ANOVA) 解析の後、Scheff's method を用いた。結果は平均値±標準誤差で示し、危険率 5%未満を統計学的に有意差ありと判断した。

結果

1. 口腔扁平上皮癌組織および培養細胞における FABP4 の発現

抗 FABP4 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、染色を行った舌扁平上皮癌症例 27 例中 21 例において、非癌部組織においては、発現はほとんど認められなかつた（表 1、図 2A、上）。一方、同一組織切片上の癌部において FABP4 の発現が認められた（図 2A、下）。癌部・非癌部における FABP4 の発現強度をスコア化したところ、癌部と非癌部の間で両者の発現強度に有意な差が認められた（図 2B）。転移リンパ節においても同様に、癌細胞で FABP4 の発現が認められた（図 3A）。27 例の組織切片を分化度別に比較検討したところ、各群において統計学的有意差は認めなかつたものの、低分化なほど平均スコアは増加傾向にあつた（図 3B）。転移の有無で原発巣の FABP4 発現を比較したところ、統計学的有意差は認めなかつたものの、転移あり症例の方が平均スコアは高値であった。（図 3C）。

また、FABP4 の発現と、年齢・性別・飲酒歴・喫煙歴との関連性について検討したところ、有意な関連性は認められなかつた（表 1、図 4A～C）。

2. 舌扁平上皮癌由来培養細胞 SAS における FABP4 の発現

舌扁平上皮癌由来培養細胞 SAS における FABP4 の発現をウェスタンブロッティング法にて検討したところ、FABP4 の発現を認めた（図 6、左）。

結果 1、2 より、FABP4 の高発現は口腔扁平上皮癌において何らかの役割を果たしていることが示唆された。

3. FABP4-siRNA の各シーケンスによる細胞増殖抑制効果

作成した 3 種類の FABP4 特異的 siRNA の効果を判定するため、SAS に対し 3 種の FABP4-siRNA でそれぞれ処置して Negative control-siRNA を処置した群と比較し細胞の増殖能を検討した。位相差顕微鏡での観察写真では、いずれのシーケンスも negative control 群に比べて細胞増殖抑制されているのが観察された（図 5A）。実際に negative control に対する細胞数の割合で比較するとシーケンス 3 が最も細胞増殖を抑制した。以後の実験ではシーケンス 3 を用いて実験を行つた。

4. FABP4-siRNA による FABP4 ノックダウンが細胞増殖に及ぼす影響

実験 3 で最も効果があつた FABP4-siRNA を用いて SAS に対して処理を行つた。ウェスタンブロッティングの結果、FABP4-siRNA 処理により FABP4 のタンパク発現がノックダウンされているのを確認した（図 6、右）。

さらに FABP4 を特異的にノックダウンするため、SAS に対し FABP4-siRNA 処置

して Negative control-siRNA を処置した群と比較し細胞の増殖能を検討した。その結果、FABP4-siRNA 処置により濃度依存的に細胞増殖が抑制された(図 7A)。また、40 nM の FABP4-siRNA を処置した細胞群で、有意な細胞増殖の抑制を認めた(図 7B)。位相差顕微鏡での観察写真では siRNA 処置群では死細胞が浮遊しているのが散見された(図 7C)。

5. FABP4-siRNA による FABP4 ノックダウンが MAPK 活性化に及ぼす影響

FABP4 ノックダウンによる細胞増殖抑制のメカニズムの一つとして MAPK 経路に寄与するリン酸化タンパク Erk の活性化を検討した。negative control 群と比べ処置群において、p-Erk 発現量の低下を認めた(図 8、中段)。また、Erk 自体の発現も若干の抑制傾向が認められた(図 8、上段)。このことから Erk のリン酸化抑制と、Erk の発現抑制が起こっていることが確認された。

6. FABP4-siRNA による FABP4 ノックダウンが apoptosis に及ぼす影響

FABP4 ノックダウンにより Cleaved-caspase 3 の発現が認められた(図 9A)。また、核の形態を観察したところ、negative control 群では核の形態が保たれている像が多く見られたのに対して、FABP4-siRNA 処置群では核の凝集が多数認められた。これらの結果から FABP4 ノックダウンにより apoptosis が引き起こされている可能性が示唆された(図 9B)。

7. FABP4-siRNA による FABP4 ノックダウンがエネルギー産生に及ぼす影響

FABP4 ノックダウンによるエネルギー産生への影響を検討するため、細胞あたりの ATP 量を算出した。その結果、FABP4-siRNA 処置群では細胞あたりの ATP 量の減少傾向が見られたものの、統計学的有意差は認められなかった(図 10)。FABP4 ノックダウンによりエネルギー産生抑制は本実験では確認できなかった。

考察

FABPs は脂質を細胞内の特定の場所へ輸送することで細胞の様々な機能に関与している。このうち FABP4 は脂肪細胞、マクロファージ、樹状細胞に発現し、脂質代謝、炎症に関わっている。近年、卵巣癌や膀胱癌で発現していることが報告され^{18, 19)}、癌においても何らかの役割を果たしていることがわかってきた。しかしながら、依然として癌細胞、特に扁平上皮癌における FABP4 の発現と機能についての報告はほとんどない。そこでまず、舌扁平上皮癌組織を用いて FABP4 の発現を免疫組織化学染色により検討した。その結果、FABP4 は非癌部に比べて癌部に有意に高発現していた。一方、分化度の違いによって発現強度を比較したところ、高分化、中分化、低分化の各群間に有意な差は認められなかった。また、年齢・性別・飲酒歴・喫煙歴などの因子と FABP4 の発現強度との関連性は認めなかった。以上のことから、これらの因子は FABP4 の癌部での発現に直接的な関連性はないものと考えられた。一方、転移リンパ節において 12 例全例に原発巣、転移巣ともに FABP4 の発現を認めた。原発巣の FABP4 発現強度を転移の有無で比較したところ、平均スコアは転移有り群の方が高値であったが、両群間に統計学的有意差を認めなかった。今回は症例数が少なく有意な差は認めなかつたが、FABP4 と転移との関連性については卵巣癌で報告²²⁾があり、今後さらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

培養細胞 SASにおいて、FABP4 のタンパク発現が認められた。このことから FABP4 が扁平上皮癌において何らかの役割を果たしていることが示唆された。そこで、FABP4 特異的 siRNA で FABP4 のノックダウンを行ったところ、SAS の増殖抑制が確認された。FABP4 の転写の一部は PPAR γ によって制御されており^{2, 17)}、これまでの一連の研究で PPAR γ によって転写制御されている分子が癌の増殖に関わっていることを報告¹⁰⁻¹⁴⁾している。今回の結果とこれまでの報告から、FABP4 は癌細胞の増殖に強く関わっていると考えられた。

癌細胞において MAPK 経路は重要な役割を果たしている。MAPK 経路は酵母から哺乳動物まで高度に保存されたシグナル伝達経路で、細胞の増殖、生存、分化、炎症など様々な細胞機能を調節している。ヒトには少なくとも Erk 経路、p38 経路、JNK 経路という 3 種類の MAP キナーゼ・カスケードが存在している²²⁾。これらの経路のうち Erk 経路は上流に癌遺伝子である Ras が存在していることからも、癌の増殖に強くかかわっていることが考えられる^{23, 24)}。そこで本研究において、FABP4 ノックダウンにより Erk のリン酸化が抑制されることを確認された。これは PPAR γ の下流分子のノックダウンにより p-Erk の発現が抑制されたという報告^{10-14, 16)}と合致するものである。また、FABP4 ノックダウンにより Erk の発現自体も抑制された。これは FABP4 が直接 Erk の転写に関与している可能性を示唆している。

つぎに細胞増殖抑制がアポトーシスの影響を受けたかどうか検討するため、アポトーシスの指標である Cleaved-caspase3 の発現を検討した。Caspase3 は開裂することにより活性化され、核の凝集を引き起こしアポトーシスを惹起する^{25, 26)}。本研究では FABP4-siRNA 処置群において Cleaved-caspase3 の発現を認めた。さらに、Propidium iodide による核の染色を行ったところ、FABP4-siRNA 処置群において核の凝集が数多く認められた。以上から FABP4 ノックダウンによりアポトーシスを起こしていることが示唆された。

癌細胞のエネルギー代謝は Warburg effect によって解糖系が亢進しており、糖質が重要であると言われている²⁷⁻²⁹⁾。近年、乳癌、前立腺癌、卵巣癌などの腺癌において増殖にはエネルギー源として糖質だけでなく脂質の供給が重要な役割を果たしていることがわかつってきた^{18, 30-33)}。脂質は脂肪細胞から癌細胞へ FABPs を介して輸送され、ミトコンドリアにおいて β 酸化によって代謝され ATP が産生される。本研究では FABP4 ノックダウンによる ATP 産生量について検討したが、FABP4-siRNA 処置群において若干細胞あたりの ATP 量が減少したものの有意な差は認めなかった。これは口腔扁平上皮癌においては Warburg effect によって解糖系が亢進しており、十分な ATP 供給がなされているためであると考えられた。しかしながら、癌細胞内で FABP4 がどのようにエネルギー代謝に関わっているかの詳細は不明であり、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

これまでの研究では癌細胞における FABP4 の役割は増殖、転移に必要なエネルギーを得るために、脂肪細胞から脂質の輸送をするというものであった¹⁸⁾。しかしながら本研究では、癌細胞に高発現している FABP4 は脂質のやり取りだけではなく、増殖に関わる Erk 経路の活性化やアポトーシスの調整に関与するなど、様々なメカニズムで癌細胞の増殖に関わっている可能性を明らかにした（図 11）。FABPs には様々な機能があり、FABP4 が癌細胞において増殖に関わるメカニズムも多様であると考えられる。したがって、今後より詳細なメカニズムの解明が必要であると考えられる。

本研究では口腔扁平上皮癌組織および口腔扁平上皮癌由来培養細胞において FABP4 の発現を確認し、口腔扁平上皮癌における FABP4 の役割について解明した。FABP4 は口腔癌治療において新たなターゲット分子となりうることを明らかとした。

総括

口腔扁平上皮癌組織、舌扁平上皮癌由来培養癌細胞 SASにおいて、FABP4 が高発現していることを確認した。また、FABP4 特異的 siRNA による FABP4 ノックダウンにより、癌細胞の増殖抑制を確認した。そのメカニズムの一つとして、MAPK 経路のシグナル伝達系の抑制、アポトーシスの惹起、エネルギー代謝の抑制が関与していることが示唆された。以上の結果より、FABP4 の発現阻害は、口腔扁平上皮癌の増殖に対し抑制的に作用することを明らかにした。

本論文の要旨の一部は、

Oncology Reports . 31: 1116-1120, 2014
に掲載された。

さらに、

第 58 回日本口腔外科学会総会（2013 年 10 月・福岡）および、
The 21st edition of the International Conference on Oral and Maxillofacial
Surgery (October, 2013, Barcelona, Spain)
第 87 回日本薬理学会年会（2014 年 3 月・仙台）
にて発表した。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院 歯学研究科 統合機能口腔科学専攻 顎口腔病因病態制御学講座 古郷幹彦 教授（口腔外科学第一教室）、上嶋善規 教授（薬理学教室）に深甚なる謝意を表します。

また本研究の進行にあたり、終始御教示・御指導頂きました、大阪大学大学院 歯学研究科 統合機能口腔科学専攻 顎口腔病因病態制御学講座 和田孝一郎 准教授（薬理学教室）に深甚なる謝意を表します。

