

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	<a href="https://doi.org/10.18910/56118">https://doi.org/10.18910/56118</a>
rights	This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. © 2018 The Authors. Journal of Biomedical Materials Research Part A published by Wiley Periodicals, Inc.
Note	

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

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

Osaka University

# 学位論文

「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」

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻  
顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第二教室

岸本 聡子

## 諸 言

頭頸部扁平上皮癌 head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)は世界で6番目に多いとされる癌腫である<sup>1)</sup>。全世界において、年間40~60万人が新たにHNSCCに罹患し、22.3~30万人がこれにより死亡するとされる<sup>1)</sup>。HNSCCのひとつである口腔扁平上皮癌 oral squamous cell carcinoma (OSCC)によるわが国における死亡率は10万人中3.7人と報告され、過去30年間における5年生存率に大きな変化はない<sup>2)</sup>。OSCCは高い局所浸潤性とリンパ節転移能を有し、予後に大きな影響を与えている<sup>2)</sup>。

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、発生において原腸陥入や神経堤形成など器官形成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<sup>3~5)</sup>。癌細胞においては、EMTにより細胞極性が消失し、E-cadherinに代表される上皮細胞マーカーの発現が減少する。それに相反してN-cadherinやvimentinといった間葉細胞マーカーの発現が上昇し、基底膜を分解して浸潤へと進む(図1)<sup>6)</sup>。

幹細胞は、自己複製能と多分化能を有する細胞で、胚性幹細胞と体性幹細胞に分類され、生体の恒常性維持や器官形成などを担っている<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>、急性骨髄性白血病<sup>9)</sup>をはじめ、乳癌<sup>10)</sup>、脳腫瘍<sup>11)</sup>、前立腺癌<sup>12)</sup>、大腸癌<sup>13)</sup>、肺癌<sup>14)</sup>ならびに頭頸部扁平上皮癌<sup>15)</sup>でもその存在が報告された。EMTとCSCは腫瘍原性、薬剤耐性、癌転移に関わっており、急速に研究が進展している分野である。多くのCSCの代表的な表面マーカーとしてCD44、CD133およびALDH1が同定されている<sup>16,17)</sup>。CD44は細胞外マトリックスと結合する37kDaの接着分子で、細胞運動に関与することから癌細胞の転移に関与するといわれ<sup>18,19)</sup>、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、および頭頸部扁平上皮癌など多くの癌腫に認められる<sup>20)</sup>。CD133は細胞膜に存在する120kDaの5回膜貫通型タンパクで、脳腫瘍、前立腺癌、悪性黒色腫、大腸癌、および頭頸部扁平上皮癌で確認され、近年ではCSCのマーカーとして注目されている<sup>20,21)</sup>。

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<sup>22)</sup>、ヒトでは19種類が同定され、ファミリーを構成している<sup>23)</sup>。

Wnt シグナル経路は， $\beta$ -catenin 依存性の canonical 経路と， $\beta$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ 経路に分けられる(図 2)．Wnt によるシグナルは Frizzled や低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)5/6 を介し細胞内へ伝達される．Canonical 経路では， $\beta$ -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  $\beta$ -catenin が核内へ移行して標的遺伝子の発現を制御し<sup>24,25)</sup>，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 kinase II (CaMK II)を活性化する<sup>24)</sup>．

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る<sup>22,24~27)</sup>．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<sup>25,28)</sup>．Wnt 分子はそれぞれに特異的な生理機能を有しており，一般に形質転換能の強い Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a は canonical 経路を，形質転換能の弱い Wnt2, Wnt4,

Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7b, Wnt11 は non-canonical 経路を活性化するとされている<sup>22,24)</sup>. Wnt5a と Wnt5b は 80.5% のアミノ酸配列同一性を示し<sup>29)</sup>, Wnt5a は悪性黒色腫<sup>30)</sup>, 肺癌<sup>31)</sup>, 胃癌<sup>32)</sup>, 乳癌<sup>33)</sup>そして前立腺癌<sup>34)</sup>において腫瘍進展に関与し, 悪性黒色腫, 胃癌そして乳癌では細胞遊走能や浸潤能を亢進すると報告されている<sup>30,32,33)</sup>. OSCC においても, Wnt5a により細胞遊走能と浸潤能が亢進するとの報告がある<sup>35)</sup>. Wnt5b は乳癌<sup>36)</sup>や非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍<sup>37)</sup>, および平滑筋腫の腫瘍組織で高発現すること<sup>38)</sup>, そして HNSCC において細胞浸潤能を亢進することが報告されている<sup>39)</sup>. 腫瘍形成能において, Wnt5a でなく Wnt5b に形質転換能を認めたとする報告もある<sup>40)</sup>.

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- $\beta$  transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )や上皮成長因子 epidermal growth factor (EGF), 線維芽細胞増殖因子 fibroblast growth factor (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<sup>41)</sup>(図3). Wnt もまた, 癌微小環境を構成する液性因子のひとつであ

る 41).

Wnt シグナル経路は, TGF- $\beta$ 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 4). また, 最近では, Wnt シグナル経路は, 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 42,43).

われわれは, ヒト OSCC のマウス頸部リンパ節高転移株 44) 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 45). 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. 細胞培養

本研究には, ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株である SAS 細胞 46) および HSC-3 細胞 47) に緑色蛍光タンパク質 Green Fluorescent Protein (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樹立され, 分与された. SAS-GFP 細胞は,

Dulbecco 変法 Eagle 培地 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; Nissui, Tokyo, Japan)に 10% 牛胎児血清 Fetal Bovine Serum (FBS ; Sigma Aldrich, MO, USA)を添加した培養液にて, 5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で培養した. HSC3-GFP 細胞は, Eagle 最小必須培地 Eagle Minimum Essential Medium (MEM ; Nissui, Tokyo, Japan)に 10% FBS を添加した培養液にて, 5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で培養した. SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞は, 0.1% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA ; Wako, Osaka, Japan)と 0.1% trypsin (nacalaitesque, Kyoto, Japan)で処理して浮遊させ, 細胞数の算定や継代に用いた.

## 2. HSC3-GFP 細胞の樹立

HSC-3 細胞は, 理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室 (Ibaraki, Japan)より購入した. GFP 発現ベクターには pZsGreen1-N1 vector (Clontech, CA, USA)を用いた. これは, 野生型 *Zoanthus* sp.GFP のヒトコドン最適化変異形をコードし, また neomycin 耐性遺伝子を有するベクターである. 6 well プレートに  $5 \times 10^5$  個/well で HSC-3 細胞を播種し 24 時間培養した. 遺伝子導入には, cDNA と遺伝子導入試薬の



FuGENE6 (Promega, WI, USA)を 1:3 の割合で FBS 無添加 MEM に混合して用いた。すなわち、FBS 無添加 MEM 90  $\mu$ l に FuGENE6 を 6  $\mu$ l 混合し 5 分間室温で維持したのち、cDNA 2  $\mu$ g (4  $\mu$ l)を加え 15 分間室温にてインキュベートした。計 100  $\mu$ l となった混合液を 1 well 分として HSC-3 細胞の培養液に添加し、プレートシェーカーにて混合したのち、5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で培養した。48 時間後から培地に G-418 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を 500  $\mu$ g/ml の濃度で添加し、GFP 遺伝子導入細胞を選択培養した。GFP 目視確認用 LED ハンディライト (オプトコード, Tokyo, Japan)を用いて形成されたシングルコロニーを確認しながら、0.1% trypsin を含む濾紙にてフィルターピックアップし、培養を継続して GFP 発現細胞株 clone 2-1 を樹立した。

### 3. Wnt5b による SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞の処理

組換えヒト Wnt5b (Wnt5b ; R&D, MN, USA)を 500 ng/ml の濃度で培養液に添加し、5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で 48 時間培養した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞を実験に用いた。

### 4. 細胞増殖曲能の評価

Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞と HSC3-GFP 細胞を  $2 \times 10^4$  個/well にて 6 well プレートに播種した。経時的に 5 日間, 0.1% trypsin により細胞を分散させて細胞数を算定した。

## 5. 細胞遊走能の評価 (migration assay)

8.0  $\mu\text{m}$  の小孔を有する多孔メンブレンが下底に張られた上層チャンバーを内蔵する二層構造の transwell chamber である Corning BioCoat Cell Culture Inserts Control Inserts 24-Well (Corning, MA, USA) を用いた。Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞あるいは HSC3-GFP 細胞を FBS 無添加の DMEM あるいは MEM で  $5 \times 10^4$  個/500  $\mu\text{l}$  に調整して, 上層チャンバー内へ播種した。下層チャンバーには 10%FBS 添加の DMEM あるいは MEM を 750  $\mu\text{l}$ /well 加え, 5%  $\text{CO}_2$  気相下に  $37^\circ\text{C}$  で 48 時間培養した。48 時間後に上下層チャンバーの培養液を除去し, リン酸緩衝液 Dulbecco's phosphate buffered saline (-) (PBS (-); Nissui, Tokyo, Japan) で洗浄した。4% paraformaldehyde (PFA; Wako, Osaka, Japan) を加えて 10 分間室温にて細胞を固定したのち, PBS (-) にて洗浄し, Mayer's Hematoxylin (MUTO, Tokyo, Japan) を加え, 30 分間室温にて維持した。PBS (-) で洗浄したのち, 上層チャンバー下底の

多孔メンブレンをメスにて切り取り，標本用封入剤 MGK-S (Matsunami, Osaka, Japan)を用いてスライドガラス上で封入した．200 倍光学顕微鏡 ZEISS Axiolab (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)下で観察し，無作為に 10 視野を撮影した．これを 3 標本で繰り返した．画像解析ソフト Image J program を用いて撮影した写真をコンピュータ上で解析し，メンブレンを通過した細胞の占有面積を算出した．

## 6. 細胞浸潤能の評価 (invasion assay)

二層構造で，上層チャンバーの下底に人工基底膜マトリックスである matrigel がコートされた 8.0  $\mu\text{m}$  の小孔を有する多孔メンブレンが張られた Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Corning, MA, USA)を用いた．上層チャンバーに FBS 無添加の DMEM あるいは MEM を 500  $\mu\text{l}$  加えて 5%  $\text{CO}_2$  気相下に 37 $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベートし，matrigel を水和した．Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞あるいは HSC3-GFP 細胞を FBS 無添加の DMEM あるいは MEM で  $5 \times 10^4$  個/500  $\mu\text{l}$  に調整して，上層チャンバー内へ播種した．下層チャンバーには 10% FBS 添加の DMEM あるいは MEM を 750  $\mu\text{l}$ /well 加え，5%  $\text{CO}_2$  気相下に 37 $^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養した．48 時間後に上下層チャンバ

一の培養液を除去し，PBS (-)で洗浄した．4% PFA を加えて 10 分間室温にて細胞を固定したのち，PBS (-)にて洗浄し，Mayer's Hematoxylin を加え，30 分間室温にて維持した．PBS (-)で洗浄したのち，上層チャンバー下底の多孔メンブレンをメスにて切り取り，標本用封入剤を用いてスライドガラス上で封入した．200 倍光学顕微鏡下で観察し，無作為に 10 視野を撮影した．これを 3 標本で繰り返した．画像解析ソフト Image J program を用いて撮影した写真をコンピュータ上で解析し，メンブレンを通過した細胞の占有面積を算出した．

## 7. リンパ管様ネットワーク付き三次元組織体モデルによる細胞浸潤能の評価

リンパ管様ネットワーク付き三次元組織体モデルは，二層構造を持つ transwell chamber のカルチャーインサートに，正常ヒト皮膚線維芽細胞 normal human dermal fibroblasts (NHDF ; Lonza, Basel, Switzerland)とヒト皮膚リンパ管内皮細胞 human dermal lymphatic endothelial cell (HDLEC ; Lonza, Basel, Switzerland)を播種し，三次元的に培養した，より vivo に近い組織体モデルである(図 4). Nishiguchi らにより報告された細胞集積法<sup>48)</sup>を用いて，下底に 0.4  $\mu\text{m}$  の小孔を

有するメンブレンが張られた 24 well カルチャープレート (Corning, MA, USA)のインサート内に, NHDF 10 層の中央に HDLEC 1 層をサンドイッチした構造, つまり, NHDF:HDLEC:NHDF を 5:1:5 で有する三次元組織体を構築した. これは, シングルセルの状態にした NHDF の表層に fibronectin と gelatin の交互薄膜形成し, 24 well インサート底面に対し, 1 層  $1 \times 10^5$  個として NHDF を 5 層相当の  $5 \times 10^5$  個に調整して播種し, その上層に HDLEC を 1 層, さらに HDLEC の上層に同様に薄膜形成した NHDF を 5 層相当分播種することで構築した組織体である. すなわち, コンフルエントに培養した NHDF を 0.1% trypsin にて単離したのち, 50 mM Tris-HCl 溶液に懸濁し, 50 mM Tris-HCl 溶液に 0.04 mg/ml で溶解した fibronectin (Sigma Aldrich, MO, USA)溶解液を 1 ml 加え, 室温で 1 分間インキュベートし, 2500 rpm で 1 分間遠心分離を行ったのち, 上清を除去した. 50 mM Tris-HCl 溶液を 1 mL 加えて 1 分間洗浄し, 2500 rpm で 1 分間遠心分離を行い, 上清を除去した. 続いて, Tris-HCl 溶液 50 mM 溶液で 0.04 mg/ml に調整した gelatin (Wako, Osaka, Japan)を加えて同様の操作を行った. このように, fibronectin または gelatin の薄膜形成を 1 ステップとして 9 回繰り返すことにより, 細胞表面に交

