The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Wnt5bによるヒト口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換ならびに癌幹細胞様形質の誘導に関する研究
Author(s)	岸本, 聡子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56118
rights	This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in anymedium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.© 2018 The Authors.Journal of Biomedical Materials Research Part Apublished by Wiley Periodicals, Inc.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　岸本　聡子　）	
論文題名	Wnt5bによるヒトロ腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換ならびに癌幹細胞様形質の誘導に関する研究

論文内容の要旨

【背景および目的】

頭頸部扁平上皮癌 head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)のひとつである口腔扁平上皮癌 oral squamous cell carcinoma (OSCC)は，その高い局所浸潤性とリンパ節転移能が予後に大きな影響を与えている．

癌細胞が転移を生じるメカニズムのひとつに，上皮間葉転換epithelial-mesenchymal transition (EMT)の獲得が挙げられる．EMTは発生および分化に深く関与するが，細胞形態が紡錘形様に変化して細胞極性を消失し運動性の亢進をもたらすことから，癌転移にも寄与するといわれる．

幹細胞は自己複製能と多分化能を有する細胞である．近年，腫瘍組織にも幹細胞，すなわち癌幹細胞あるいは癌幹細胞様細胞cancer-stem like cell (CSC)が存在するという説が提唱されており，急性骨髄性白血病をはじめ，乳癌や肺癌ならびに頭頸部扁平上皮癌などでもその存在が報告された．EMTとCSCは腫瘍原性，薬剤耐性，癌転移に関わるとされ，急速に研究が進展している分野である．

Wingless/int (Wnt)は初期発生における体軸の決定，原腸嵌入，器官形成を制御する分子量約4万の分泌性タンパクで，ヒトでは19種類が同定され，ファミリーを構成している．Wntシグナル経路は，β-catenin依存性のcanonical経路と，β-catenin非依存性のnon-canonical経路に大別され，non-canonical経路はさらに平面内細胞極性planar cell polarity (PCP)経路とCa^{2+}経路に分けられる.WntのシグナルはFrizzledやLRP5/6を介し細胞内へ伝達される.Canonical経路では，β-cateninのリン酸化が抑制されることで，分解されずに蓄積したβ-cateninが核内へ移行して標的遺伝子の発現を制御し，non-canonical経路では，Rho family低分子量Gタンパク質を介して細胞骨格や細胞の運動性を制御するほか，protein kinase C (PKC)やcalmodulin-dependent protein kinaseⅡ (CaMKⅡ)を活性化する．Wntシグナル経路は発生だけでなく種々の疾患や，発癌とその進展にも関与するといわれており，悪性腫瘍においては，canonical経路は発癌関連遺伝子の発現を制御し，またnon-canonical経路は運動性の亢進を制御して，転移に関与するとされる．

癌組織には，癌細胞のほか，免疫細胞や腫瘍関連マクロファージ，癌関連線維芽細胞，間葉系幹細胞などが存在し，トランスフォーミング増殖因子 (TGF-β)や上皮成長因子 (EGF)，線維芽細胞増殖因子 (FGF)などを分泌している．腫瘍組織では，これら細胞因子や液性因子が癌微小環境を構築し，EMTを誘導するとされている．Wntもまた，癌微小環境を構成する液性因子のひとつであり，Wntシグナル経路は，TGF-βシグナル経路，Notch経路およびHedgehogシグナル経路と並んでEMTを誘導する因子として知られる．また最近では，Wntシグナル経路が癌幹細胞の自己複製や維持を制御するとして注目されている．

われわれは，ヒトOSCCのマウス頸部リンパ節高転移株では親株と比較してWnt5bの発現が亢進していることを見出した．しかしながら，Wnt5bがOSCCのEMTおよびCSCに及ぼす影響についてはまだ解明されていない．そこで，本研究では癌微小環境の液性因子として細胞外から作用するWnt5b刺激がOSCCにEMTとCSCを誘導する可能性について検討を行った．

【材料と方法】

1.　細胞は，OSCCであるSAS細胞とHSC-3細胞にGFP遺伝子を導入したSAS-GFP細胞およびHSC3-GFP細胞を用いた．SAS-GFP細胞は当研究科生化学教室にて，HSC3-GFP細胞は当研究室にて樹立した細胞株である．Wnt5bは，human recombinant Wnt5bを500 ng/mlの濃度で用いた．

2.　細胞増殖能は，細胞を6穴プレートに播種し，経時的に細胞を分散させて細胞数を算定した．

3.　遊走能および浸潤能はmigration assayおよびinvasion assayで評価した．また，よりin vivoに近い新規のリンパ管様ネットワーク付き三次元組織体モデルを用いて浸潤能の評価を行った．

4.　EMT関連遺伝子は，細胞から全RNAを抽出し，半定量逆転写PCRにて検出した．

5.　sphere形成能は，超低接着プレートに細胞を播種し，癌幹細胞増殖培地にて培養して形成されたsphereを観察し

た.
6.　CSCマーカー陽性細胞の検出は，allophycocyanin標識抗ヒトCD44抗体および抗CD133抗体に反応させた細胞をflow cytometerにて解析した.