本研究に関して、貴重なる御指導・御助言を賜りました大阪大学大学院 歯学研究科 統合機能口腔科学専攻 顎口腔病因病態制御学講座 大倉正也 准教授（口腔外科学第一教室）に心より御礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたり、多大なご協力を頂きました大阪大学大学院 歯学研究科 統合機能口腔科学専攻 顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室・薬理学教室）の教室内員の皆様に、厚く御礼申し上げます。

最後に、平日の深夜や休日まで研究の時間を与えてくれた妻に感謝いたします。

引用文献

1. Furuhashi M and Hotamisligil GS: Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 489-503, 2008.
2. Schroeder F, Petrescu AD, Huang H, *et al*: Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids* **43**: 1-17, 2008.
3. Storch J and Thumser AE: The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1486**: 28-44, 2000.
4. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, *et al*: Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* **274**: 1377-1379, 1996.
5. Makowski L, Boord JB, Maeda K, *et al*: Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* **7**: 699-705, 2001.
6. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, *et al*: Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* **141**: 3388-3396, 2000.
7. Prince S and Bailey BM: Squamous carcinoma of the tongue: review. *Br J Oral Maxillofac Surg* **37**: 164-174, 1999.
8. Okura M, Hiranuma T, Adachi T, *et al*: Induction chemotherapy is associated with an increase in the incidence of locoregional recurrence in patients with carcinoma of the oral cavity: results from a single institution. *Cancer* **82**: 804-815, 1998.
9. Goepfert H: Squamous cell carcinoma of the head and neck: past progress and future promise. *CA Cancer J Clin* **48**: 195-198, 1998.
10. Ishimoto S, Wada K, Usami Y, *et al*: Differential expression of aquaporin 5 and aquaporin 3 in squamous cell carcinoma and adenoid cystic carcinoma. *Int J Oncol* **41**: 67-75, 2012.
11. Ishimoto S, Wada K, Tanaka N, *et al*: Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **40**: 1011-1019, 2012.
12. Kusayama M, Wada K, Nagata M, *et al*: Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **102**: 1128-1136, 2011.
13. Nagata M, Wada K, Nakajima A, *et al*: Role of myeloid cell leukemia-1 in cell growth of squamous cell carcinoma. *J Pharmacol Sci* **110**: 344-353, 2009.

14. Ishida H, Wada K, Masuda T, *et al*: Critical role of estrogen receptor on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **98**: 636-643, 2007.
15. Takahashi H, Fujita K, Fujisawa T, *et al*: Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of invasive properties. *Cancer Sci* **97**: 854-860, 2006.
16. Masuda T, Wada K, Nakajima A, *et al*: Critical role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**: 4012-4021, 2005.
17. Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, *et al*: Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* **22**: 5114-5127, 2002.
18. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, *et al*: Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* **17**: 1498-1503, 2011.
19. Boiteux G, Lascombe I, Roche E, *et al*: A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *Int J Cancer* **124**: 1820-1828, 2009.
20. Fang LY, Wong TY, Chiang WF and Chen YL: Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **39**: 342-348, 2010.
21. Uma RS, Naresh KN, D'Cruz AK, *et al*: Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue is associated with down-regulation of epidermal fatty acid binding protein (E-FABP). *Oral Oncol* **43**: 27-32, 2007.
22. Roux PP and Blenis J: ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-344, 2004.
23. Santarpia L, Lippman SM and El-Naggar AK: Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **16**: 103-119, 2012.
24. Roberts PJ and Der CJ: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**: 3291-3310, 2007.
25. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, *et al*: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43, 1995.

26. Fernandes-Alnemri T, Litwack G and Alnemri ES: CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* **269**: 30761-30764, 1994.
27. Gatenby RA and Gillies RJ: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**: 891-899, 2004.
28. Kim JW and Dang CV: Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* **66**: 8927-8930, 2006.
29. Zhang C, Liu J, Liang Y, *et al*: Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat Commun* **4**: 2935, 2013.
30. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B and Lengyel E: Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1831**: 1533-1541, 2013.
31. Dirat B, Bochet L, Dabek M, *et al*: Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* **71**: 2455-2465, 2011.
32. Tokuda Y, Satoh Y, Fujiyama C, *et al*: Prostate cancer cell growth is modulated by adipocyte-cancer cell interaction. *BJU Int* **91**: 716-720, 2003.
33. Manabe Y, Toda S, Miyazaki K and Sugihara H: Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol* **201**: 221-228, 2003.

図表凡例

図1 FABP4特異的siRNA処置による細胞増殖抑制の検討のためのプロトコール

- ① FBS (−) のメディウムで24時間培養し、その後FBS (+) のメディウムで72時間培養
- ② FBS (−) のメディウムで negative control を培養細胞にトランスフェクションし、その後FBS (+) のメディウムで72時間培養
- ③ FBS (−) のメディウムで siRNA を培養細胞にトランスフェクションし、その後FBS (+) のメディウムで72時間培養

図2 舌扁平上皮癌におけるFABP4の発現（1）

A: 同一切片上における、非癌部（上段）と癌部（下段）でのFABP4の発現。茶色が陽性を示す。腫瘍細胞の細胞質にタンパク発現を認める。症例は表1の11。

B: 非癌部と癌部でのFABP4発現のスコア分布。

「●」は各症例のスコア分布、水平線はスコア平均値を表す。 ** ; P<0.01

図3 舌扁平上皮癌におけるFABP4の発現（2）

A: リンパ節転移の癌部におけるFABP4の発現。茶色が陽性を示す。

症例1は表1の11、症例2は表1の03。

B: 癌部における各分化度でのFABP4の発現の比較。「●」は各症例のスコア分布、水平線はスコア平均値を表す。

C: リンパ節転移の有無による原発巣FABP4の発現の比較。「●」は各症例のスコア分布、水平線はスコア平均値を表す。

図4 FABP4の発現と臨床データとの関連性

A: 年齢とFABP4発現の散布図。図内の直線は相関直線、左上に相関直線の一次式と相関係数を示す。

B: 飲酒の有無による原発巣FABP4の発現の比較。「●」は各症例のスコア分布、水平線はスコア平均値を表す。

C: 喫煙の有無による原発巣FABP4の発現の比較。「●」は各症例のスコア分布、水平線はスコア平均値を表す。

図5 siRNA各シーケンスの細胞増殖抑制効果

A : SASに対し negative control (20nM) および各シーケンスのFABP4-siRNA (20nM) で24時間処置し、その後72時間培養したときの、細胞の位相差顕微鏡像。

B : 各シーケンスの細胞増殖抑制の検討。negative control群の細胞数を100%とし、FABP4-siRNA 処置群の細胞数を%標記した。

図6 SASにおけるFABP4の発現

左 : Non-siRNA control におけるFABP4発現のウエスタンブロッティング法による確認。GAPDH はタンパク量が等しいことを示す。

右 : FABP4-siRNA処置によるFABP4ノックダウンのウエスタンブロッティング法による確認。GAPDH はタンパク量が等しいことを示す。

図7 FABP4特異的siRNA処置による細胞増殖の抑制

A : SASに対しFABP4-siRNAで24時間処置し、その後72時間培養したときのFABP4-siRNAによる細胞増殖抑制の濃度依存的効果。未処置群の細胞数を100%とし、FABP4-siRNA 処置群の細胞数を%標記した。

B : SASに対しFABP4-siRNA (40nM) で24時間処置し、その後72時間培養したときの細胞増殖抑制の検討。未処置群の細胞数を100%とし、 negative control 群およびFABP4-siRNA 処置群の細胞数を%標記した。Error bar は±S.E.を示す。

** ; P<0.01

C : SASに対し negative control (40nM) および FABP4-siRNA (40nM) で24時間処置し、その後72時間培養したときの、細胞の位相差顕微鏡像。

図8 FABP4特異的siRNA処置によるErk、p-ERKの発現の変化

SASに対し FABP4-siRNA 処置したときの、Erk、p-ERK 発現のウエスタンブロッティング法による確認。GAPDH はタンパク量が等しいことを示す。

図9 FABP4特異的siRNA処置によるapoptosisへの影響

A : SASに対し FABP4-siRNA 処置したときの、cleaved-caspase 3 発現のウエスタンブロッティング法による確認。GAPDH はタンパク量が等しいことを示す。

B : SASに対し FABP4-siRNA 処置したときの、細胞の蛍光顕微鏡像。赤は核内のDNAを示す。

図10 FABP4特異的siRNA処置による細胞内ATP量の変化

SASに対しFABP4-siRNAで24時間処置し、その後72時間培養したときの細胞あたりのATP量。Negative control 群の細胞あたりのATP量を100%とし、FABP4-siRNA 処置群の細胞あたりのATP量を%標記した。Error bar は±S.E.を示す。

図11 FABP4特異的siRNA処置による細胞増殖の抑制のメカニズム（模式図）

×印は FABP4 をノックダウンした時の阻害を表す。

Case no.	Age / Gender	Differentiation	FABP4 expression				
			Tumor area	Non-tumor area	Drinking	Smoking	Metastasis
01	78/F	Well-differentiated SCC	1	0	-	-	+
02	34/M	Well-differentiated SCC	1	0	+	+	+
03	71/M	Well-differentiated SCC	1	0	+	+	+
04	69/M	Well-differentiated SCC	0	0	+	-	-
05	71/F	Well-differentiated SCC	1	0	-	-	-
06	64/M	Well-differentiated SCC	0	0	+	-	-
07	72/M	Well-differentiated SCC	2	0	-	+	-
08	46/F	Well-differentiated SCC	2	0	-	-	-
09	79/M	Well-differentiated SCC	1	1	+	+	-
10	57/M	Well-differentiated SCC	1	1	+	+	-
11	61/F	Moderately differentiated SCC	1	0	+	+	+
12	68/F	Moderately differentiated SCC	2	0	-	-	+
13	47/M	Moderately differentiated SCC	1	0	+	-	+
14	61/M	Moderately differentiated SCC	1	0	-	-	+
15	72/M	Moderately differentiated SCC	1	0	-	+	+
16	77/M	Moderately differentiated SCC	1	2	-	-	+
17	83/F	Moderately differentiated SCC	3	2	-	-	+
18	41/F	Moderately differentiated SCC	0	0	-	+	-
19	92/F	Moderately differentiated SCC	1	0	-	+	-
20	55/F	Poorly differentiated SCC	2	0	+	+	+
21	30/M	Poorly differentiated SCC	2	1	+	+	+
22	33/M	Poorly differentiated SCC	0	0	+	-	-
23	51/F	Poorly differentiated SCC	0	0	-	-	-
24	52/M	Poorly differentiated SCC	2	0	+	+	-
25	38/M	Poorly differentiated SCC	0	0	+	+	-
26	67/M	Poorly differentiated SCC	3	2	+	+	-
27	65/M	Poorly differentiated SCC	1	3	-	-	-