互積層薄膜を形成した。この細胞を回収して、24 well プレートカルチャーインサート 1 well に対し、300  $\mu$ l の 10% FBS 添加 DMEM で  $5 \times 10^5$  個/well に調整してインサート内へ播種した。カルチャープレート内には 1 ml の培養液を加えた。1 時間後に培地をそれぞれ 1 ml 追加して、5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で 24 時間培養した。24 時間後、EGM-2MV (Lonza, Basel, Switzerland) で培養しコンフルエントとなった HDLEC を 0.1% trypsin にて分散させ、10% FBS 添加 DMEM 中に  $1 \times 10^5$  個に調整して上層に播種した。5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で約 12 時間培養後に、HNDF を前述と同様に fibronectin と gelatin で交互積層薄膜を形成し、10% FBS 添加 DMEM 300  $\mu$ l 中に  $5 \times 10^5$  個/well となるよう調整して、HDLEC の上層に播種した。カルチャープレート内には 1 ml の培養液を加えた。1 時間後に培地をそれぞれ 1 ml 追加して、5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で培養した。培養 2 日後あるいは 3 日後に、Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞あるいは HSC3-GFP 細胞を 300  $\mu$ l の 10% FBS 添加 DMEM 中に  $1 \times 10^4$  個/well となるように調整し、三次元組織体の上層に播種して 5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で 5 日間培養した。

免疫蛍光細胞染色は以下の方法で行った。培養液を除去し、PBS (-) で洗浄したのち、2.5 ml の 4% PFA で 15 分間処理して

固定を行った。PBS (-)で洗浄後，PBS (-)で調整した 0.2% Triton X-100 を加えて 15 分間処理し，PBS(-)で洗浄したのち，1 % bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, MO, USA) で 60 分間ブロッキングを行った。1% BSA を除去し，HDLEC の染色のため，一次抗体として 1% BSA で 1/50 に希釈した抗ヒト CD31 マウスモノクローナル抗体 (Dako, Glostrup, Denmark)を添加して室温で 60 分間インキュベートした。PBS (-)で洗浄後，二次抗体として Alexa Fluor® 546 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen, CA, USA)を 1% BSA で 1/200 に希釈して加え，室温で 60 分間インキュベートした。PBS(-)で洗浄して，10 mg/ml の DAPI を 1 % BSA で 1/1000 に希釈し 2 ml 添加して，4 °Cで一晩静置した。これを，共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (OLYMPUS, Tokyo, Japan)にて 10 視野を撮影し，これを 3 標本で繰り返した。三次元画像解析ソフト Volocity (Perkin Elmer, MA, USA)を用いてコンピュータ上で三次元構造を構築し，形成されたリンパ管様ネットワークから 10  $\mu\text{m}$ ，15  $\mu\text{m}$  および 20  $\mu\text{m}$  の距離に存在する浸潤した SAS-GFP 細胞あるいは HSC3-GFP 細胞の数を計測した。

三次元組織体における SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞

のメンブレン方向への遊走能および浸潤能の評価には，三次元組織体の免疫組織化学染色標本を用いた．カルチャーインサート内の三次元組織体をメンブレンごとインサートより外し，パラフィン包埋して，薄切切片を作製した．脱パラフィン操作を行ったのち，PBS (-)で 1/1000 に希釈した proteinase K (DAKO, Glostrup, Denmark)を室温で 5 分間処理し，水道水で洗浄した．3% 過酸化水素水で 5 分間処理し水道水で洗浄したのち，1% BSA をスライド上に滴下して室温で 20 分以上インキュベーションチャンバー内に静置し，ブロッキングを行った．ブロッキング液を除去後，1% BSA で 1/500 に希釈した抗ヒト cytokeratin (CK)マウスモノクローナル抗体 (Dako, Glostrup, Denmark)をスライド上に滴下し，4℃でインキュベーションチャンバー内に一晩静置した．PBS (-)にて洗浄し，二次抗体として horseradish peroxidase 標識抗マウスポリマー試薬 (DAKO, Glostrup, Denmark)を滴下して，インキュベーションチャンバー内で 30 分間静置した．PBS (-)で洗浄し，diaminobenzidine (DAKO, Glostrup, Denmark)を 1 滴のせて発色させた．水道水で洗浄し，Mayer' s Hematoxylin に 30 秒間浸漬させて核染色し，水道水で 30 分間流水洗浄してスライドガラス上で封入した．これを，400 倍光学顕微鏡 AxioCamERc5s (Carl Zeiss,



Oberkochen, Germany)下で無作為に 3 視野撮影し, これを 3 標本で繰り返すことで, メンブレン方向へ浸潤し, 底面へ到達した CK 陽性細胞を算定してその平均を求めた. すなわち, 撮影した三次元組織体標本の 1 視野における下底の長さ約 280 $\mu$ m に対して, その中に存在する CK 陽性細胞を算定し平均を求めた.

## 8. 全 RNA の抽出

SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞を播種し, Wnt5b を 48 時間作用させながら 80% コンフルエント程度に培養した. PBS (-)にて 2 回洗浄し, 10 cm の培養皿に対して ISOGEN(NIPPON GENE, Toyama, Japan)を 1 ml 添加した. 細胞溶解液を回収し, ISOGEN の 1/5 量のクロロホルム (Wako, Osaka, Japan)を加えて混合したのち, 12000 rpm で 20 分間遠心を行った. 分離した水層のみを回収し, 等量のイソプロパノール (Wako, Osaka, Japan)を加えて室温で 10 分間インキュベートして, 12000 rpm で 10 分間遠心を行った. 上清を除去し, 75% 氷冷エタノール (Wako, Osaka, Japan)を 1 ml 加えて 12000 rpm で 5 分間遠心を行った. 上清を除去して 5 分間真空乾燥させ, 適量の DEPC treated water (NIPPON GENE, Toyama, Japan)

を加えて紫外可視分光光度計 UV-1200 (SHIMAZU, Kyoto, Japan)にて収量測定を行った。

## 9. 半定量 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

半定量 RT-PCR には TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa Bio., Shiga, Japan)を用いた。AMV Reverse Transcriptase XL と Oligo dT-Adaptor primer を用いて逆転写反応を行い、抽出した全 RNA から一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、各遺伝子の特異的プライマーと TaKaRa Ex Taq HS を反応させ PCR を行った。各遺伝子の特異的プライマーと PCR 条件を表 1 に示す。PCR 副産物の拡散分離には 2%アガロース (TakaRa, Shiga, Japan)ゲルを作製し、電気泳動を行った。泳動が終了したゲルをエチジウムブロマイド (Bio-Rad, CA, USA)で染色したのち、UV ライト 3UV Transilluminaytor (UVP, CA, USA)下で検出し、コンピュータ上で image J program にてそれぞれのバンド強度を計測して、それを GAPDH で補正した。

## 10. sphere formation assay

Wnt5b を 48 時間処理した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞を PBS(-)にて洗浄し，癌幹細胞増殖培地 (ProMab, CA, USA)で  $5 \times 10^4$  個/well に調整した．超低接着 6 well プレート (Corning, MA, USA)に細胞を播種し，5% CO<sub>2</sub> 気相下に 37°C で培養した．細胞を播種後 3 日目および 10 日目に，形成された sphere を 50 倍位相差顕微鏡 ZEISS Axiovert25 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)下にて観察し，無作為に 10 視野を撮影した．コンピュータ上で，形成された sphere の長径を Image J program を用いて計測し，また目視にて計測可能な sphere を算定してその長径を計測し，3 well 分の平均を算出した．

#### 11. Flow cytometry による CSC マーカー陽性細胞の解析

Wnt5b を 48 時間処理した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞を PBS (-)にて洗浄し，0.1% trypsin にて分散させ，PBS (-)にて  $1 \times 10^6$  個/100  $\mu$ l に調整した．CSC マーカーの抗体として，allophycocyanin (APC)標識抗ヒト CD44 マウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences, NJ, USA)および抗ヒト CD133 マウスモノクローナル抗体 (Miltenyi Biotec., CA, USA)を用いた．アイソタイプコントロールとして，APC Mouse IgG2b  $\kappa$  Isotype Control (BD Biosciences, NJ, USA)および Mouse

IgG2b-APC (Miltenyi Biotec., CA, USA)を用いた。抗 CD44 抗体は  $1 \times 10^6$  個/100  $\mu$ l に対して 1:6, 抗 CD133 抗体は 1:11 の割合で混合した。アイソタイプコントロールも同様の割合で混合した。遮光しながら 30 分間室温にてインキュベートし, 2% BSA と 0.1% アジ化ナトリウム (Wako, Osaka, Japan)を含む PBS (-)から成る stain buffer にて 2 回洗浄した。1 ml の stain buffer を加え, 遮光しながら氷上で維持し, BD FACSCalibur (BD Biosciences, NJ, USA)にて解析した。検出された数値は, アイソタイプコントロールの値を差し引くことで補正した。

## 12. 有意差検定

実験結果は平均値±標準偏差で表し, 2 群間の比較は Student-t 検定を用いた。

## 結 果

### 1. Wnt5b が細胞形態に及ぼす影響

SAS-GFP 細胞および新規に樹立した HSC3-GFP 細胞(図 5) は, いずれも細胞形態は敷石状を呈しており, また細胞間接着は密であった。Wnt5b 存在下で 48 時間培養したところ, SAS-GFP 細胞においては仮足様突起の伸長が観察された。細

細胞間接着は維持されていた。HSC3-GFP 細胞は，紡錘形様形態を呈する細胞が観察されたが，細胞間接着は維持されていた(図 6)。

## 2. Wnt5b が細胞増殖能に及ぼす影響

SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞を Wnt5b 存在下で 48 時間培養後，細胞を 6 well プレートに播種し経時的に細胞数を算定した。SAS-GFP 細胞は，播種後 3 日目までは対照群と Wnt5b 処理群との間に差を認めず，4 日目と 5 日目では Wnt5b 処理群の細胞数が対照群よりも平均で 1.2 倍となったが，有意差は認められなかった。HSC3-GFP 細胞では，5 日間を通して Wnt5b 処理群で対照群よりも細胞数の増加傾向が認められたが，有意差は見られなかった(図 7)。

## 3. Wnt5b が細胞遊走能に及ぼす影響 (migration assay)

Transwell chamber の上層チャンバー下底のメンブレンを通過した細胞の占める面積の割合は，SAS-GFP 細胞において，平均で，対照群で 1.8%，Wnt5b 処理群で 14.6%であった。HSC3-GFP 細胞では，平均で，対照群で 14.8%，Wnt5b 処理群で 26.8%であった。メンブレンに占める細胞占有面積は

SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞のいずれにおいても対照群より Wnt5b 処理群で有意に増加した(図 8).

#### 4. Wnt5b が細胞浸潤能に及ぼす影響 (invasion assay)

Matrigel がコートされた上層チャンバー下底のメンブレンを通過した細胞の占める面積の割合は, SAS-GFP 細胞において, 平均で, 対照群で 2.3%, Wnt5b 処理群で 12.0%であった. HSC3-GFP 細胞では, 平均で, 対照群で 9.5%, Wnt5b 処理群で 24.1%であった. メンブレンに占める細胞占有面積は SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞のいずれにおいても対照群より Wnt5b 処理群で有意に増加した(図 9).

#### 5. Wnt5b が細胞浸潤能に及ぼす影響 (リンパ管様ネットワーク付き三次元組織体モデルにおける評価)

構築された三次元組織体の上層に SAS-GFP 細胞あるいは HSC3-GFP 細胞を播種し, 5 日後に共焦点レーザー走査型顕微鏡にて 1 標本につき 10 箇所撮影を行った. これを 3 標本で繰り返した. 画像はコンピュータ上で三次元構築し, リンパ管様ネットワークの壁から任意の距離に浸潤した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞の割合を解析した. 平均値より大きく逸脱

した数値を除外し，SAS-GFP 細胞では，1 標本につき 6~9 箇所  
の平均を，HSC3-GFP 細胞では 1 標本につき 9~10 箇所の平均  
を算出した．リンパ管様ネットワークの壁から 10  $\mu\text{m}$ ，15  $\mu\text{m}$ ，  
および 20  $\mu\text{m}$  の距離に浸潤した Wnt5b 処理群の SAS-GFP 細胞  
は，それぞれ対照群の 1.2 倍，1.2 倍および 1.1 倍であった．  
このうち 15  $\mu\text{m}$  および 20  $\mu\text{m}$  では有意差を認めた(図 10)．ま  
た，データは示していないが，HSC3-GFP 細胞ではいずれの距  
離においても有意差は認めなかったが，Wnt5b 処理群の方が浸  
潤する傾向にあった．

三次元組織体の組織標本を作製し，上皮系細胞に発現する  
CK を免疫組織化学染色した．カルチャーインサート下底のメ  
ンブレンに到達した CK 陽性細胞を算定することで，三次元組  
織体における SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞の浸潤能を  
評価した．撮影した視野内における標本の長さは約 280 $\mu\text{m}$  で，  
その長さあたりに存在する下底に到達した CK 陽性細胞数の平  
均は，SAS-GFP 細胞において Wnt5b 処理群で対照群の 2.5 倍，  
HSC3-GFP 細胞では 3.0 倍と有意に増加した(図 11)．

## 6. Wnt5b が EMT 関連遺伝子発現に及ぼす影響

半定量逆転写 PCR では，EMT に関与するとされる転写因子

の slug, snail, twist, 上皮細胞マーカーである E-cadherin および間葉細胞マーカーの vimentin と N-cadherin の変化を評価した。Slug および snail は E-cadherin を直接抑制する zinc finger ファミリーの転写因子であり, twist は間接的制御転写因子 bHLH 型に属する。SAS-GFP 細胞では, Wnt5b 処理群で vimentin と N-cadherin の発現上昇を認めた。E-cadherin に著明な変化はみられなかった(図 12 A)。一方, HSC3-GFP 細胞では, E-cadherin の発現減少傾向を認めたが, vimentin や N-cadherin に大きな変化は認めなかった(図 12 B)。

## 7. Wnt5b が sphere 形成能へ及ぼす影響

Wnt5b を 48 時間処理した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞を超低接着 6 well プレートに播種し, 癌幹細胞増殖培地で培養した。培養後 3 日目および 10 日目に無作為に選出した 10 視野を撮影, 観察した。目視にて計測が可能であった sphere の長径の平均と, その中で  $75 \mu\text{m}^{49)}$ 以上の大きさを有する sphere 数を播種した細胞数 500 個に対する割合で算出した。

培養後 3 日目の SAS-GFP 細胞において, Wnt5b 処理群で形成された sphere の径は対照群の 1.7 倍であった。観察された sphere のうち, 長径が  $75 \mu\text{m}$  以上の sphere の数の割合は,



Wnt5b 処理群で対照群の 7.6 倍であった(図 13 A). 10 日目には, Wnt5b 処理群と対照群とも sphere の径は増大し, 両者間に有意差は見られなくなったが, 形成された sphere の形態は維持されていた(図 13 A). HSC3-GFP 細胞では, 培養後 3 日目に形成された Wnt5b 処理群の sphere の径は対照群の 1.6 倍で, 長径が 75  $\mu\text{m}$  以上の sphere の数の割合は, Wnt5b 処理群で対照群の 1.2 倍であった(図 13 B). 10 日目には, Wnt5b 処理群で形成された sphere の径は対照群の 1.2 倍となり, いずれも有意に増大していた(図 13 B).