【結果】

1.　Wnt5bで処理したSAS-GFP細胞は，仮足様突起の伸長を認めた．HSC3-GFP細胞では，紡錘様形態を伴う細胞の出現を認めた．細胞増殖能において対照群との間に差は認めなかった.

2.　Wnt5bで細胞を48時間処理した後，遊走能を測定したところ，対照群と比較してSAS-GFP細胞では8.3倍，HSC3-GFP細胞では1.8倍となった．同様に，浸潤能ではSAS-GFP細胞で8.3倍，HSC3-GFP細胞で2.5倍となった．リンパ管様ネットワーク付き三次元組織体モデルにおいても，Wnt5b処理したSAS-GFP細胞およびHSC3-GFP細胞の浸潤能の亢進がみられた.

3.　Wnt5bで48時間処理したSAS-GFP細胞では，間葉細胞マーカーであるvimentinとN-cadherinの発現が上昇し，HSC3-GFP細胞では，上皮細胞マーカーのE-cadherinの発現が低下する傾向がみられた.

4.　Wnt5bで48時間処理した細胞を用いてCSCの特性を反映するsphere形成能を評価したところ，SAS-GFP細胞では，培養後3日目に形成されたsphereの径は対照群の1.7倍であった．10日目には，Wnt5b処理群と対照群間に有意差は見られなくなったが，形成されたsphereは維持されていた．HSC3-GFP細胞では，培養後3日目に形成されたsphereの径は対照群の1.6倍で，10日目には1.2倍となった.

5.　Wnt5bで48時間処理したSAS-GFP細胞では，癌幹細胞マーカーであるCD44陽性細胞数は対照群の2.0倍であり，CD133陽性細胞は5.1倍であった．HSC3-GFP細胞では，CD44陽性細胞は対照群の6.8倍であり，CD133陽性細胞は13.1倍であった.

【考察および結論】

本研究では，ヒト舌癌由来のOSCCにGFP遺伝子を導入したSAS-GFP細胞とHSC3-GFP細胞を用いて，癌微小環境因子としてのWnt5bを48時間という短期間処理することにより，EMTあるいはCSCの形質が誘導されるかにつき検討を行った.

Wnt5bで処理したSAS-GFP細胞およびHSC3-GFP細胞は細胞増殖能に明らかな変化はなかったが，遊走能および浸潤能は有意に亢進した．この結果は，よりvivoに近いリンパ管様ネットワーク付き三次元組織体においても再現され，実際の生体内において，Wnt5bが細胞遊走能および浸潤能の亢進に強く影響を及ぼしている可能性が示唆された.

EMTに関連する遺伝子発現を調べたところ，SAS-GFP細胞においては，間葉細胞マーカーであるvimentinおよびN-cadherinのmRNAの発現が上昇し，HSC3-GFP細胞では上皮細胞マーカーのE-cadherinの発現低下傾向がみられた．しかし，いずれの細胞でもEMT関連転写因子のslug，snail，twistに明らかな変化はなかった．EMTの際にはcadherin switchingが生じるとされるが，N-cadherinの発現上昇とE-cadherinの発現減少は必ずしも平行しないとの報告や，EMTにはpartial EMTが存在するとの報告もあり，今回のWnt5bによる変化はOSCCのpartial EMTに相当する可能性も考えられた.

Wnt5bを48時間処理したSAS-GFP細胞およびHSC3-GFP細胞を用いてsphere形成を行ったところ，培養3日後に形成されたsphereの径の平均は対照群よりも増大していた．これらOSCCはWnt5b非処理細胞でもsphereを形成するが，Wnt5bはその成長を加速させると考えられる．一方で，Wnt5bが存在しない条件下でsphere培養を継続すると，Wnt5bによる増強効果は減弱し，CSC形質は永続的なものではないことが分かった.

癌幹細胞マーカーであるCD44あるいはCD133陽性細胞は，Wnt5b処理した群で増加した．過去の報告から，CD44あるいはCD133はOSCCにおいてある程度発現しているとされるが，Wnt5bはCSCを誘導し，その発現を亢進させると考えられた.

近年，乳癌や肺癌細胞ではEMTに伴ってCSCがみられるようになると報告されている．HNSCCにおいては，分泌型WntアンタゴニストのひとつであるsfRP4がWnt3aを介するcanonical経路を阻害し，EMTとsphere形成能を低下させるとの報告や，Wnt5aがPKCのリン酸化によるEMTに関与するとし，Wnt5aをノックダウンすると遊走能および浸潤能が低下すること，および$CD44^{+}/CD22^{-}$のCSCが低下することが報告されている．これらの経路がWnt5bによるEMTおよびCSC獲得に働く可能性がある.

本研究においてはWnt5bの処理時間は48時間という短期間であったが，細胞遊走能および浸潤能の亢進を認め，EMT様の変化ならびに幹細胞様形質をも誘導し，その作用が癌微小環境で発揮されることで癌の浸潤ならびに転移に寄与すると考えられた．したがって，OSCCの転移を阻止することにおいて，Wnt5bは標的因子となる可能性がある.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　岸本　聡子　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	由良　義明
	副 査　教授	豊澤　悟
	副 査　准教授	波多　賢二
	副 査　講師	相川　友直

論文審査の結果の要旨

本研究は、Wnt シグナル経路のリガンドである Wnt5b がヒトロ腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響について検討したものである。その結果、癌細胞の遊走能と浸潤能の亢進、間葉細胞マーカーの発現、癌幹細胞に特徴的な球体形成能の亢進と癌幹細胞マーカーの発現増強がみられ、Wnt5b による上皮間葉転換ならびに癌幹細胞形質の誘導が示唆された。

以上は、Wnt5b の癌浸潤ならびに転移における重要性を示すものであり、本研究は、博士(歯学)の学位論文として価値あるものと認める。