表 1 本研究で用いた舌扁平上皮癌症例のプロフィールと免疫組織化学染色

各症例における年齢、性別、分化度、FABP4 の発現、飲酒、喫煙、リンパ節転移の有無を一覧表に示す。

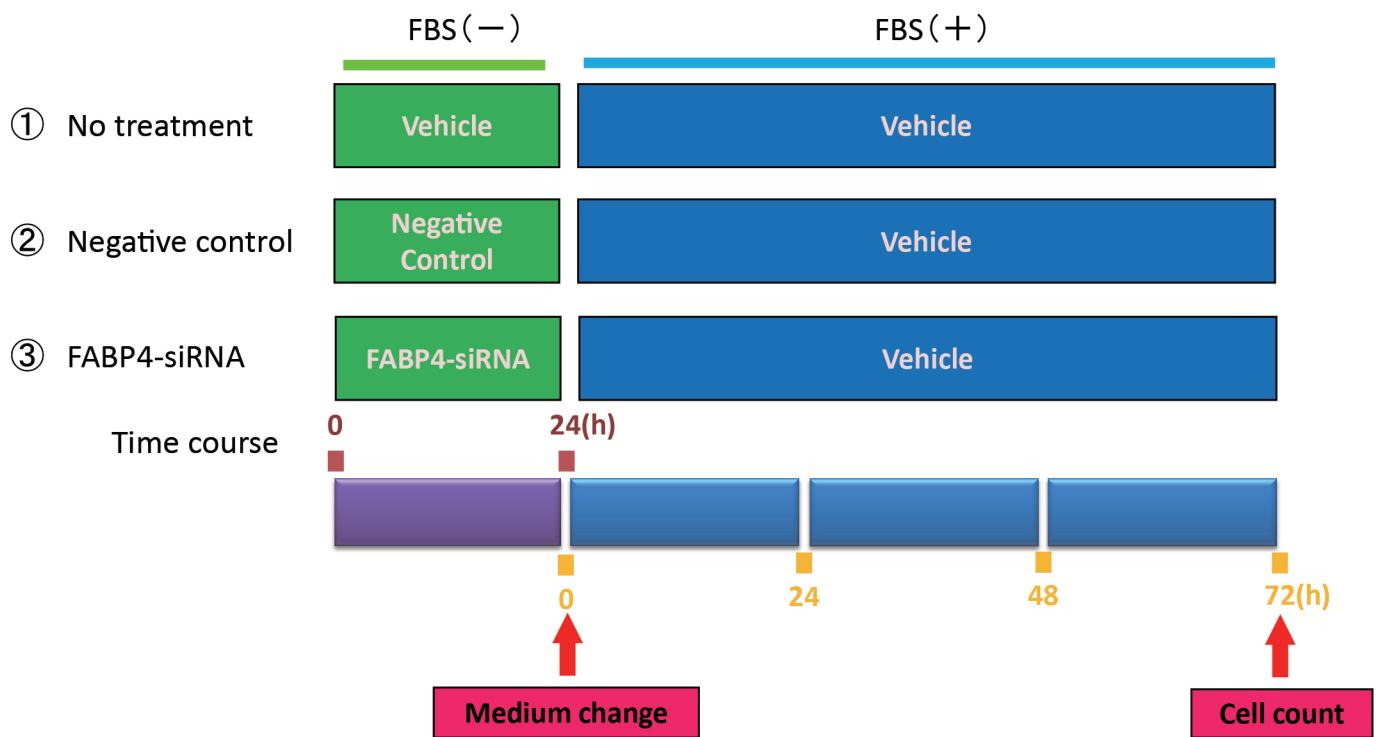
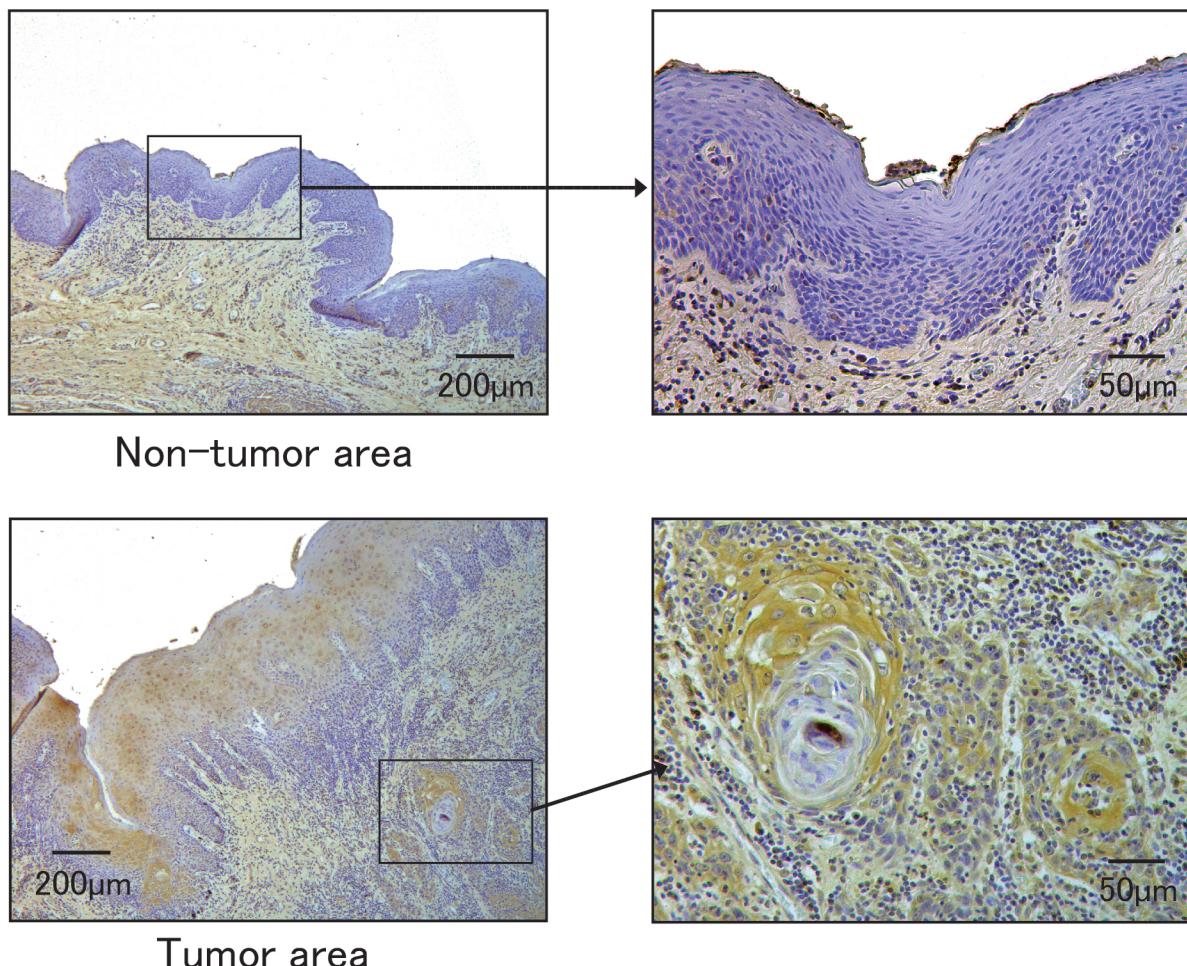


図1 FABP4特異的 siRNA 処置による細胞増殖抑制の検討のためのプロトコール

A

Non-tumor area

Tumor area

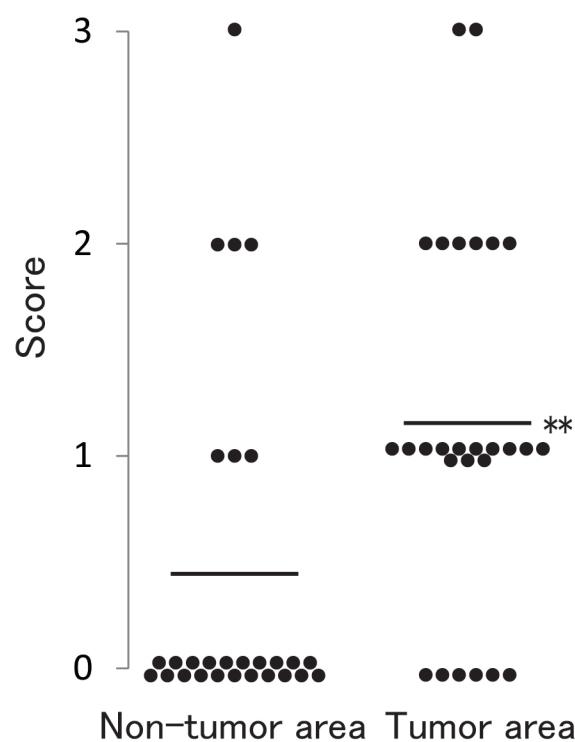
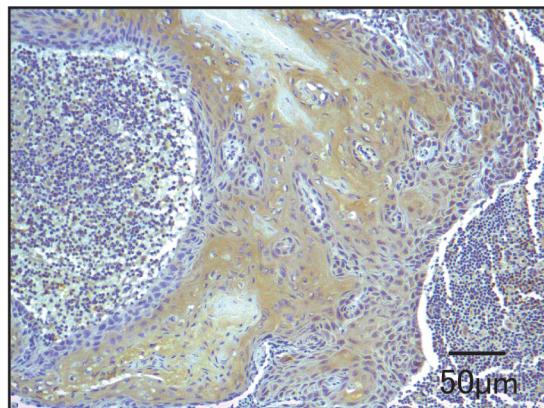
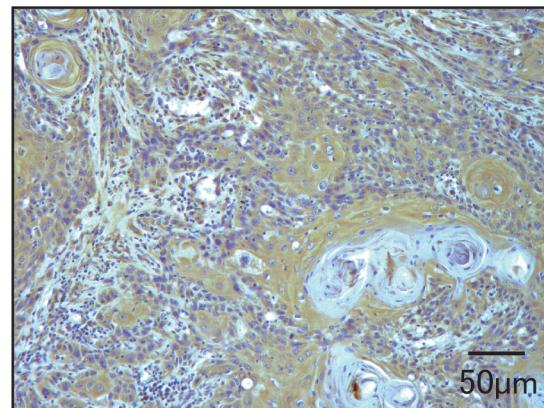
B