#### 8. Wnt5b が CSC マーカーの発現に及ぼす影響

Wnt5b で 48 時間処理した細胞を, APC 標識抗ヒト CD44 抗体および抗 CD133 抗体に反応させ, flow cytometer にて解析した. SAS-GFP 細胞では, CD44 陽性細胞数は Wnt5b 処理群において対照群の 2.0 倍であったが有意差は認めなかった. CD133 陽性細胞は Wnt5b 処理群において対照群の 5.1 倍となり, 有意に増加していた(図 14 A). HSC3-GFP 細胞では, Wnt5b 処理群において, CD44 陽性細胞は対照群の 6.8 倍, CD133 陽性細胞は対照群の 13.1 倍となり, いずれも有意に増加していた(図 14 B).

## 考 察

微小環境構成液因子によるシグナル刺激を行って EMT ならびに CSC への影響をみた研究として、乳癌細胞ならびに OSCC の系が挙げられる。Asiedu らは、マウス乳癌細胞あるいはヒト乳癌細胞に TGF- $\beta$ と TNF- $\alpha$ をそれぞれ 30 日と 60 日間あるいは 40 日間作用させ、EMT および CSC が誘導されたと報告している<sup>50)</sup>。Lee らは OSCC に TNF- $\alpha$ を 60 日作用させ、Notch-Hes1 活性化を介して CSC 形質が誘導されたとしている<sup>51)</sup>。本研究では、より短い 48 時間の処理でこれら形質の獲得されるかにつき検討を行った。用いたのはいずれもヒト舌癌由来の OSCC で、GFP 遺伝子を導入した SAS-GFP 細胞と HSC3-GFP 細胞である。

SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞に Wnt5b を作用させて細胞増殖能を測定したところ、5 日間を通して対照群との間で有意差は認めなかった(図 7)。細胞間接着も密を保っており、細胞接着が失われるような大きな形態変化も観察されなかった(図 6)。一方、細胞遊走能および細胞浸潤能においては、Wnt5b を 48 時間作用させた群で遊走能および浸潤能とも有意に上昇した(図 8, 9)。Prgomet らが OSCC において Wnt5a の作用を

調べた研究においても，細胞増殖への影響はなく，細胞遊走能と浸潤能が亢進したと報告している<sup>35)</sup>．したがって，Wnt5bは2種類のOSCCにおいて細胞遊走能および浸潤能を亢進すると考えられた．

接着細胞は生体にて3次元的に構築されており，細胞間相互作用や細胞－細胞外マトリックス相互作用という環境におかれている．しかし，従来の2次元的な単層培養では必ずしも生体における生理的機能を再現しえず，近年では多くの三次元組織体モデルが考案されている．本研究に用いた三次元組織体モデルは，シングルセルにfibronectinとgelatinを交互にコーティングしてナノフィルムを形成し，これらの細胞をボトムアップで集積させて三次元組織体とし<sup>48,52)</sup>，さらに10層のNHDFの中間にHDLECをサンドイッチすることで，リンパ管様ネットワークを有する構造をとるモデルである(図4)．これを用いてWnt5bのSAS-GFP細胞およびHSC3-GFP細胞に対する作用を調べた(図10, 11)．これまで，二次元平面培養下でスクラッチした面が細胞の遊走で覆われる時間を指標として遊走能を評価するwound healing assayや，小孔を一定時間内に通過する細胞数を指標にして遊走能を評価するtranswell chamber assay，またmatrigelと小孔を一定時間内に通過する細胞数を

指標にして浸潤能を評価する transwell chamber assay が一般的に行われ、われわれもこれらを用いてきた。しかしながら、wound healing assay では培養皿上を平面的に移動する機能を評価しているに過ぎず、また増殖能が影響を及ぼすこともある。Transwell chamber assay では、単にメンブレンの小孔を通過する能力を評価していることになり、matrigel を浸潤するための機能も、細胞や細胞外基質を浸潤していく癌細胞の機能評価とはかけ離れていると考えられる。これに対して三次元組織体を用いた遊走能、浸潤能の評価は、三次元的に重層した線維芽細胞とその周囲の fibronectin や gelatin などの細胞外基質と、細胞外基質を溶解し、線維芽細胞間を遊走していくという、より生体に近い環境を再現していると考えられる。この評価法において、カルチャーインサート下底のメンブレンに到達した癌細胞が、SAS-GFP 細胞では Wnt5b 処理により 2.5 倍、HSC3-GFP 細胞では 3.0 倍であったことは、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ある(図 11)。

今回用いた三次元組織体の中では、リンパ管内皮細胞が管腔構造を形成している。これに対して、癌細胞がどの程度近接してくかを指標にしてリンパ管への浸潤を評価した。SAS-GFP

細胞においては， Wnt5b 処理群で有意差を認めたが， HSC3-GFP 細胞においては有意な差は認められず(図 10)，リンパ管への遊走や浸潤に対する Wnt5b の効果は，OSCC の細胞種によって異なる可能性が考えられた．

次に Wnt5b の EMT への関与を検討した．一般的に， EMT では E-cadherin の N-cadherin への置換， actin 骨格のストレスファイバーへのリモデリングと細胞突起部への集積， cytokeratin の vimentin への置換，細胞間接着の消失と基底膜の分解，そして間質への浸潤がみられる<sup>6,53)</sup>． EMT 関連の接着因子として E-cadherin， N-cadherin， および vimentin を， 転写因子として snail， slug， twist の発現を RT-PCR で調べたところ， Wnt5b 処理群では， SAS-GFP 細胞において対照群と比較して N-cadherin と vimentin の発現が上昇した(図 12 A)． E-cadherin には顕著な差はみられなかった(図 12 A)． HSC3-GFP 細胞では E-cadherin のわずかな発現減少を認めた(図 12 B)．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． このことより， Wnt5b によって上皮細胞マーカーの低下と間葉細胞マーカーの上昇はみられるが顕著な EMT を誘導したとはいえない． EMT が生じる際には， E-cadherin が N-cadherin へ移行する cadherin

switching が起こるとされる。TGF- $\beta$ でマウス乳腺細胞を処理し EMT を誘導した場合、N-cadherin は TGF- $\beta$ 処理開始後 12 時間で発現上昇がみられるようになり、処理開始後 3 日目で最大にまで上昇した一方で、E-cadherin は処理開始後 3 日目以降から発現減少が確認されるようになったことから、N-cadherin の発現上昇と E-cadherin の発現減少は必ずしも平行していない<sup>54)</sup>。また、E-cadherin に有意に変化がなくとも N-cadherin 発現が上昇することや<sup>54,55)</sup>、細胞遊走には N-cadherin が重要とする報告もみられる<sup>54)</sup>。今回 OSCC に Wnt5b を作用させたが、いずれの細胞でも細胞間隙は維持され、間葉細胞に特徴的な紡錘形への著明な形態変化も明らかでなかったことから、細胞間結合を維持しながら細胞遊走ならびに浸潤能が亢進したことになる。Gonzalez らは、EMT とその逆の間葉上皮転換 mesenchymal-epithelial transition (MET) の 2 方向の移行型が存在しており、また EMT も partial EMT が存在するとしている<sup>56)</sup>。発生過程で神経堤細胞が遊走する際に細胞間結合を失うことなく集団で移動するために、これらの細胞は上皮と間葉細胞両方の性格を維持している<sup>56)</sup>。今回の Wnt5b による変化は OSCC の partial EMT に相当するとも考えられる。

接着性細胞は、非接着条件においては anoikis とよばれるア

ポトーシスが誘導される。Anoikis 耐性を獲得した細胞は sphere を形成する<sup>57)</sup>。非接着条件および無血清培地による培養で形成された sphere は CSC に富むとされている<sup>58)</sup>。本研究では、SAS-GFP 細胞と HSC3-GFP 細胞のいずれにおいても、Wnt5b を 48 時間処理した細胞を用いて sphere 形成を行ったところ、培養 3 日後に sphere 径の平均は対照群よりも増大していた(図 13)。SAS-GFP 細胞では、sphere 数も有意に増加していた。これら OSCC は非処理細胞でも 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も分かった。

Asiedu らが乳癌細胞に長期間 TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  を作用させた研究では、細胞は円形から細長く形態変化し、E-cadherin の発現の喪失、間葉系マーカーである N-cadherin, snail, twist, Zeb1 の発現上昇を示したが、処理早期の段階ではこれらマーカーの変化は部分的であった。そして、長期処理により、TGF- $\beta$ /TNF- $\alpha$  による EMT が、CD44<sup>+</sup>/CD22<sup>-</sup> やタイト結合に関わる claudin と管腔細胞マーカーの cytokeratin18 の発現低下を伴った安定的な CSC 形質を獲得したとしている<sup>50)</sup>。また

OSCC では、TNF- $\alpha$ を作用させることで、腫瘍の sphere 形成能の獲得、幹細胞関連遺伝子の発現、化学療法抵抗性、腫瘍原性の獲得が認められ CSC 形質が獲得されたとしている<sup>51)</sup>。ここでは、Notch シグナルが重要な役割を果たすとしている<sup>51)</sup>。Wnt と CSC の関連では、HNSCC において、分泌型 Wnt アンタゴニストのひとつである secreted frizzled-related protein4 (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がある<sup>58)</sup>。また、中咽頭癌では Wnt5a の発現が亢進しており、その培養細胞を用いて 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<sup>+</sup>/CD22<sup>-</sup>の CSC が低下することを示している<sup>59)</sup>。

Wnt5b を作用させた細胞の細胞表面マーカーを flow cytometry にて解析したところ、CD44 に関しては、SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞のいずれでも CD44 陽性細胞は Wnt5b 群で増加したが、SAS-GFP 細胞では対照群との間で有意差を認めなかった(図 14)。使用した OSCC における CD44 の発現につき選定した条件下での陽性細胞の割合は 1~2%と低いレベルであったが、HNSCC の cell line では CD44 が高発現する割合は 10%以下とされ<sup>19)</sup>、ヒト HNSCC の生検組織から検



出された CD44 陽性細胞は平均で 25.7~97.8%であったと報告されている<sup>17)</sup>。また、免疫組織化学染色においては、29 例中 27 例に CD44 が発現していたと報告されている<sup>20)</sup>。CD44 は HNSCC において一定の発現があると考えられ、Wnt5b はその発現陽性細胞を増加させるといえる。CD133 は、いずれの細胞でも Wnt5b 処理群で増加がみられた(図 14)。今回の選定条件下で対照群から検出された CD133 陽性細胞は 1%以下の低い割合であったが、過去の報告でも SAS 細胞での CD133 陽性細胞の割合は、“very low”と報告されている<sup>16)</sup>。ほかの報告では、HEp-2 細胞では 5%以下とされ、免疫組織化学染色では組織標本 29 例中 3 例が CD133 陽性であった<sup>20)</sup>。このように、CD133 の OSCC における発現は低いと推察されるが、Wnt5b は CSC を誘導し、その発現を亢進させると考えられる。

近年、腫瘍組織における CSC 形質の獲得には EMT が関与することが報告されている<sup>60,61)</sup>。Scheel らは、乳癌細胞における EMT は癌微小環境から受けるシグナルにより惹起され、そのシグナル経路は TGF- $\beta$  と canonical 経路および non-canonical 経路を含む Wnt シグナル経路であるとし、これらのシグナルを阻害することで遊走能の低下と sphere 形成能や腫瘍形成能が低減したと報告している<sup>62)</sup>。OSCC において

Wnt5b は遺伝子発現に関わる canonical 経路ではなく non-canonical 経路のリガンドであるとされており、どのようにして Wnt5b が EMT および CSC に関わる遺伝子発現を制御するか明らかでない。これに関連して、Qin らは、Wnt5a を用いた実験系で、PKC のリン酸化が中咽頭癌細胞の EMT に関与するとしている<sup>59)</sup>。さらに、Gujral らは、Wnt5a/b が関わる non-canonical 経路において、Frizzled 2 受容体、Fyn kinase、および STAT3 が固形癌の EMT に関与するとしている<sup>63)</sup>。これらの経路が Wnt5b による CSC 獲得に働く可能性が高い。

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。

## 結 語

1) Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞は、対照群と同様に細胞間接着は密であった。また、Wnt5b 処理した細胞は、対照群と比較して、増殖能に変化はみられなかった。

2) Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞は、対照群と比較して、migration assay, invasion assay および三次元組織体モデルにて、遊走能および浸潤能の有意な上昇を認めた。

3) Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞は、対照群と比較して、間葉細胞マーカーである vimentin および N-cadherin の mRNA の発現上昇を認めた。また、HSC3-GFP 細胞では、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現低下傾向を認めた。

4) Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞は、対照群と比較して、sphere formation assay にて、sphere 形成能の有意な亢進を認めた。さらに、flow cytometry にて、CD44 および CD133 陽性細胞の増加を認めた。

## 結 論

癌微小環境において、Wnt シグナル経路のリガンドとして作用する Wnt5b は、転移および転移病巣の形成に寄与する可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えていただき，ご指導とご校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第二教室)由良義明教授，ならびに本研究計画の立案と実施に際し，始終ご懇篤なるご指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第二教室)岩井聡一博士に謹んで感謝の意を表します．また，多大なるご指導，ご協力いただきました大阪大学大学院生命機能研究科明石満特任教授，大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻分子創生化学コース有機工業化学領域松崎典弥准教授ならびに大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻分子創生化学コース有機工業化学領域天野雄斗君に心より感謝申し上げます．また，細胞を提供していただいた当研究科口腔生化学教室波多賢二准教授，およびご指導いただきました森田祥弘博士に厚く御礼申し上げます．また，研究の遂行にあたり，特別のご配慮とご協力を頂戴しました本学部口腔外科学第二教室の皆様にも厚く御礼申し上げます．

## 文 献

- [1]World Health Organisation. (2014) : Locally advanced squamous carcinoma of the head and neck. 1–8
- [2]Sasahira, T., Kirita, T. and Kuniyasu, H.(2014) : Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. *Int J Clin Oncol* **19**, 431–436
- [3]Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. and Nieto, M. A.(2009) : Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890
- [4]Talbot, L. J., Bhattacharya, S. D. and Kuo, P. C.(2012): Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol* **3**, 117–136
- [5]Krisanaprakornkit, S. and Iamaroon, A.(2012) : Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncol* **2012**, 1–10
- [6]Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M. and Ford, H. L. (2010) : Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 117–134

- [7] ISobe, T., Yamamoto, G., Irie, T., Tachikawa, T. and Mishima, K. (2012) : Gene expression of cancer stem cell in oral squamous cell carcinoma. *Dent med Res* **32**, 81–89
- [8] Allegra, A., Andrea, A., Giuseppa, P., Vanessa, I., Demetrio, G., Francesco, R. and Caterina, M. (2014) : The cancer stem cell hypothesis: A guide to potential molecular targets. *Cancer Invest* **7907**, 470–495
- [9] Bonnet, D. and Dick, J.E. (1997) : Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730-737
- [10] Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. and Clarke, M.F. (2003) : Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-3988
- [11] Singh, S., Clarke, I., Terasaki, M. and Bonn, V. (2003) : Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821–5828
- [12] Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J. and Collins, A.T. (2004) : CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell*

*Sci* **117**, 3539-3545

- [13]Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C. and De.Maria, R.(2007) : Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115
- [14]Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozzi, E, Biffoni, M., Di. Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C. and De.Maria, R.(2008) : Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* **15**, 504-514
- [15]Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F. and Ailles, L.E. (2007) : Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 973–978
- [16]Chen, S.-F., Yun-Ching, C., Shin, N., Chia-Lin, L., Chin-Yuh, Y. and Yaoh-Shiang, L. (2012) : Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties. *PLoS One* **7**, e31864

- [17]Mannelli, G. Magnelli, L., Deganello, A., Busoni, M., Meccariello, G., Parrinello, G. and Gallo, O. (2015) : Detection of putative stem cells markers, CD44/CD133, in primary and lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinomas. A preliminary immunohistochemical and in vitro study. *Clin Otolaryngol* 40, 312–320
- [18]Goodison, S., Urquidi, V. and Tarin, D. (1999) : CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 52, 189-196
- [19]Athanasassiou-Papaefthymiou, M., Shkeir, O., Kim, D., Divi, V., Matossian, M., Owen, J.H., Czerwinski, M.J., Papagerakis, P., McHugh, J., Bradford, C.R., Carey, T.E., Wolf, G.T., Prince, M.E. and Papagerakis, S. (2014) : Evaluation of CD44 variant expression in oral, head and neck squamous cell carcinomas using a triple approach and its clinical significance. *Int J Immunopathol Pharmacol* 27, 337-349.
- [20]Mannelli, G. and Gallo, O. (2012) : Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev* 38, 515–539



- [21]Irollo, E. and Pirozzi, G. (2013) : CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res* **5**, 563–581
- [22]山本英樹.(2008) : Wnt シグナル伝達経路の活性制御と発がんとの関連. *生化学* **80**, 1079-1093.平成 20.
- [23]Miller, J.R. (2002) : The Wnts. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3001.1-3001.15
- [24]Kikuchi, A. and Yamamoto, H. (2008) : Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signaling. *Cancer Sci* **99**, 202–208
- [25]Noguti, J., Moura,C.F.G., Hossaka, T.A., Franco, M., Oshima, C.T., Dedivitis, R.A. and Ribeiro, D.A.(2012) : The role of canonical WNT signaling pathway in oral carcinogenesis: a comprehensive review. *Anticancer Res* **32**, 873–878
- [26]MacDonald, B. T., Tamai, K. and He, X. (2009) : Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and Ddiseases. *Dev Cell* **17**, 9–26
- [27]Anastas, J. N. and Moon, R. T.(2013) : WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**, 11–26

- [28]Vela, I., Morrissey, C., Zhang, X., Chen, S., Corey, E., Strutton, G.M., Nelson, C.C., Nicol, D.L., Clements, J.A. and Gardiner, E.M.(2014) : PITX2 and non-canonical Wnt pathway interaction in metastatic prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* **31**, 199–211
- [29]Saitho, T. and Katho, M. (2001) : Molecular cloning and characterization of human WNT5B on chromosome 12p13.3 region. *Int J Oncol* **19**, 347-351
- [30]Weeraratna, A. T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M. and Trent, J.M. (2002) : Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* **1**, 279–288
- [31]Huang, C.l., Liu, D., Nakano, J., Ishikawa, S., Kontani, K., Yokomise, H. and Ueno, M., (2005) : Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **23**, 8765–8773
- [32]Kurayoshi, M., Oue, N., Yamamoto, H., Kishida, M., Inoue, A., Asahara, T., Yasui, W. and Kikuchi, A.(2006) :

- Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* **66**, 10439-10548
- [33]Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trümper, L. and Binder, C. (2006) : Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5454–5459
- [34]Yamamoto, H., Oue, N., Sato, A., Hasegawa, Y., Yamamoto, H., Matsubara, A., Yasui, W. and Kikuchi, A. (2010) : Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* **29**, 2036–2046
- [35]Prgomet, Z., Axelsson, L., Lindberg, P. and Andersson, T. (2015) : Migration and invasion of oral squamous carcinoma cells is promoted by WNT5A, a regulator of cancer progression. *J. Oral Pathol Med* **44**, 776–784
- [36]Yang, L., Perez, Aldwin, A., Fujie, S., Warden, C., Li, J., Wang, Y., Yung, B., Chen, Y.R., Liu, X., Zhang, H., Zheng, S., Liu, Z., Ann, D. and Yen, Y. (2014) : Wnt modulates

MCL1 to control cell survival in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* **14**, 124

[37]Chakravadhanula, M., Hampton, C.N., Chodavadia, P., Ozols, V., Zhou, L., Catchpoole, D., Xu, J., Erdreich-Epstein, A. and Bhardwaj, R. D. (2015) : Wnt pathway in atypical teratoid rhabdoid tumors. *Neuro Oncol* **17**, 526–535

[38]Mangioni, S. Vigano, P., Lattuada, D., Abbiati, A., Vignali, M. and Di Blasio, A.M. (2005) : Overexpression of the Wnt5b gene in leiomyoma cells: implications for a role of the Wnt signaling pathway in the uterine benign tumor. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 5349–5355

[39]Deraz, E. M., Kudo, Y., Yoshida, M., Obayashi, M., Tsunematsu, T., Tani, H., Siriwardena, S.B.S.M., Keikhaee, M.R., Kiekhuae, M.R., Qi, G., Iizuka, S., Ogawa, I., Campisi, G., Lo Muzio, L., Abiko, Y., Kikuchi, A. and Takata, T. (2011) : MMP-10/stromelysin-2 promotes invasion of head and neck cancer. *PLoS One* **6**, e25438

[40]Ripka, S., König, A., Buchholz, M., Wagner, M., Sipos, B.,

- Klöppel, G., Downward, J., Gress, Tm. and Michl, P. (2007) : WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* **28**, 1178–1187
- [41]Quail, D. F. and Joyce, J. A. (2013) : Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423–1437
- [42]Many, A. M. and Brown, A. M. C. (2014) : Both canonical and non-canonical Wnt signaling independently promote stem cell growth in mammospheres. *PLoS One* **9**, 1–9
- [43]Zhang, X., Lou, Y., Wang, H., Zheng, X., Dong, Q., Sun, J. and Han, B.(2015) : signaling regulates the stemness of lung cancer stem cells and its inhibitors exert anticancer effect on lung cancer SPC-A1 cells. *Med Oncol* **32**, 462
- [44]Morita, Y., Hata, K., Nakanishi, M. and Omata, T. (2015) : Cellular fibronectin 1 promotes VEGF-C expression , lymphangiogenesis and lymph node metastasis associated with human oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis* **32**, 739–753
- [45]Takeshita, A., Iwai, S., Morita, Y. and Niki-Yonekawa, A.

- (2014) : Wnt5b promotes the cell motility essential for metastasis of oral squamous cell carcinoma through active Cdc42 and RhoA. *Int J Oncol* **44**, 59–68
- [46]高橋喜久雄，金沢春幸，秋山行弘，田崎滋子，高原正明，武藤寿孝，丹沢秀樹，佐藤研一(1989)：ヒト舌癌原発巣より得られた低分化型扁平上皮癌(SAS)の樹立．口科誌．38(1):20-28，平成元．
- [47]百瀬文雄，平田章二，新井田俊雄，田中信幸，塩田重利(1986)：3つの口腔扁平上皮癌細胞の性状について．口科誌．35(2):485-496，昭和60．
- [48]Nishiguchi, A., Yoshida, H., Matsusaki, M. and Akashi, M. (2011) : Rapid Construction of Three-Dimensional Multilayered Tissues with Endothelial Tube Networks by the Cell-Accumulation Technique. *Adv Mater* **23**, 3506–3510.
- [49]Shrivastava, S., Steele, R., Sowadski, M., Crawford, S.E., Varvares, M. and Ray, R.B.(2015) : Identification of molecular signature of head and neck cancer stem-like cells. *Sci Rep* **5**, 7819
- [50]Asiedu, M.K., Ingle, J.N., Behrens, M.D., Radisky, D.C.

- and Knutson, K.L. (2011) : TGF $\beta$  /TNF $\alpha$  -mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res* **71**, 5942–5942
- [51]Lee, S.H., Hong, H.S., Liu, Z.X., Kim, R.H., Kang, M.K., Park, N.H. and Shin, K.H. (2013) : TNF $\alpha$  enhances cancer stem cell-like phenotype via Notch-Hes1 in OSCC. *Biochem Biophys Res Commun* **424**, 58–64
- [52]Matsusaki, M., Case, C. P. and Akashi, M. (2014) : Three-dimensional cell culture technique and pathophysiology. *Adv Drug Deliv Rev* **74**, 95–103
- [53]Talbot, L. J., Bhattacharya, S. D. and Kuo, P. C.(2012) : Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol* **3**, 117–136
- [54]Maeda, M., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (2005) : Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci* **118**, 873–887

- [55] Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. and Johnson, K. R. (2008) : Cadherin switching. *J Cell Sci* **121**, 727–735
- [56] Gonzalez, D. M. and Medici, D. (2014) : Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* **7**, 1–17
- [57] Malagobadan, S. and Nagoor, N. H. (2015) : Evaluation of microRNAs regulating anoikis pathways and its therapeutic potential. *Biomed Res Int* **2015**, 716816
- [58] Warriar, S., Bhuvanalakshmi, G., Arfuso, F., Rajan, G., Millward, M. and Dharmarajan, A. (2014) : Cancer stem-like cells from head and neck cancers are chemosensitized by the Wnt antagonist, sFRP4, by inducing apoptosis, decreasing stemness, drug resistance and epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Gene Therapy* **21**, 381-388
- [59] Qin, L., Yan-tao, L., Fang-jing, Z., Li-xia, P., Chang-fu, Y., Ying-Na, B., Ying-Ying, L., Xin-Jian, L., Yan-Qun, X., Rui, S., An-Hua, L., Ru-Hai, Z., Xiao-Qing, P., Bi-Jun, H., Tie-Bang, K., Duan-Fang, L., Yi-Xin, Z., Bart O.W. and