図2 舌扁平上皮癌におけるFABP4の発現（1）

A

Case 1



Case 2

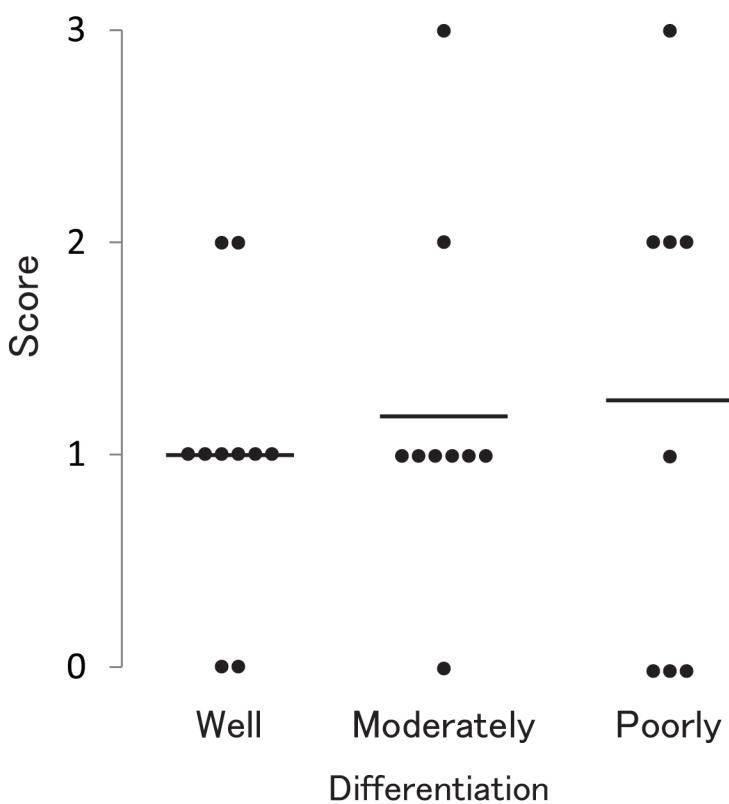
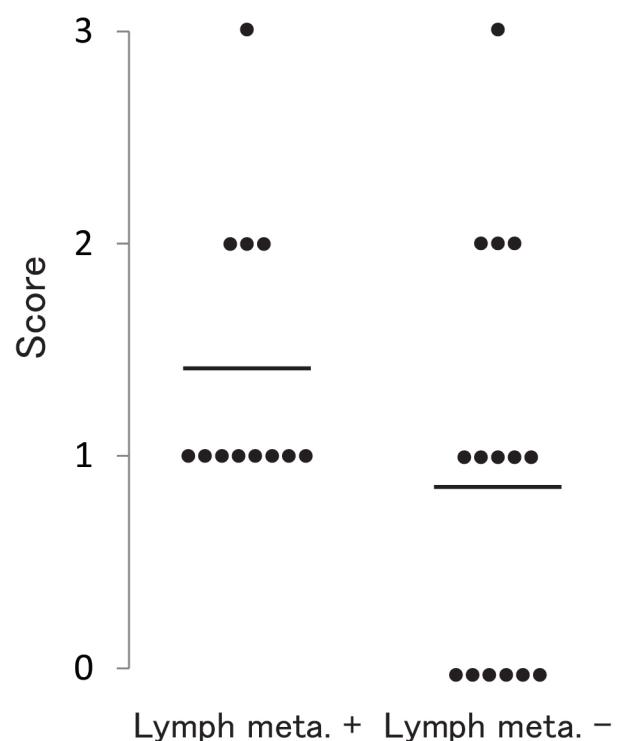
B**C**

図3 扁平上皮癌におけるFABP4の発現（2）

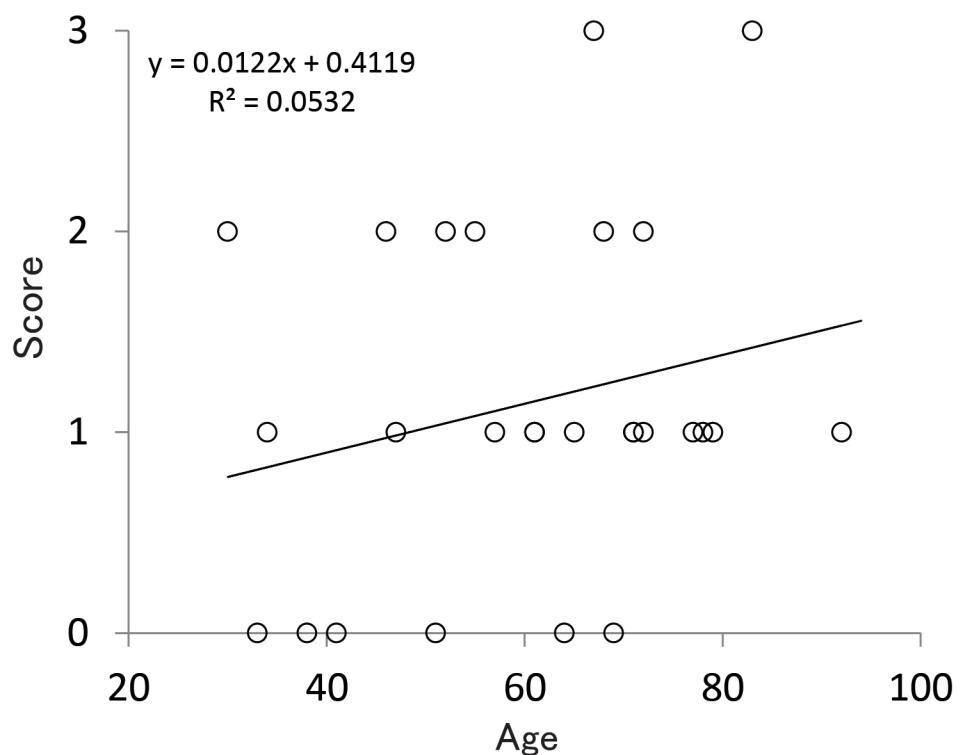
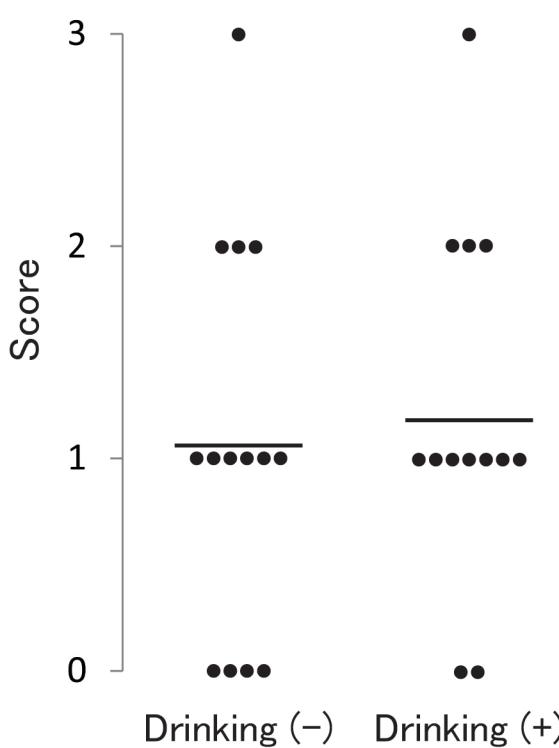
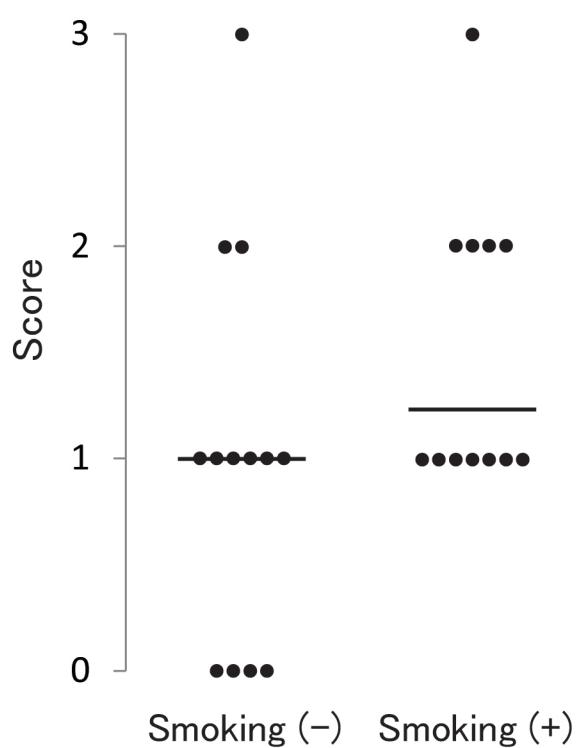
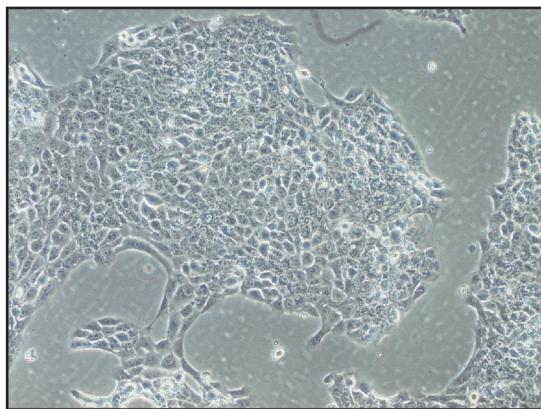
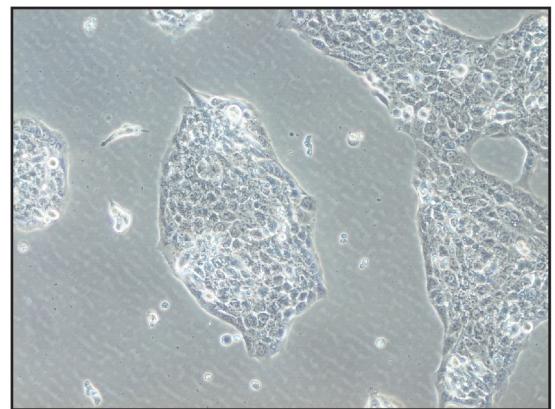
A**B****C**