- Chao-Nan, Q. (2015) : WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget* **6**, 10239–10252
- [60]Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. and Weinberg, R.A. (2008) : The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715
- [61]Pirozzi, G., Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., Rocca, A.L., Liguori, E., Martucci, N., Paino, F., Normanno, N. and Rocco, G. (2011) : Epithelial to mesenchymal transition by TGF  $\beta$  -1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line. *PLoS One* **6**, e21548
- [62]Scheel, C., Eaton, E.N., Li, Sophia H.J., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A.L. and Weinberg, R.A. (2011) : Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal

and stem cell states in the breast. *Cell* **145**, 926–940

[63]Gujral, T. S., Marina, C., Leonid, P., Peter K.S., Marc W.K. and Gavin, M. (2014) : A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and Metastasis. *Cell* **159**, 844–856

## 脚 注

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第二教室)

主任：由良義明教授

本論文の要旨の一部は，第 69 回日本口腔科学会学術集会(平成 27 年，大阪)，第 60 回日本口腔外科学会学術集会(平成 27 年，名古屋)および第 52 回日本口腔組織培養学会学術集会(平成 27，徳島)において発表した。

表 1 半定量 PCR に用いたプライマー

		primer	denaturation	annealing	extension	cycle
Slug	S	5'-TGATGAAGAGGAAAGACTACAG-3'	94°C,30sec.	55°C,30sec.	72°C,1min.	30
	AS	5'-GCTCACATATTCCTTGTCACAG-3'				
Snail	S	5'-CGAAAGGCCTTCAACTGCAAT-3'	94°C,30sec.	55°C,30sec.	72°C,1min.	40
	AS	5'-ACTGGTACTTCTTGACATCTG-3'				
Twist	S	5'-GGAGTCCGCAGTCTTACGAG-3'	94°C,30sec.	55°C,30sec.	72°C,1min.	30
	AS	5'-TCTGGAGGACCTGGTAGAGG-3'				
E-cadheline	S	5'-AGCCATGGGCCCTTGAG-3'	94°C,30sec.	58°C,30sec.	72°C,1min.	30
	AS	5'-CCAGAGGCTCTGTACCTTC-3'				
Vimentin	S	5'-TGGCACGTCTTGACCTTGAA-3'	94°C,30sec.	55°C,30sec.	72°C,1min.	30
	AS	5'-GGTCATCGTGATGCTGAGAA-3'				
N-cadheline	S	5'-GATGTTGAGGTACAGAATCGT-3'	94°C,30sec.	55°C,30sec.	72°C,1min.	30
	AS	5'-GGTCGGTCTGGATGGCGA-3'				
GAPDH	S	5'-CAACTACATGGTTTACATGTTC-3'	94°C,30sec.	55°C,30sec.	72°C,1min.	30
	AS	5'-GCCAGTGGACTCCACGAC-3'				

S : センス鎖 AS : アンチセンス鎖

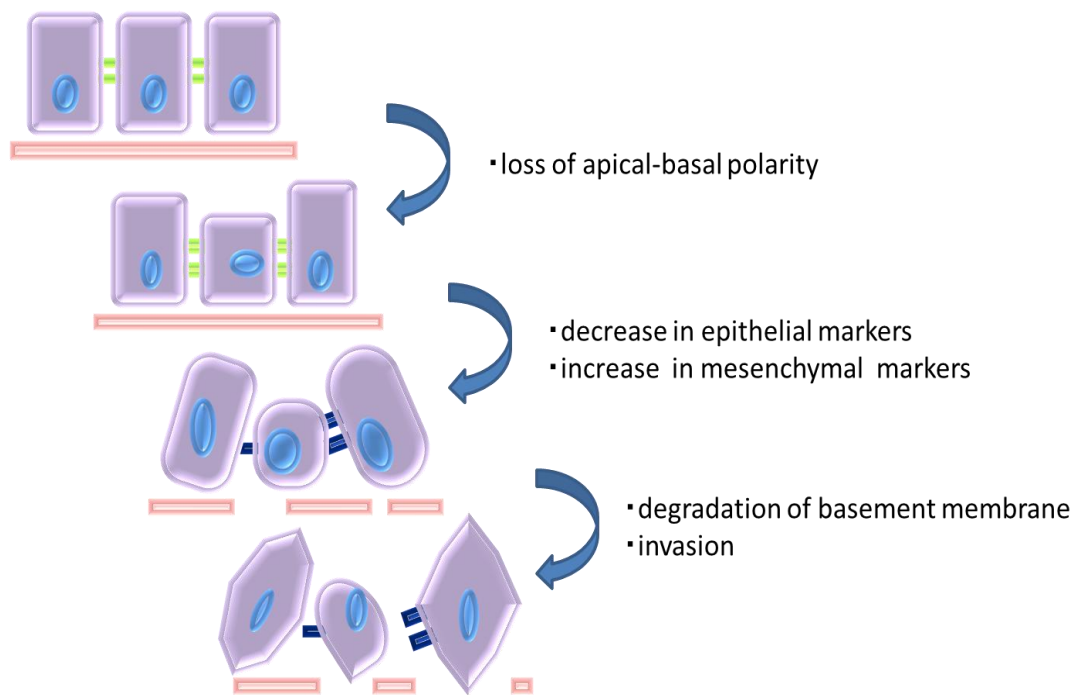


図 1 EMT と癌浸潤

EMT は、細胞極性の消失、上皮細胞マーカーの発現減少、間葉細胞マーカーの発現上昇、基底膜の分解、浸潤と進む。

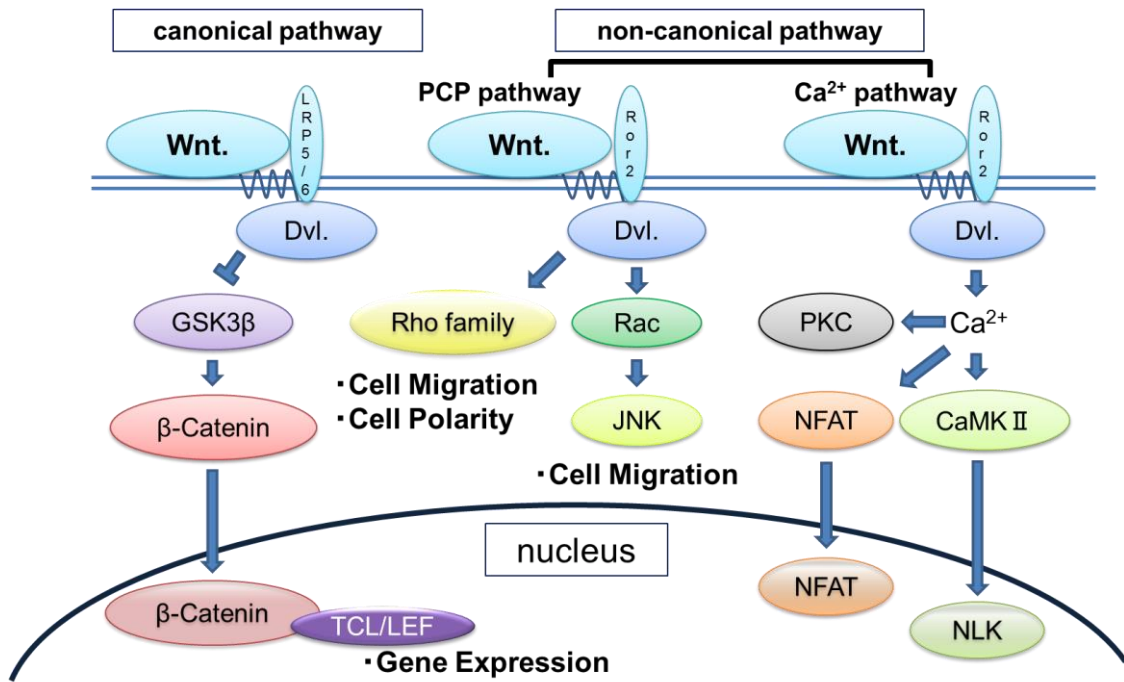


図 2 Wnt シグナル 経路

Wnt シグナル 経路は左端に示すβ-catenin 依存経路の canonical 経路と、右側に示すβ-catenin 非依存経路の non-canonical 経路に大別される。Non-canonical 経路は中央に示す PCP 経路と右端に示す Ca<sup>2+</sup> 経路の 2 つに分けられる。Wnt シグナル 経路の canonical 経路は遺伝子発現を制御し、non-canonical 経路は細胞の極性や遊走に関与することで、悪性腫瘍においては進展や転移に関与するとされている。

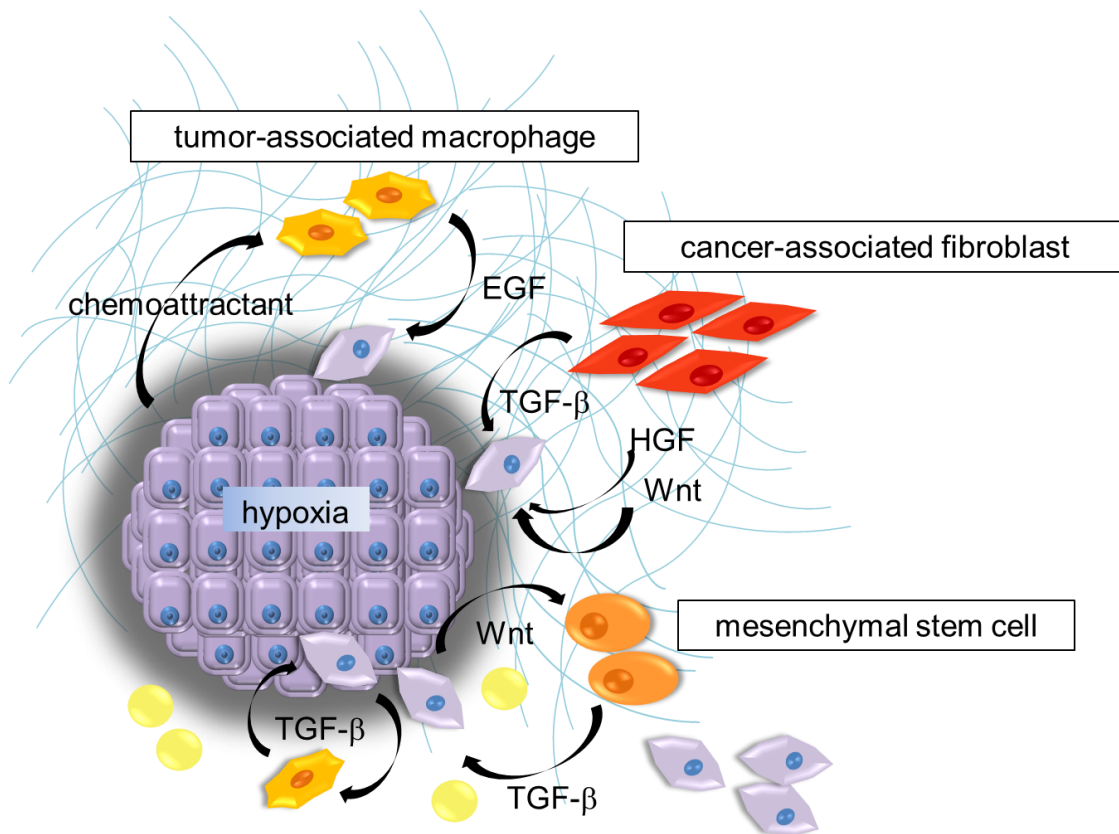


図 3 癌微小環境と EMT

EMT は TGF- $\beta$ , EGF, HGF, Wnt などのシグナル伝達経路や、低酸素刺激などの癌微小環境により誘導される。

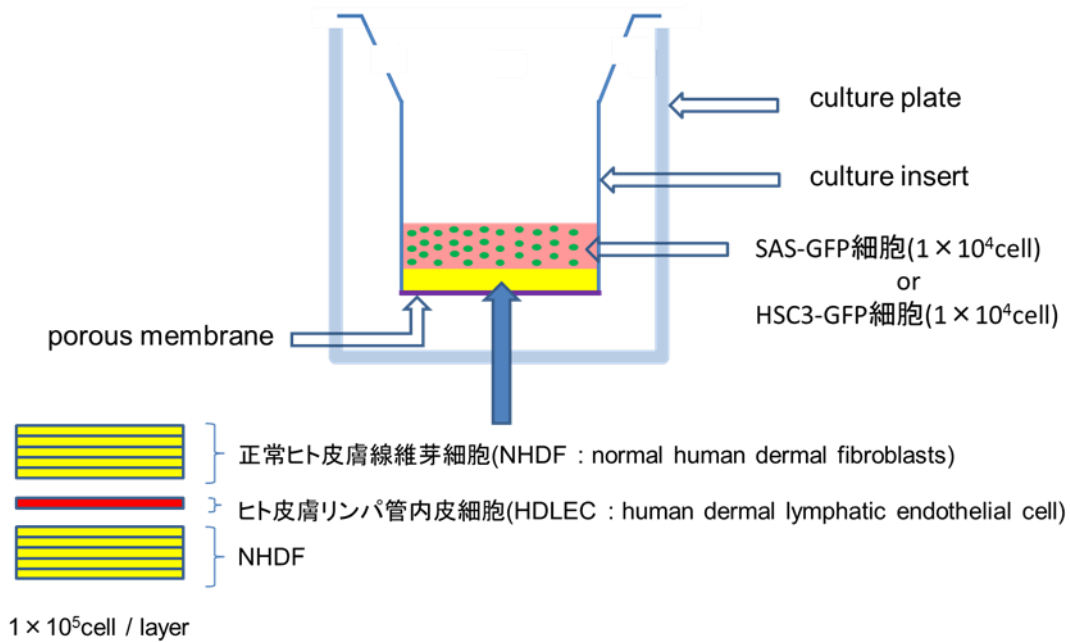


図 4 リンパ管様ネットワーク付き三次元組織体モデル

下底に  $0.4\mu\text{m}$  の小孔を有するメンブレンが張られた 24 well カルチャープレートのインサート内に，NHDF:HDLE:NHDF を 5:1:5 で有する三次元組織体を構築した．三次元組織体の上層に Wnt5b 処理した SAS-GFP 細胞あるいは HSC3-GFP 細胞を  $1 \times 10^4$  個/well に調整して播種し，5%  $\text{CO}_2$  気相下に  $37^\circ\text{C}$  で 5 日間培養した．