図4 FABP4 の発現と臨床データとの関連性

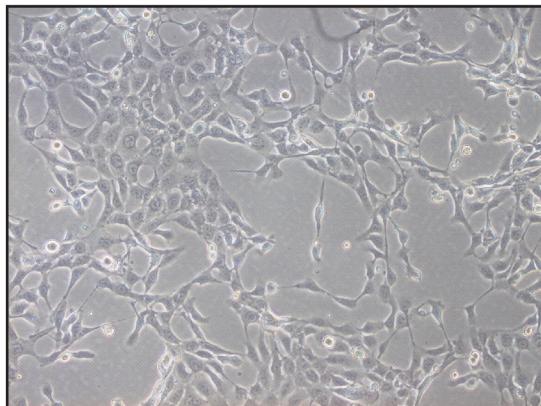
A



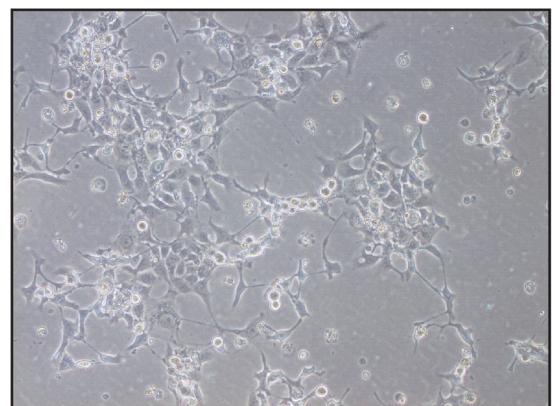
Negative control



Sequence 1



Sequence 2



Sequence 3

B

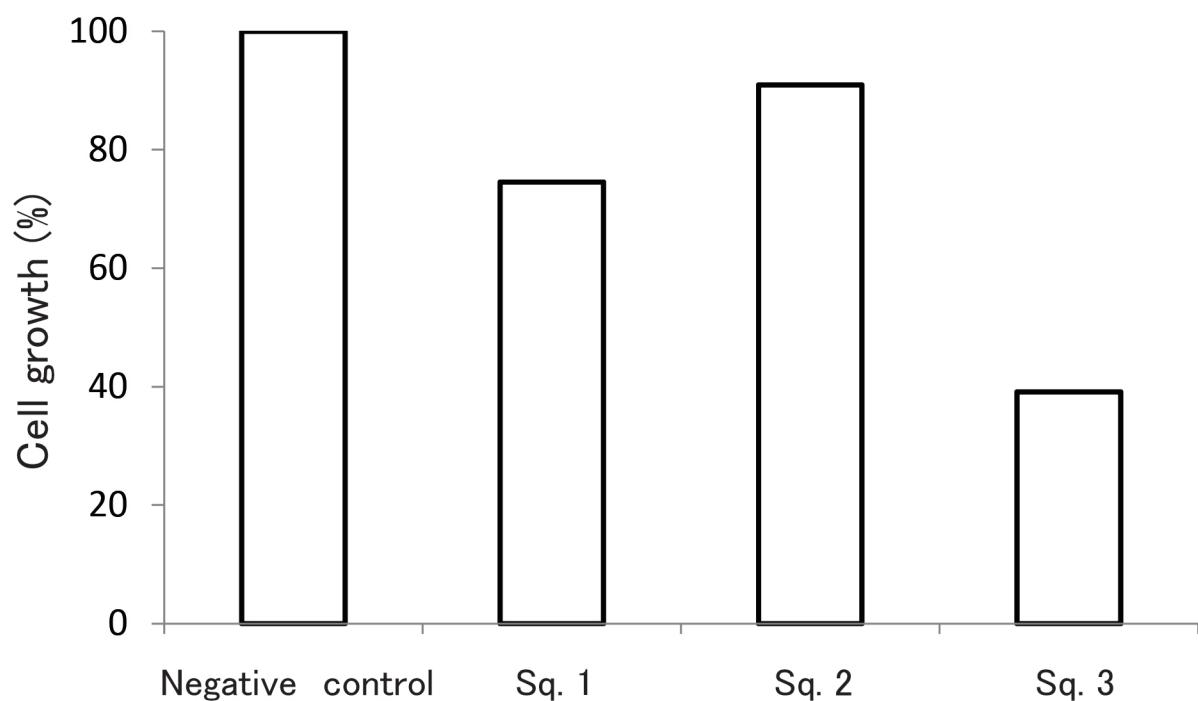


図5 siRNA 各シーケンスの細胞増殖抑制効果

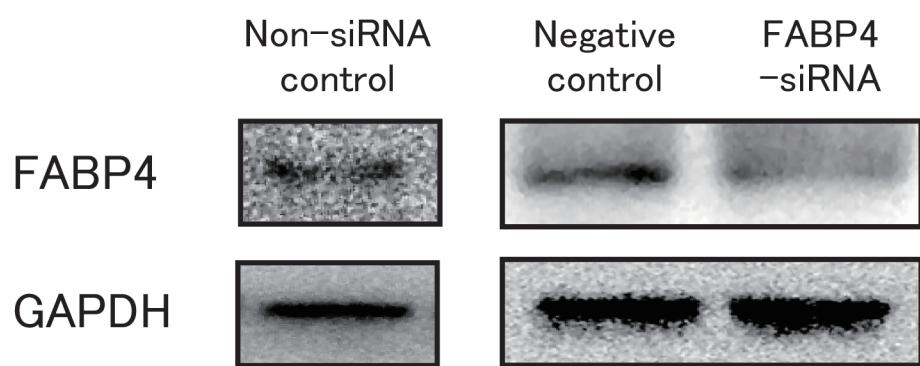


図6 SASにおけるFABP4の発現とFABP4特異的siRNAによるタンパク量の変化

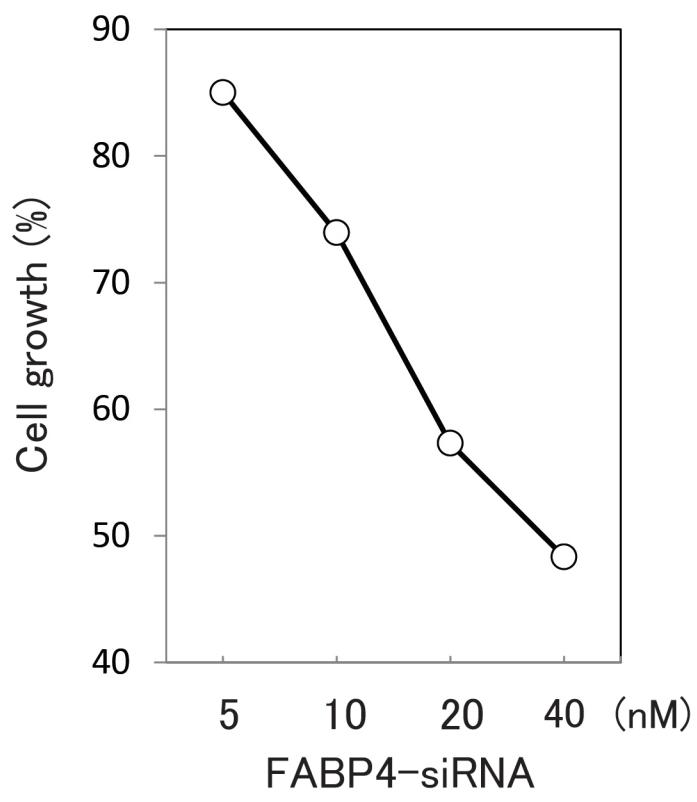
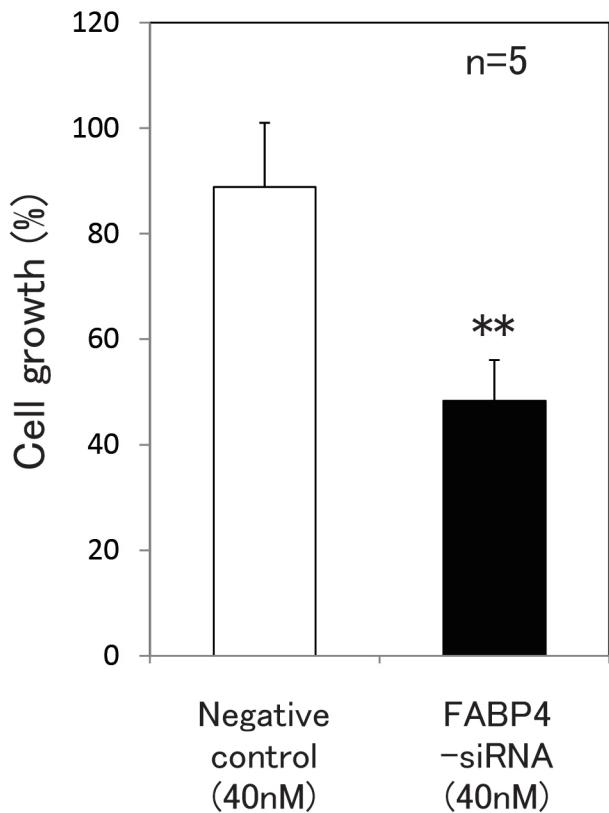
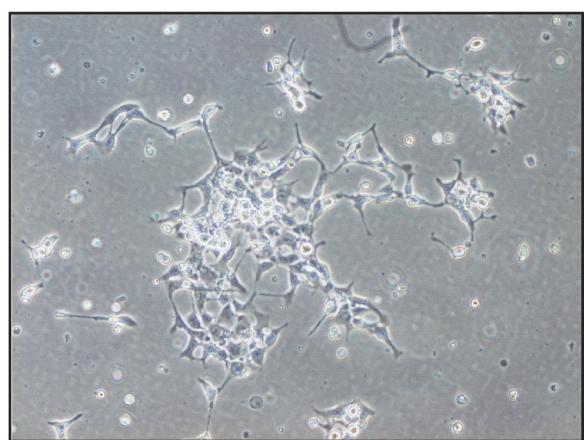
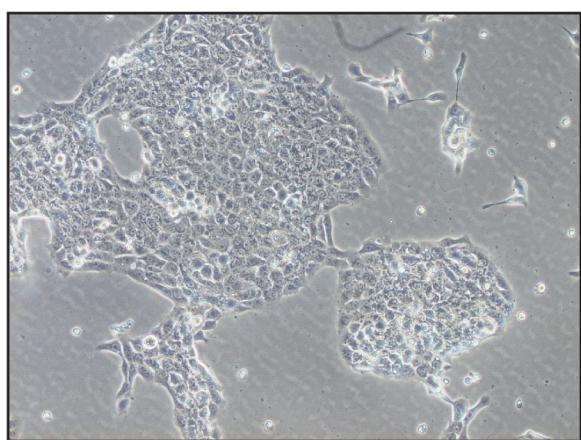
A**B****C**

図7 FABP4 特異的 siRNA 処置による細胞増殖の抑制

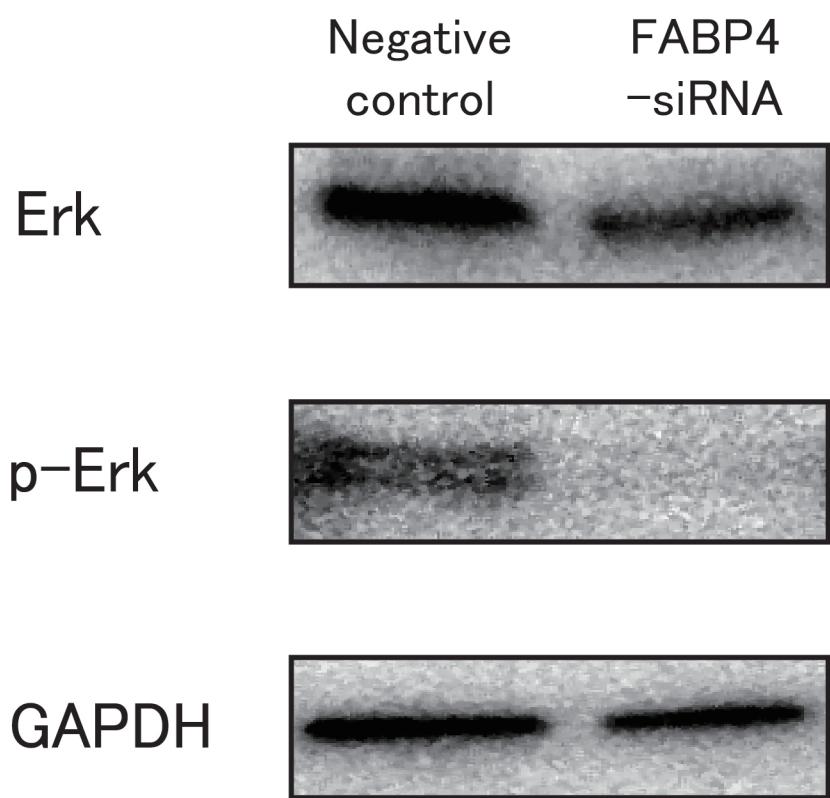
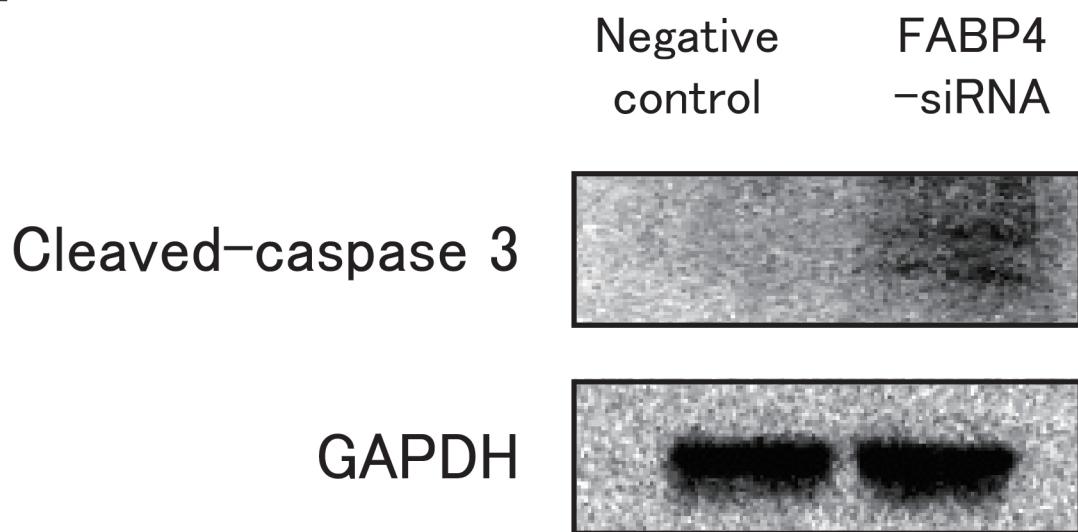