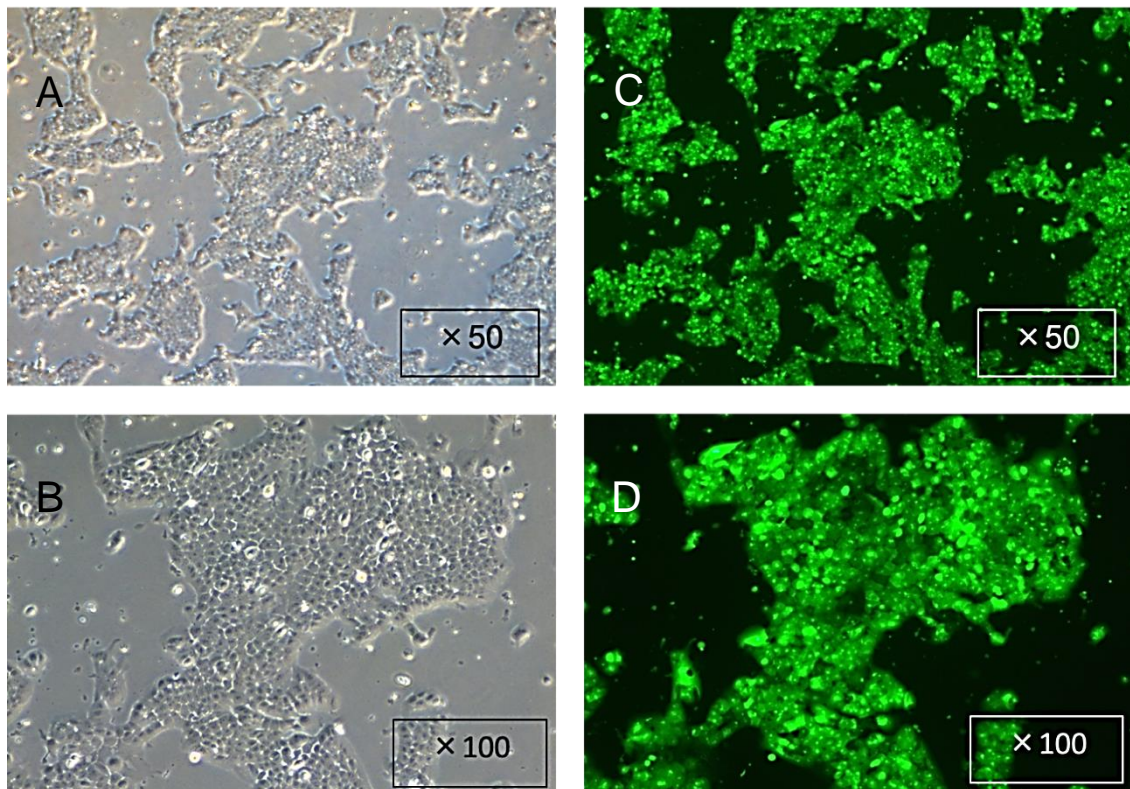
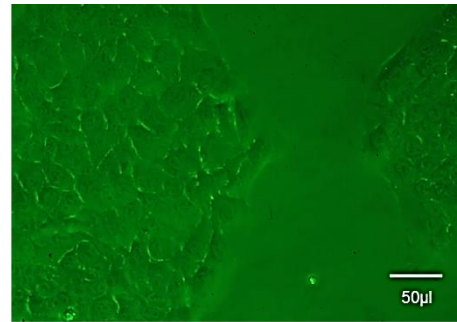
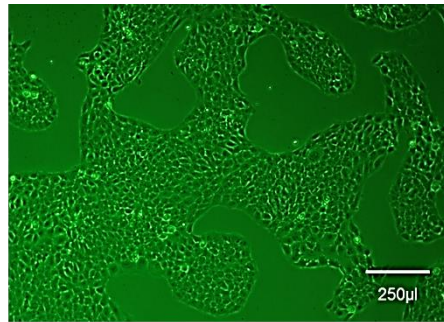


図 5 HSC3-GFP 細胞の樹立

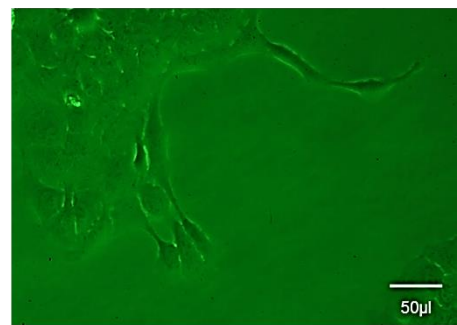
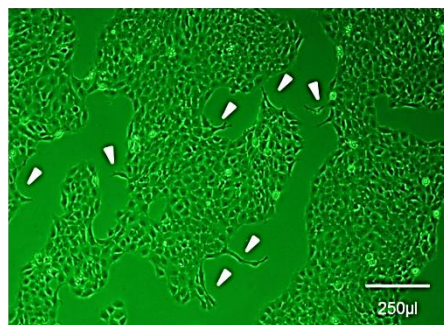
HSC-3 細胞に GFP 遺伝子を導入し，HSC3-GFP 細胞を樹立した．  
HSC3-GFP 細胞の位相差顕微鏡写真(A, B)と蛍光顕微鏡写真を示す(C, D)．敷石状の形態と蛍光の発色を認めた．

A

control

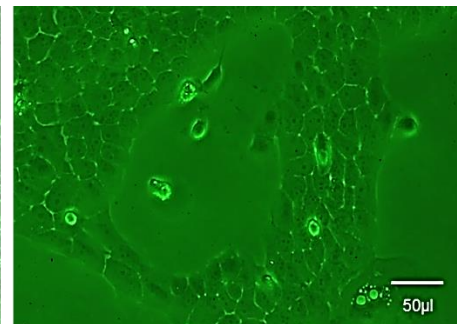
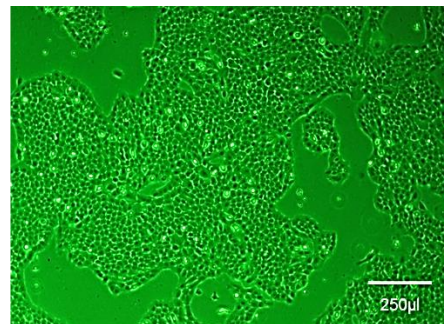


Wnt5b(+)



B

control



Wnt5b(+)

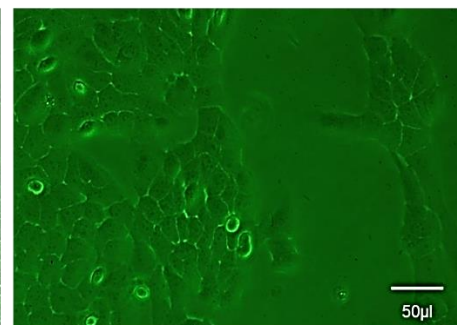
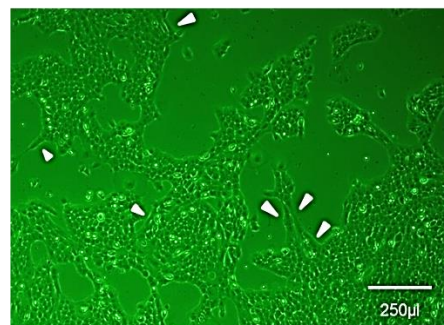
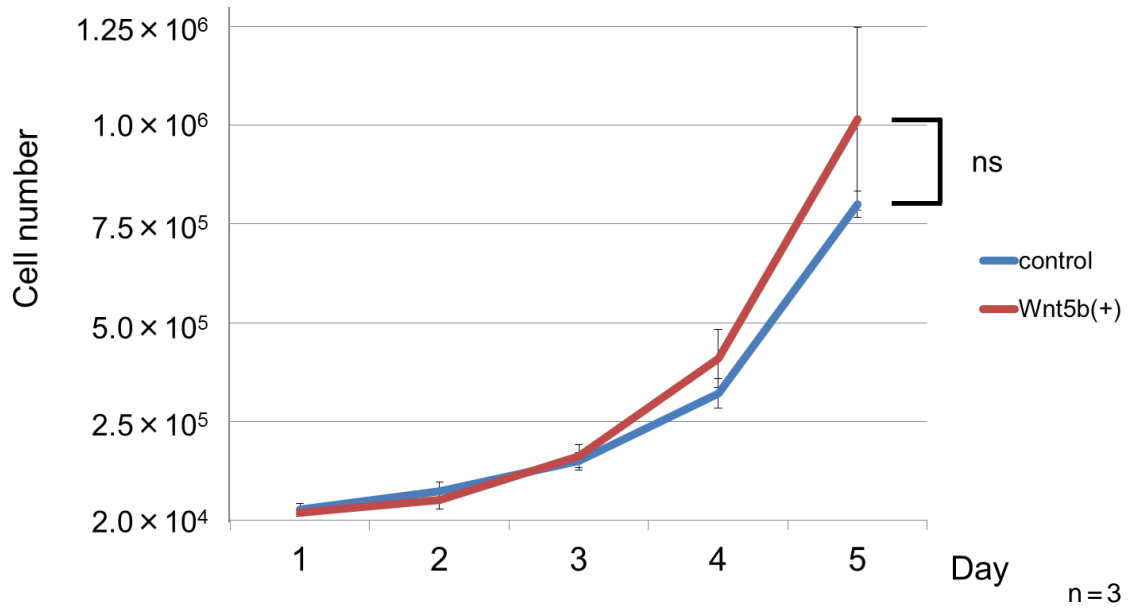


図 6 Wnt5b が細胞形態に及ぼす影響

SAS-GFP 細胞(A)あるいは HSC3-GFP 細胞(B)の細胞形態は敷石状で細胞間接着は密であった。Wnt5b 存在下で 48 時間培養したところ、SAS-GFP 細胞では仮足様突起の伸長が観察され(矢頭)、HSC3-GFP 細胞では紡錘形様形態を呈する細胞が観察されたが(矢頭)、いずれも細胞間接着は維持されていた。

A



B

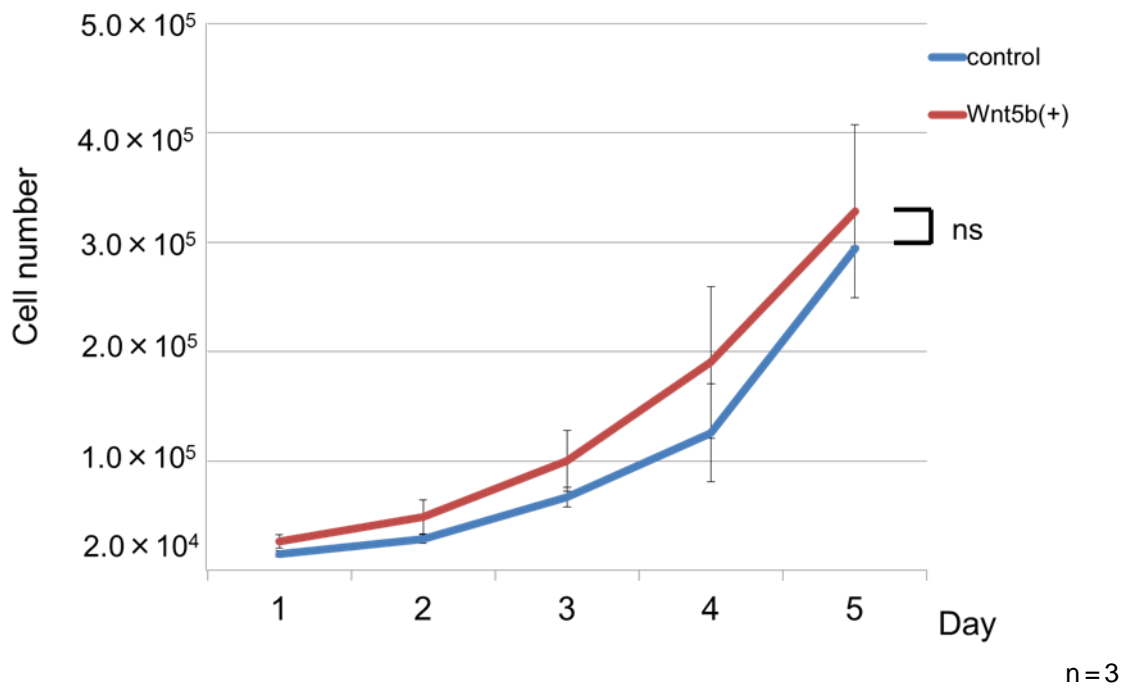
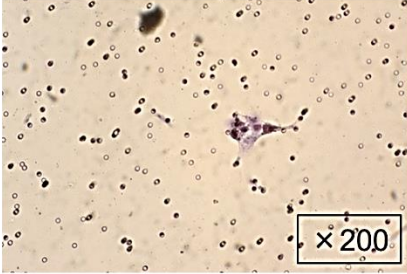