図8 FABP4 特異的 siRNA 処置による Erk、p-Erk の発現の変化

A



B

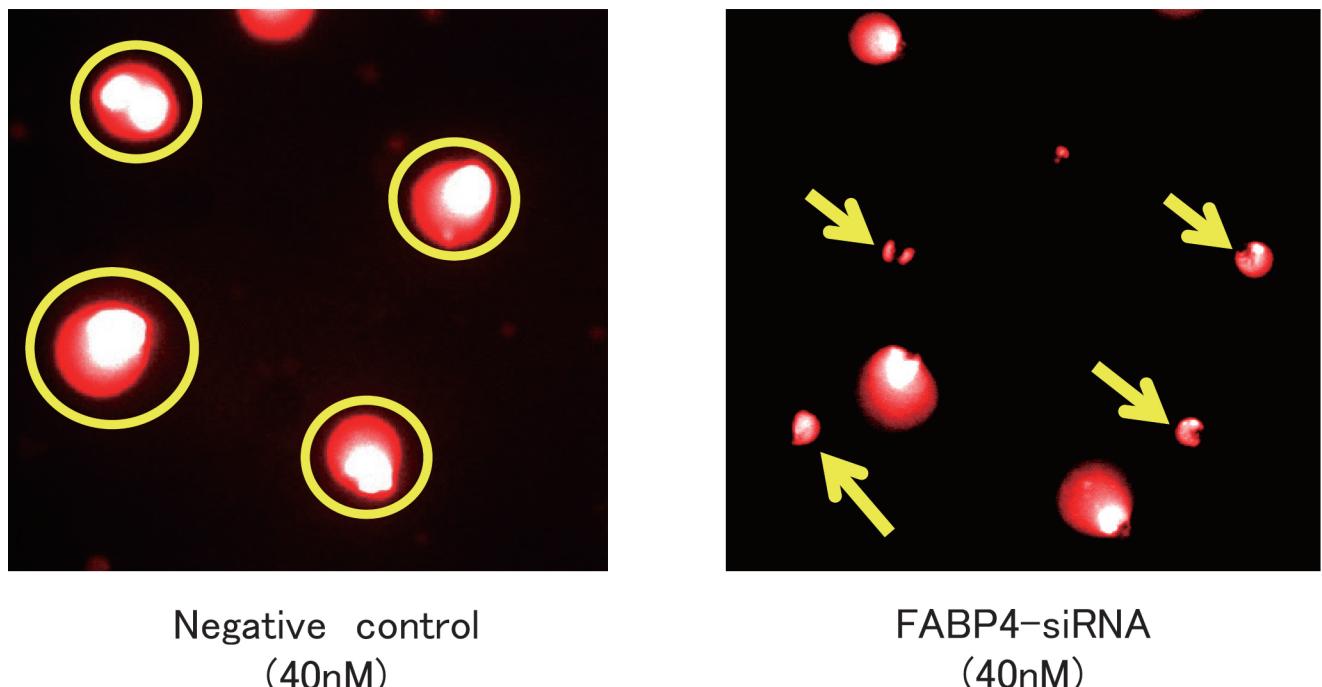


図9 FABP4 特異的 siRNA 処置による apoptosis への影響

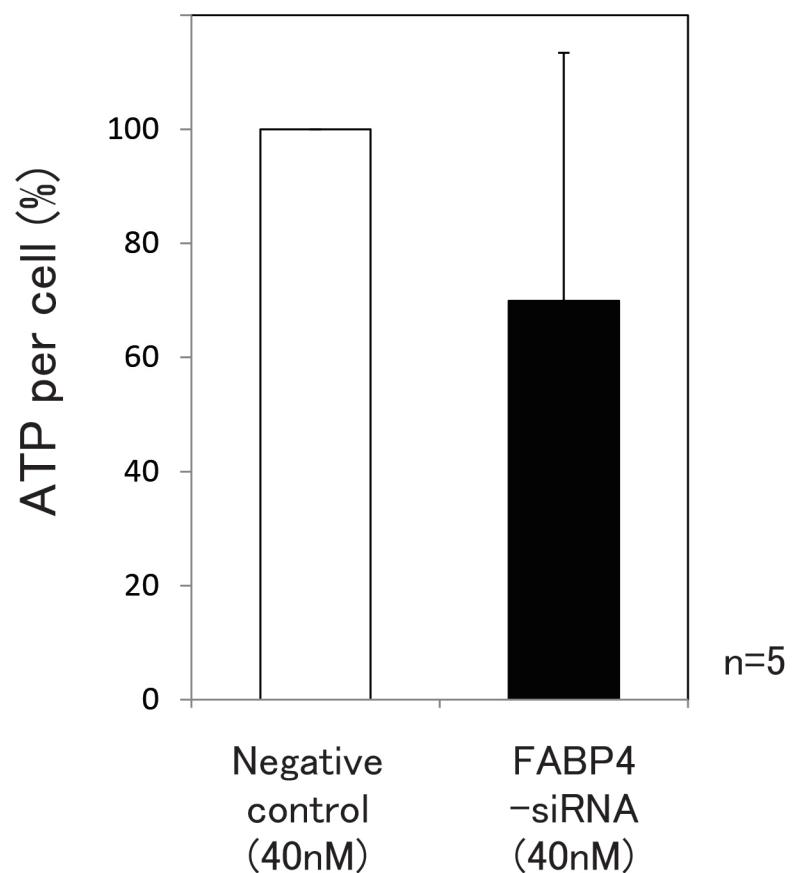


図10 FABP4 特異的 siRNA 処置による細胞内 ATP 量の変

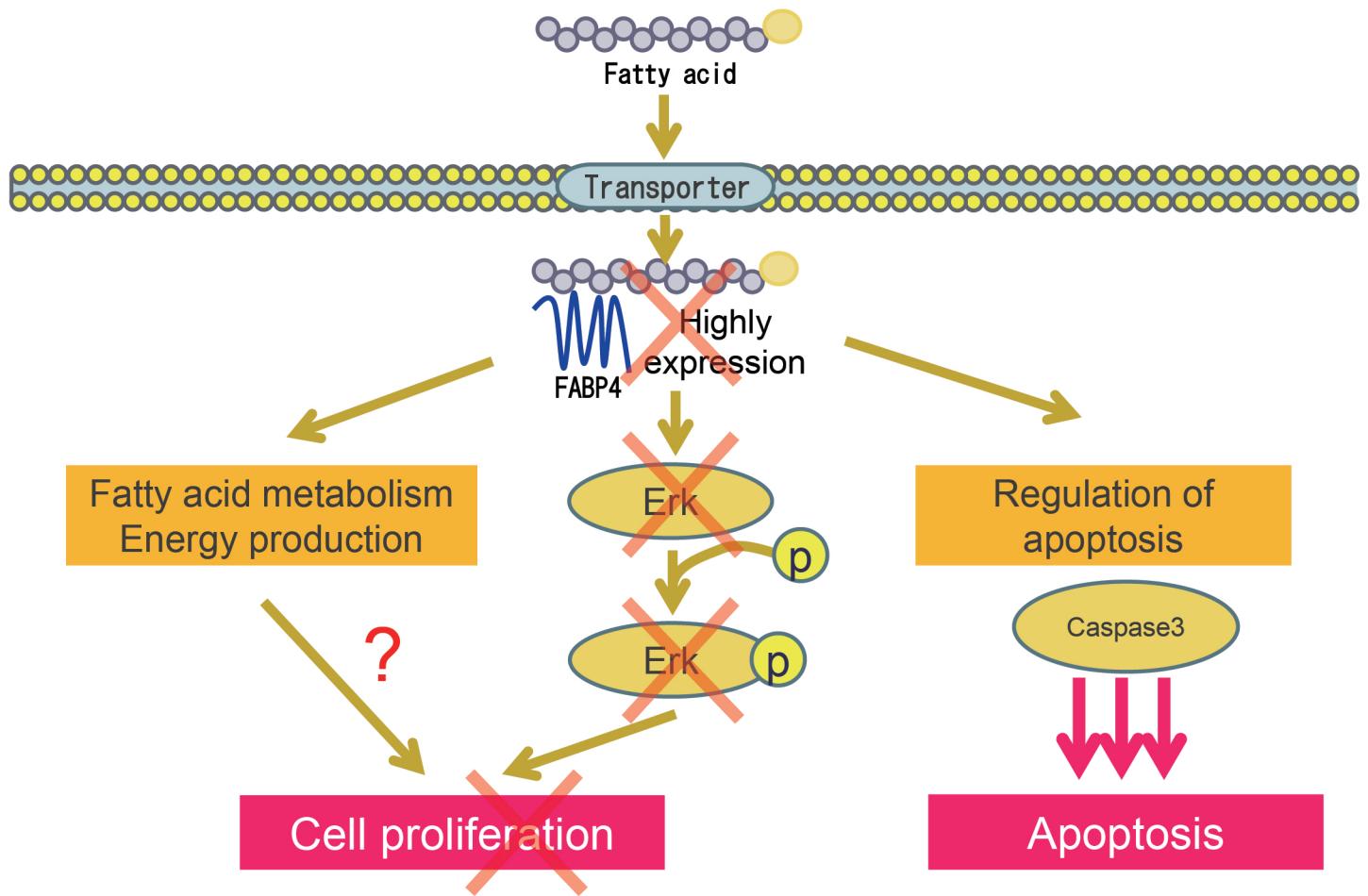


図11 FABP4特異的 siRNA 处置による細胞増殖の抑制のメカニズム (模式図)

Expression of fatty acid binding protein 4 is involved in the cell growth of oral squamous cell carcinoma

DOKSA LEE¹, KOICHIRO WADA², YOSHITAKA TANIGUCHI¹, HANI AL-SHAREEF¹, TOMOTAKE MASUDA¹, YU USAMI³, TOMONAO AIKAWA¹, MASAYA OKURA¹, YOSHINORI KAMISAKI² and MIKIHIKO KOGO¹

¹First Department of Oral and Maxillofacial Surgery and ²Department of Pharmacology, Graduate School of Dentistry, Osaka University; ³Clinical Laboratory, Osaka University Dental Hospital, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Received November 30, 2013; Accepted December 27, 2013

DOI: 10.3892/or.2014.2975

Abstract. Fatty acid binding proteins (FABPs) are a family of small and highly conserved lipid chaperone molecules with highly varied functions. Among them, fatty acid binding protein 4 (FABP4, also known as aP2) is highly expressed by adipocytes, macrophages and dendritic cells. Although the role of FABP4 in cancer is still unclear, it has been reported to be highly expressed by human tumors such as ovarian and bladder cancers. In the present study, we investigated the expression and role of FABP4 in oral squamous cell carcinoma (SCC) and its expression in oral SCC tissues. Immunohistochemical staining revealed that FABP4 expression in the tumor tissue was much higher than that in the non-tumor area of the same specimen. In the *in vitro* studies, an *FABP4*-knockdown SCC cell line (established through *FABP4*-specific siRNA) showed inhibited growth, and inhibited expression and activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). These results indicate that expression of FABP4 plays an important role in the cell growth of oral SCC through the MAPK pathway.

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (SCC) is a major neoplasm of the oral cavity with an increasing rate of incidence (1-3). The optimal therapy for early oral SCC is surgery, but the overall survival rate has exhibited only a slight change (1-3). Therefore, more effective therapies for oral SCC are needed.

Fatty acid binding proteins (FABPs) are a family of small and highly conserved lipid chaperone molecules that bind long-chain fatty acids and other hydrophobic ligands. Their functions are wide ranging (4-6). Among them, fatty acid

binding protein 4 (FABP4, also known as aP2) is highly expressed in adipocytes, macrophages and dendritic cells (5,7). As a result of its distribution, FABP4 is the most extensively researched FABP in endocrinology and metabolomics. FABP4 affects metabolic syndrome progression; *FABP4*-deficient mice were found to have reduced hyperinsulinemia and insulin resistance in obesity (7,8) and showed protection from atherosclerosis (9).

However, little is known concerning the role of FABP4 in cancer, including oral SCC. Recently, Nieman *et al* (10) reported that adipocytes promote ovarian cancer metastasis and tumor cell growth by providing energy mediated by FABP4. Therefore, increased FABP4 expression may affect the growth of various tumor types. Our research group also reported that molecules controlled by peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) play key roles in SCC growth (11-15). As FABP4 is known to mediate transcription with PPAR γ (4,16), we hypothesized that FABP4 may regulate SCC growth. Therefore, in the present study, we investigated FABP4 expression and its effects on SCC of the tongue.

Materials and methods

Tissue samples. All clinical studies were approved by the Ethics Committee of Osaka University Dental Hospital, Osaka. Twenty-seven SCC specimens from resected tongue tissue were obtained at the Osaka University Dental Hospital during 1986-2008 after patient informed consent (Table I). Patients received no preoperative therapy, including chemotherapy and irradiation therapy. The age range of the patients was 30-92 years (61.6 ± 16.4 years, mean age \pm SD); 17 patients were men and 10 were women.

Antibodies. The anti-FABP4 polyclonal antibody was obtained from Bioss Inc. (Woburn, MA, USA). Antibodies against p44/42MAPK and the phosphorylated p44/42MAPK antibody were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).

Immunohistochemical staining and evaluation of FABP4 expression. FABP4 expression in tissues was detected by an anti-FABP4 antibody using standard immunohistochemical techniques (12-15). Formalin-fixed and paraffin-embedded continuous sections were selected and sliced into 5- μ m

Correspondence to: Dr Doksa Lee, First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dentistry, Osaka University, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
E-mail: doksa.lee@gmail.com

Key words: fatty acid binding protein 4, squamous cell carcinoma, oral cancer, tongue cancer, cellular proliferation, mitogen-activated protein kinase

Table I. Characteristics of the patients with squamous cell carcinoma of the tongue, their histological diagnosis and expression of FABP4 in the tissue specimens.

Case no.	Age (years)	Gender	Differentiation	FABP4 expression	
				Tumor area	Non-tumor area
1	34	Male	Well-differentiated SCC	1	0
2	46	Female	Well-differentiated SCC	2	0
3	57	Male	Well-differentiated SCC	1	1
4	64	Male	Well-differentiated SCC	0	0
5	69	Male	Well-differentiated SCC	0	0
6	71	Female	Well-differentiated SCC	1	0
7	71	Male	Well-differentiated SCC	1	0
8	72	Male	Well-differentiated SCC	2	0
9	78	Female	Well-differentiated SCC	1	0
10	79	Male	Well-differentiated SCC	1	1
11	47	Male	Moderately differentiated SCC	1	0
12	61	Male	Moderately differentiated SCC	1	0
13	61	Female	Moderately differentiated SCC	1	0
14	72	Male	Moderately differentiated SCC	1	0
15	77	Male	Moderately differentiated SCC	1	2
16	83	Female	Moderately differentiated SCC	3	2
17	92	Female	Moderately differentiated SCC	1	0
18	30	Male	Poorly differentiated SCC	2	1
19	33	Male	Poorly differentiated SCC	0	0
20	38	Male	Poorly differentiated SCC	0	0
21	51	Female	Poorly differentiated SCC	0	0
22	52	Male	Poorly differentiated SCC	2	0
23	55	Female	Poorly differentiated SCC	2	0
24	65	Male	Poorly differentiated SCC	1	3
25	67	Male	Poorly differentiated SCC	3	2
26	41	Female	Differentiation unknown SCC	0	0
27	68	Female	Differentiation unknown SCC	2	0

Expression of FABP4 by immunohistochemical staining in the tumor and non-tumor areas is scored and expressed as 0-3.

sections. Briefly, incubation with an anti-FABP4 polyclonal antibody was performed at 4°C for 16 h; sections were then washed. After applying the secondary antibody, the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used with a 3,3'-diaminobenzidine substrate kit, according to the manufacturer's instructions. The staining endpoint was determined when the standard tissue sections were constantly stained at the intensity as previously described (12,17).

The intensity of the immunohistochemical staining with the anti-FABP4 antibody was evaluated by scoring according to four groups: 0, <10%; 1, 10-20%; 2, >20-50%; and 3, >50% of the cells exhibiting cytoplasmic staining (12,17). To confirm the reproducibility, the anti-FABP4 immunohistochemical staining was re-evaluated by a pathologist who was unaware of the original assessment. Non-tumor areas were selected as comparatively normal areas separated from the tumor areas by an appropriate distance and confirmed by the pathologist (14,15).

Cell culture and cell growth assay. We used a human oral SCC cell line (SAS) that was established from tongue SCC (13). Cells were maintained in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C under 0.5% CO₂. For the cell growth experiment, cells were trypsinized and replated onto culture dishes (11-15,17,18). SCC cells were counted using a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Inhibition of cell growth was compared with the vehicle-treated controls.

RNA interference approach. The SAS cells were trypsinized and resuspended in DMEM without FBS, and then separated placing ~2x10⁵ cells in each dish. The *FABP4*-specific siRNA (Stealth siRNA) was purchased from Invitrogen Japan (Tokyo, Japan). We purchased three sequences and performed preparatory experiments to determine the most effective sequence. The sequences of the selected *FABP4*-siRNA were: sense, 5'-CAC CAUAAAUCUGAAAGUACCUU-3' and antisense,

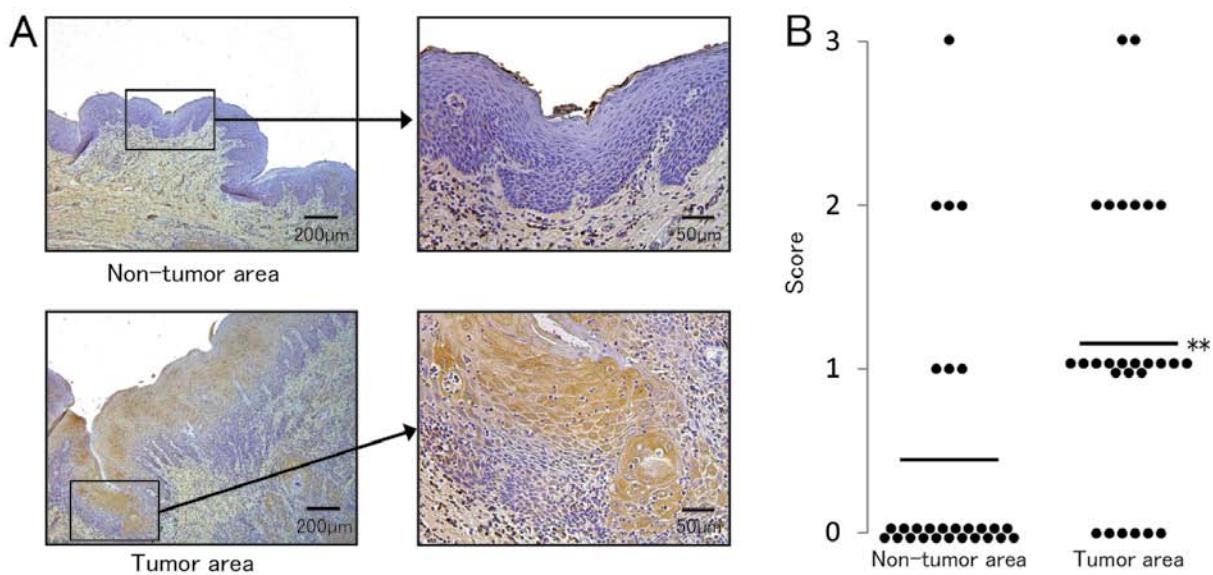


Figure 1. Expression of fatty acid binding protein 4 (FABP4) in tumor cells in tongue squamous cell carcinoma. (A) FABP4 expression in the tumor area (upper panel) of primary tongue squamous cell carcinoma and the non-tumor area (lower panel) from the same tissue section (case 13 in Table I) using immunohistochemical staining. The brown color shows positive FABP4 staining; blue is a counterstain. (B) Comparison of FABP4 expression between tumor and non-tumor areas. The score of the distribution of FABP4 expression is indicated by black circles from the data in Table I. A horizontal line shows the average score. Data indicate the mean \pm SEM from 27 cases. $^{**}P<0.01$.

5'-AAAGGUACUUUCAGAUUUAUGGUG-3'. For transfection, *FABP4*-siRNA or a negative control (Stealth RNAi negative control duplex; Invitrogen Japan) solution was added to the DMEM containing Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen Japan) and incubated for 20 min at room temperature to create the transfection mixture. The transfection mixture was then added to the cells at the indicated final siRNA concentrations. Following 24 h of transfection, the medium was replaced by DMEM containing 10% FBS, at which time viable cells were counted using a Countess Automated Cell Counter. Cell growth was expressed as a percentage of the vehicle-treated control growth.

Western blot analysis. Adherent or suspended cells were washed in PBS, and the cell extracts were prepared by lysing the cells in lysis buffer. Proteins were separated by electrophoresis using 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). Detection of proteins was performed with each polyclonal antibody and visualized using an ECL detection kit (Amersham, London, UK) following the manufacturer's recommended procedure.

Statistical analysis. Results are expressed as the means \pm SEM or \pm SD. Statistical comparisons were carried out using the Student's t-test or the Scheffé's method after analysis of variance. $P<0.05$ was considered to indicate a statistically significant result.

Results

Tongue SCC tissues express FABP4. We stained tongue SCC tissues using the FABP4-specific antibody. Within single tumor specimens, the non-tumor areas were unstained (Fig. 1A, upper panel), whereas tumor areas showed positive FABP4 staining (Fig. 1A, lower panel). According to the scoring as

described above, FABP4 expression between the non-tumor and the tumor area differed significantly (Fig. 1B), and FABP4 was expressed in the tumor areas, but not in the normal tissues.

***FABP4*-specific siRNA suppresses the growth of tongue SCC.** Treatment with *FABP4*-siRNA markedly decreased FABP4 protein levels in the SAS cells (Fig. 2A), and suppressed SAS cell growth in a concentration-dependent manner (Fig. 2B). Inhibition of SCC growth was also visibly altered (Fig. 2C), and significantly differed between the SAS controls and the *FABP4*-knockdown SAS cells (Fig. 2D).