図 7 Wnt5b が細胞増殖能に及ぼす影響

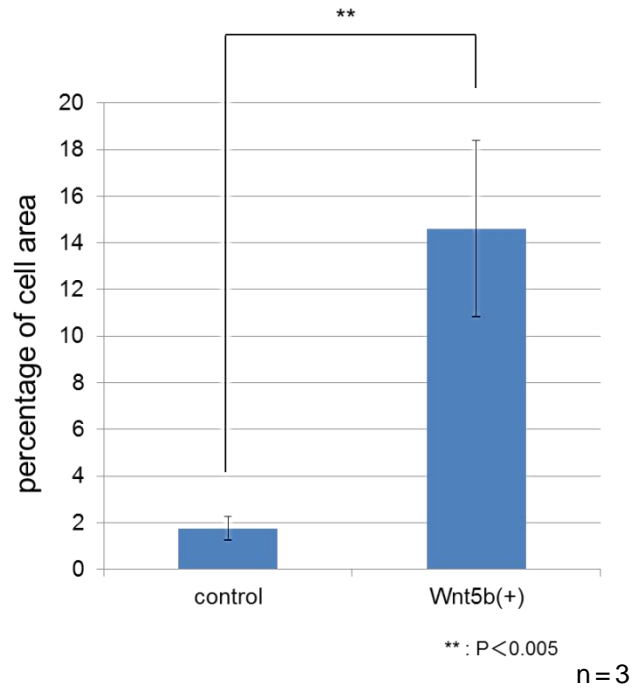
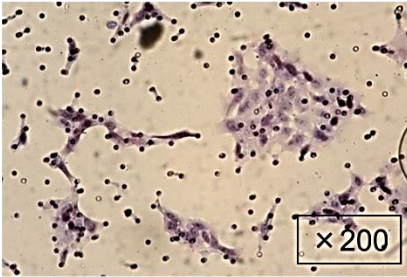
SAS-GFP 細胞 (A) あるいは HSC3-GFP 細胞 (B) を Wnt5b 存在下で 48 時間培養後、細胞を 6 well プレートに播種し経時的に細胞数を算定した。SAS-GFP 細胞は、播種後 3 日目までは対照群と Wnt5b 処理群との間に差を認めず、4 日目と 5 日目では Wnt5b 処理群の細胞数が対照群よりも平均で 1.2 倍となったが、有意差は認められなかった。HSC3-GFP 細胞では 5 日間を通して Wnt5b 処理群で対照群よりも細胞数の増加傾向が認められたが、有意差は見られなかった。

A

control

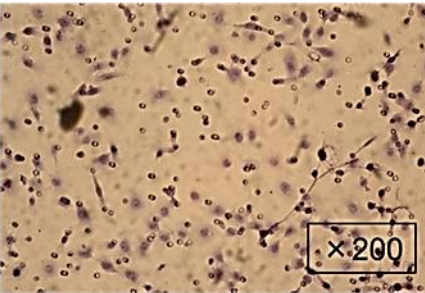


Wnt5b(+)



B

control



Wnt5b(+)

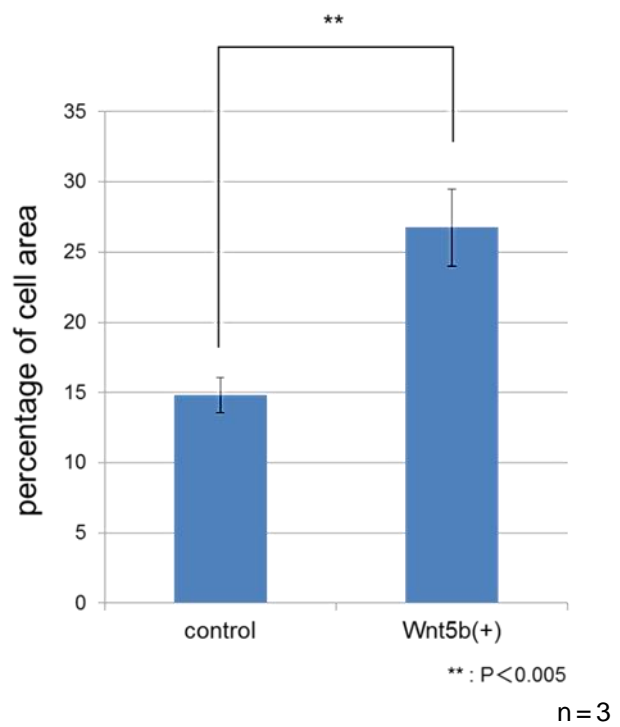
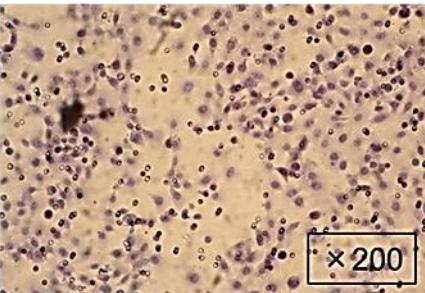
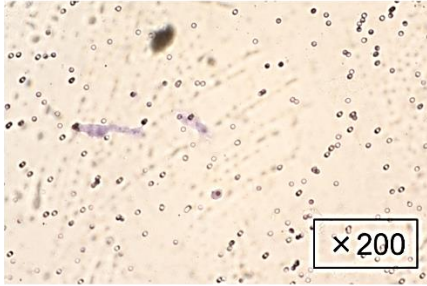


図 8 Wnt5b が細胞遊走能に及ぼす影響

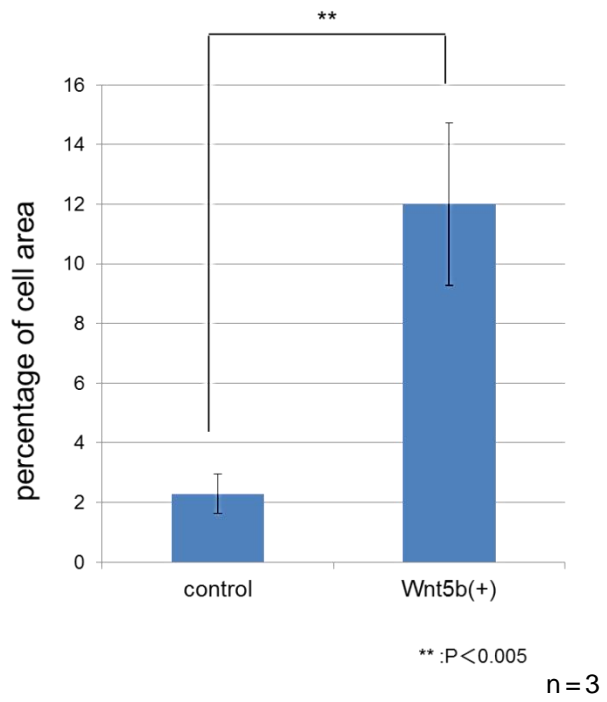
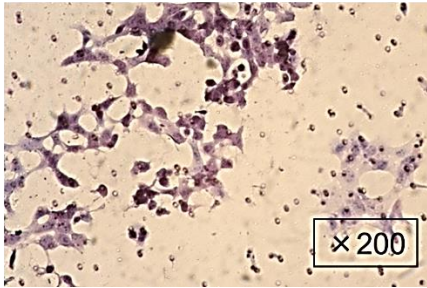
SAS-GFP 細胞(A)あるいは HSC3-GFP 細胞(B)を上層チャンバーに播種し, 48 時間後に下底のメンブレンを通過した細胞の占める面積の割合を算出した. SAS-GFP 細胞では, 対照群で 1.8%, Wnt5b 処理群で 14.6%であった. HSC3-GFP 細胞では, 対照群で 14.8%, Wnt5b 処理群で 26.8%であった.

A

control

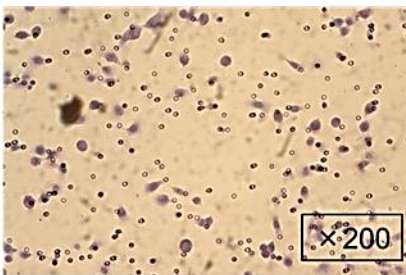


Wnt5b(+)



B

control



Wnt5b(+)

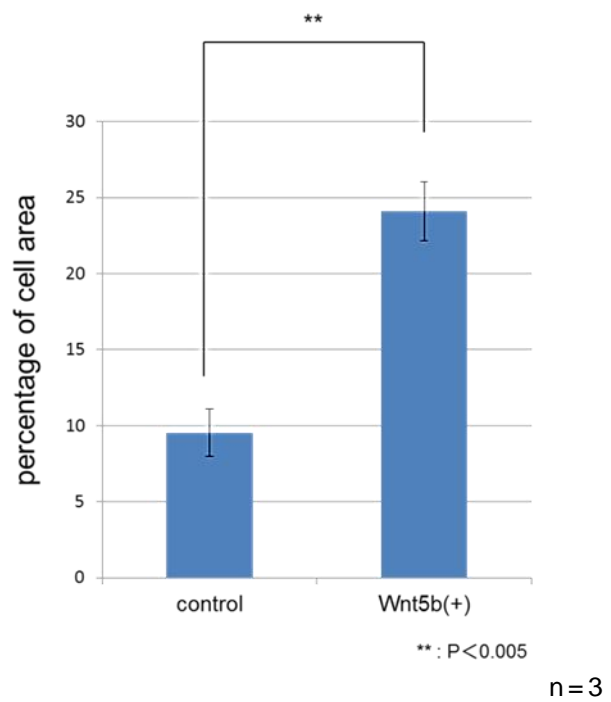
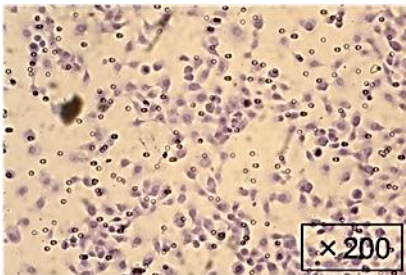




図 9 Wnt5b が細胞浸潤能に及ぼす影響

SAS-GFP 細胞(A)あるいは HSC3-GFP 細胞(B)を上層チャンバーに播種し、48 時間後に matrigel がコートされた下底のメンブレンを通過した細胞の占める面積の割合を算出した。SAS-GFP 細胞では、対照群で 2.3%、Wnt5b 処理群で 12.0%であった。HSC3-GFP 細胞では、対照群で 9.5%、Wnt5b 処理群で 24.1%であった。

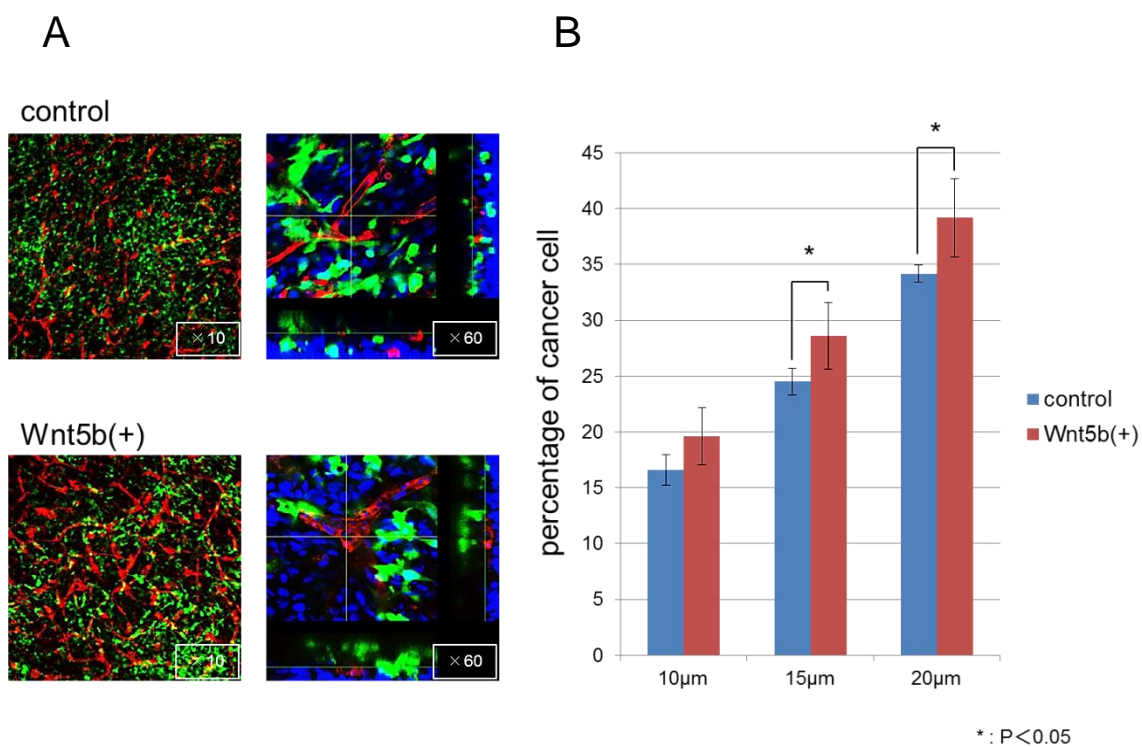


図 10 SAS-GFP 細胞における Wnt5b によるリンパ管様ネットワーク組織への浸潤能の評価

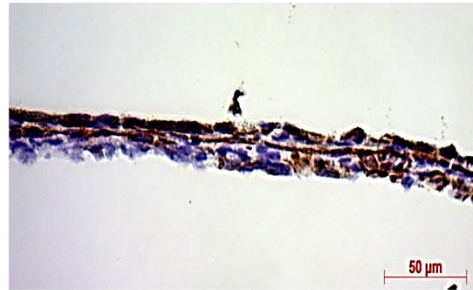
培養 5 日後の共焦点レーザー走査型顕微鏡像 (A) において、HDLEC により形成されたリンパ管様ネットワーク組織が赤色の網状の構造物として、SAS-GFP 細胞が緑色の構造物として検出された。リンパ管様ネットワークの壁から 10 µm, 15 µm, および 20 µm の距離に浸潤した SAS-GFP 細胞 (B) は、Wnt5b 処理群で、それぞれ対照群の 1.2 倍、1.2 倍および 1.1 倍であった。このうち 15 µm および 20 µm では有意差を認めた。