***FABP4*-specific siRNA inhibits expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK).** To investigate the mechanisms involved in the growth inhibition induced by suppression of FABP4, we analyzed a type of MAPK, serine/threonine protein kinases. Since they affect cell proliferation, survival and differentiation, aberrant MAPK cascades contribute to cancer and other diseases (19-21). Therefore, we studied the effects of *FABP4* knockdown on MAPK expression and phosphorylation. Western blot analysis showed decreased phosphorylated MAPK (pMAPK; Fig. 3, middle panel). Notably, MAPK expression itself was also regulated by *FABP4* knockdown (Fig. 3, upper panel).

Discussion

FABP4 expression has been reported in various types of tumors such as ovarian and bladder cancers (10,22), and FABP5 (E-FAPB) has been found in oral SCC (23,24). However, the expression and exact role of FABP4 in oral SCC have not been widely investigated.

In the present study, using an immunohistochemical approach, we consistently found significantly higher expression of FABP4 protein in the tumor area of tongue SCC than

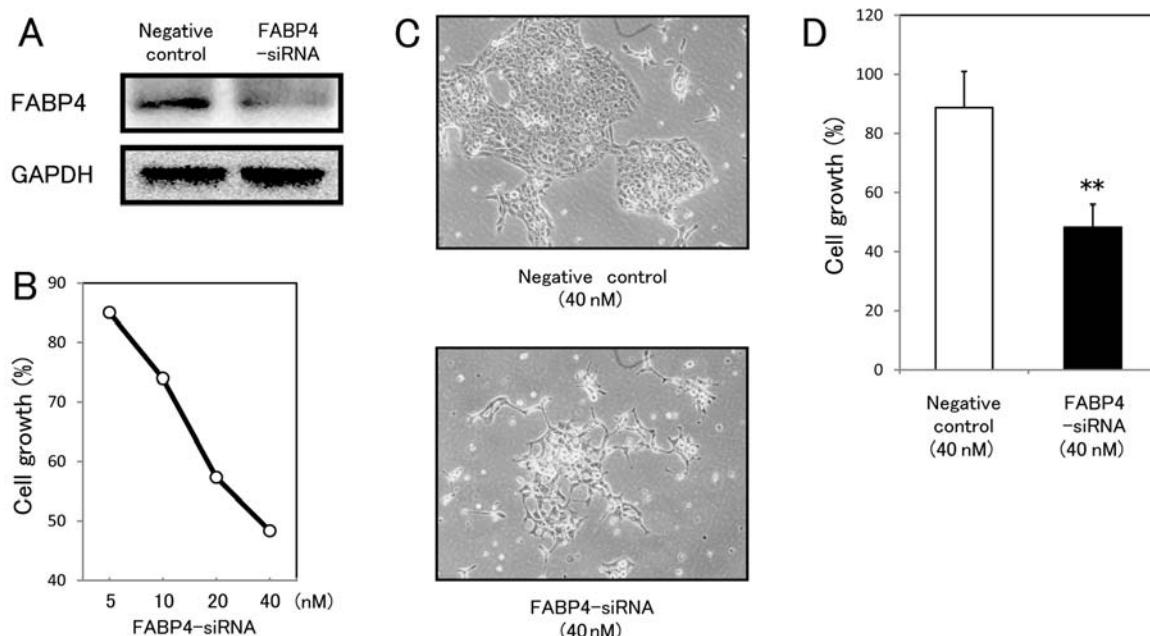


Figure 2. Effect of *FABP4* knockdown on the growth of SCC cells treated with *FABP4*-siRNA. (A) Western blot analysis of *FABP4* expression in SAS cells treated with *FABP4*-specific siRNA (40 nM) or negative control siRNA (40 nM). Samples were collected 12 h after treatment. *GAPDH* was used as the standard for equivalent application. (B) A concentration-dependent effect of *FABP4*-specific siRNA on cell growth. SAS cells were treated with *FABP4*-specific siRNA for 24 h, followed by additional culture for 72 h. Left axis presents the percentage of cell growth compared with vehicle (non-siRNA) control. (C) Typical images and (D) percentage of cell growth of SAS cells transfected with siRNA (40 nM) or negative control siRNA (40 nM) for 24 h and cultured for 72 h, followed by viable cell counting. Each value in D represents the percentage of cell growth compared with the vehicle (non-siRNA) control from six independent experiments. The black column represents the growth of cells transfected with *FABP4*-siRNA; the white column represents the growth of cells transfected with the negative control-siRNA. Error bars represent standard errors. **P<0.01 vs. negative control.

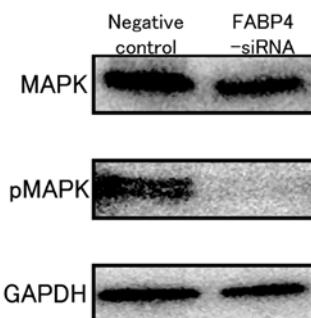


Figure 3. *FABP4*-specific siRNA inhibits expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and its phosphorylation. A representative western blot analysis shows MAPK and p-MAPK expression in SAS cells. SAS cells were treated with *FABP4*-specific siRNA (40 nM) or negative control siRNA (40 nM). Samples were collected 12 h after the treatment. *GAPDH* was used as a standard for equivalent application.

in the non-tumor area in the same tissue samples. Therefore, *FABP4* expression in tumors may affect SCC cell growth. In fact, we showed that suppression of *FABP4* protein by the *FABP4*-specific siRNA clearly inhibited the growth of SCC cell lines. These results clearly indicate the important role of *FABP4* in SCC growth.

FABPs actively facilitate the transport of lipids to specific cellular compartments, including lipid droplets for storage; endoplasmic reticulum for signaling, trafficking and membrane synthesis; mitochondria or peroxisome for oxidation; cytosolic or other enzymes for activity regulation; nuclei for lipid-mediated transcriptional regulation; or even outside the cell for autocrine or paracrine signaling. Among the *FABPs*,

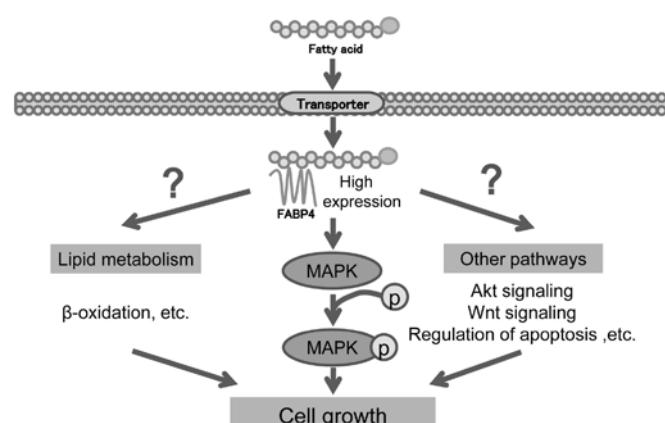


Figure 4. Schematic illustration of possible mechanisms of cell growth inhibition by *FABP4*-specific siRNA.

FABP4 is highly expressed in adipocytes, macrophages and dendritic cells and affects these cells in various manners (5). In cancer cells, *FABP4* transports energy by carrying fatty acids, encouraging metastasis and tumor cell growth (10). Yet, *FABP4* performs other roles in tumor growth, through its various functions. Therefore, we studied the role of *FABP4* in the MAPK pathway and the mechanisms of growth inhibition induced by *FABP4* suppression.

As the MAPK pathway helps to mediate cell proliferation and cancer growth, it has been widely studied as a potential target for cancer therapy (19-21). In fact, our present research showed decreased MAPK expression and phosphorylation 12 h following treatment with *FABP4*-specific siRNA,

which indicates that FABP4 affects cell growth through the MAPK pathway. Notably, expression of MAPK itself was also suppressed by *FABP4* knockdown; FABP4 may affect transcription of MAPK, which implies a complex role for FABP4 in tumor growth. Inhibition of the MAPK pathway may be one of the several mechanisms through which FABP4 mediates tumor growth (Fig. 4). Further investigation is warranted.

In the present study, FABP4 expression in the tumor tissues was not correlated with age, gender, histological tumor differentiation or survival rate of the cases. Of our 27 cases, 12 had neck lymph node metastasis, all 12 of whom showed FABP4 expression in lymph nodes, similar to that in the primary tumors (data not shown). Thus, FABP4 expression may affect metastasis to neck lymph nodes; this role merits further investigation.

In summary, we demonstrated FABP4 expression in human tongue SCC tissues and cultured SCC cells. Our results suggest an important role for FABP4 in SCC growth and indicate that FABP4 is a potential target for the therapy of oral SCC.

Acknowledgements

The present study was supported in part by grants (T245928310 to Y.T.) from the Japanese Society for the Promotion of Science.

References

1. Prince S and Bailey BM: Squamous carcinoma of the tongue: review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37: 164-174, 1999.
2. Okura M, Hiranuma T, Adachi T, *et al*: Induction chemotherapy is associated with an increase in the incidence of locoregional recurrence in patients with carcinoma of the oral cavity: results from a single institution. *Cancer* 82: 804-815, 1998.
3. Goepfert H: Squamous cell carcinoma of the head and neck: past progress and future promise. *CA Cancer J Clin* 48: 195-198, 1998.
4. Schroeder F, Petrescu AD, Huang H, *et al*: Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids* 43: 1-17, 2008.
5. Furuhashi M and Hotamisligil GS: Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7: 489-503, 2008.
6. Storch J and Thumser AE: The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1486: 28-44, 2000.
7. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE and Spiegelman BM: Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274: 1377-1379, 1996.
8. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S and Hotamisligil GS: Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 141: 3388-3396, 2000.
9. Makowski L, Boord JB, Maeda K, *et al*: Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 7: 699-705, 2001.
10. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, *et al*: Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* 17: 1498-1503, 2011.
11. Masuda T, Wada K, Nakajima A, *et al*: Critical role of peroxisome proliferator-activated receptor γ on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 4012-4021, 2005.
12. Nagata M, Wada K, Nakajima A, *et al*: Role of myeloid cell leukemia-1 in cell growth of squamous cell carcinoma. *J Pharmacol Sci* 110: 344-353, 2009.
13. Kusayama M, Wada K, Nagata M, *et al*: Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 102: 1128-1136, 2011.
14. Ishimoto S, Wada K, Tanaka N, *et al*: Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 40: 1011-1019, 2012.
15. Ishimoto S, Wada K, Usami Y, *et al*: Differential expression of aquaporin 5 and aquaporin 3 in squamous cell carcinoma and adenoid cystic carcinoma. *Int J Oncol* 41: 67-75, 2012.
16. Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, *et al*: Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 22: 5114-5127, 2002.
17. Ishida H, Wada K, Masuda T, *et al*: Critical role of estrogen receptor on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 98: 636-643, 2007.
18. Takahashi H, Fujita K, Fujisawa T, *et al*: Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of invasive properties. *Cancer Sci* 97: 854-860, 2006.
19. Roux PP and Blenis J: ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 320-344, 2004.
20. Roberts PJ and Der CJ: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310, 2007.
21. Santarpia L, Lippman SM and El-Naggar AK: Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16: 103-119, 2012.
22. Boiteux G, Lascombes I, Roche E, *et al*: A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *Int J Cancer* 124: 1820-1828, 2009.
23. Uma RS, Naresh KN, D'Cruz AK, Mulherkar R and Borges AM: Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue is associated with down-regulation of epidermal fatty acid binding protein (E-FABP). *Oral Oncol* 43: 27-32, 2007.
24. Fang LY, Wong TY, Chiang WF and Chen YL: Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39: 342-348, 2010.