A

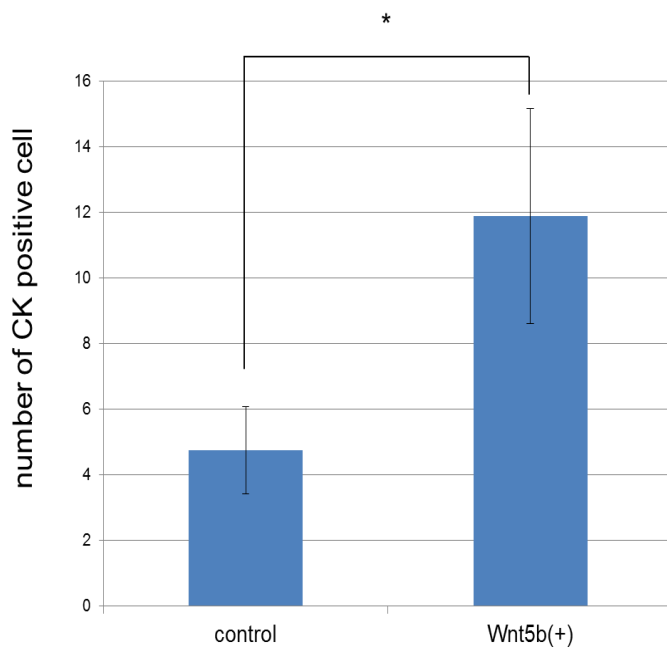
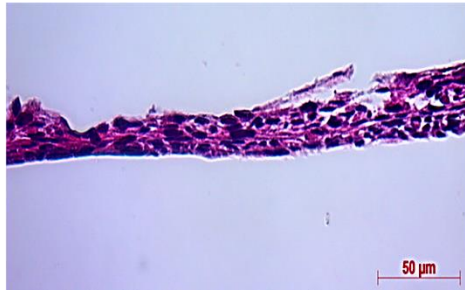
HE染色

免疫染色(CK AE1/AE3)

control



Wnt5b(+)



\* :  $P < 0.05$

n = 3

B

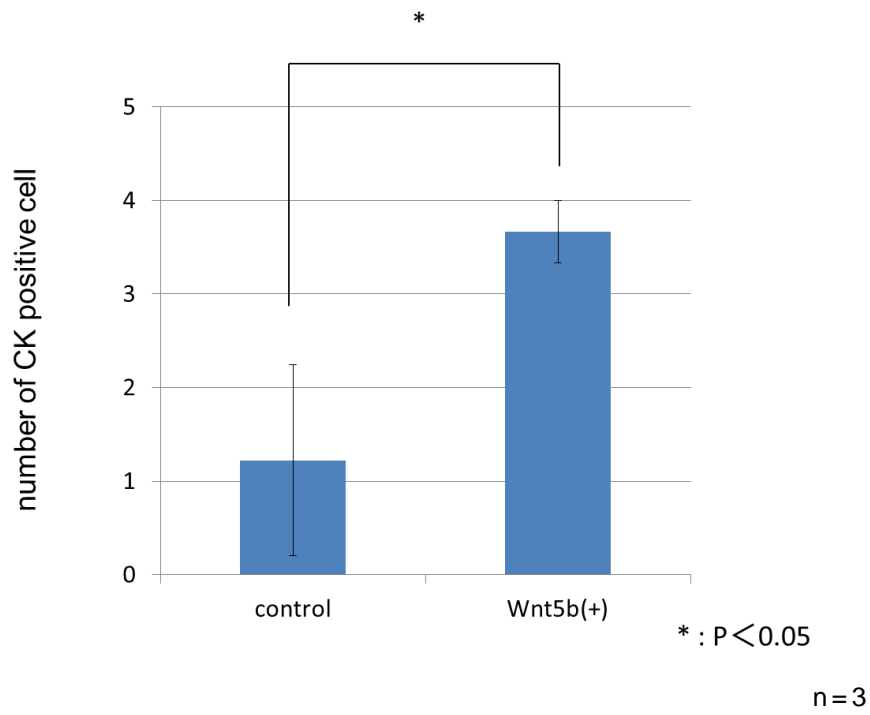
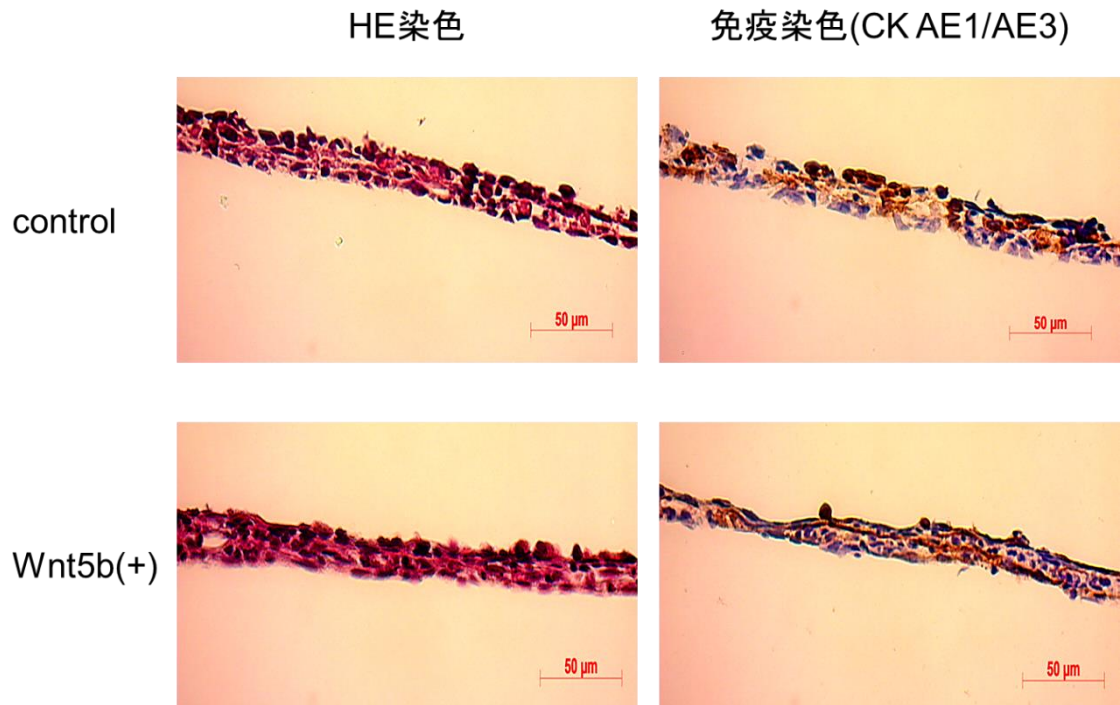
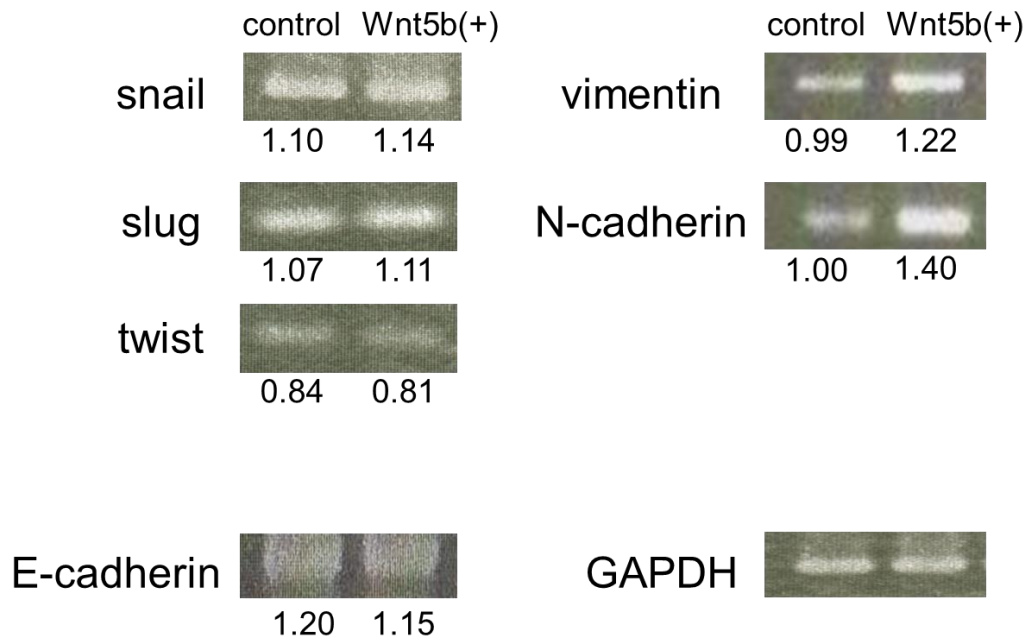


図 11 Wnt5b が三次元組織体モデルにおける浸潤能に及ぼす影響

SAS-GFP 細胞(A)あるいは HSC3-GFP 細胞(B)を播種した三次元組織体の組織標本を作製し，上皮系細胞に発現する CK を免疫組織化学染色した．組織標本を撮影し，三次元組織体下底に到達した CK 陽性細胞を算定することで，三次元組織体における浸潤能を評価した．三次元組織体標本の下底の長さは 1 視野あたり約 280 $\mu$ m であった．SAS-GFP 細胞では，撮影した視野内において下底に到達した CK 陽性細胞数の平均は Wnt5b 処理群で対照群の 2.5 倍となり，有意に増加した．HSC3-GFP 細胞では，撮影した視野内において下底に到達した CK 陽性細胞数の平均は Wnt5b 処理群で対照群の 3.0 倍となり，有意に増加した．

A



B

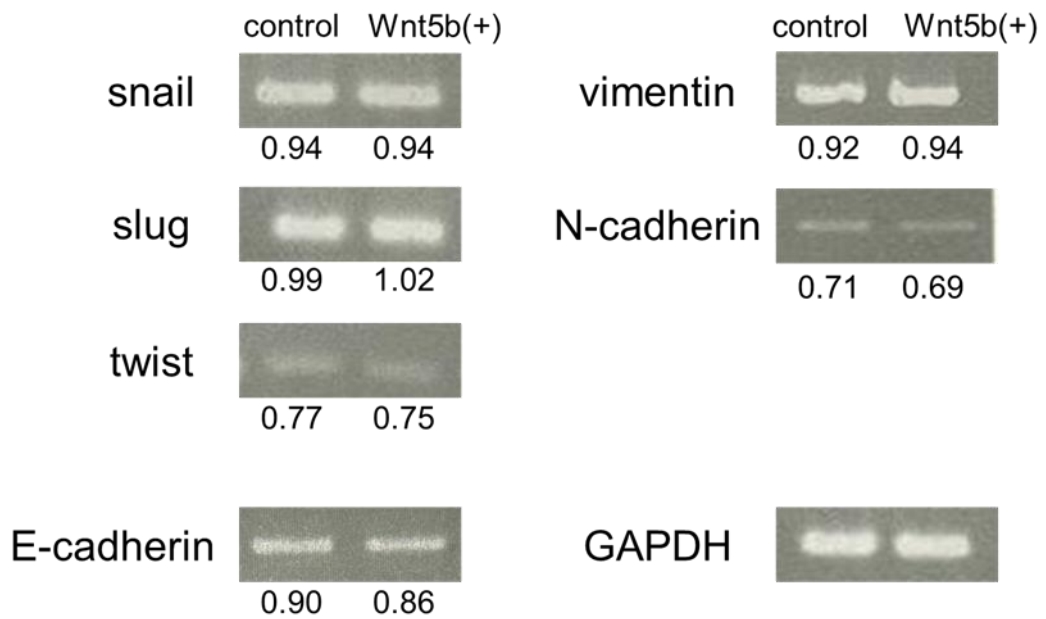
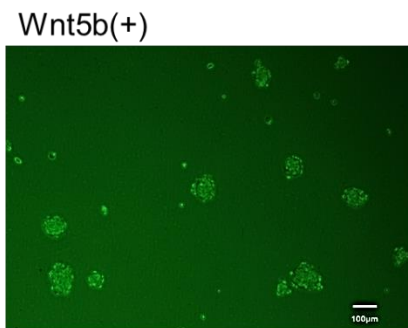
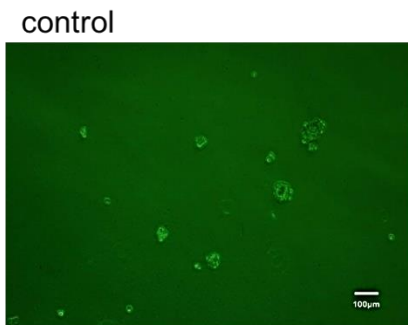


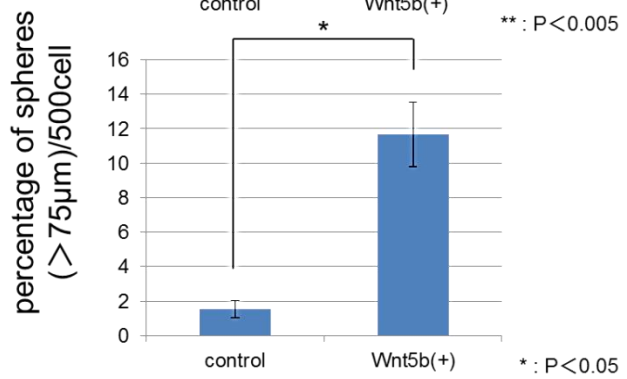
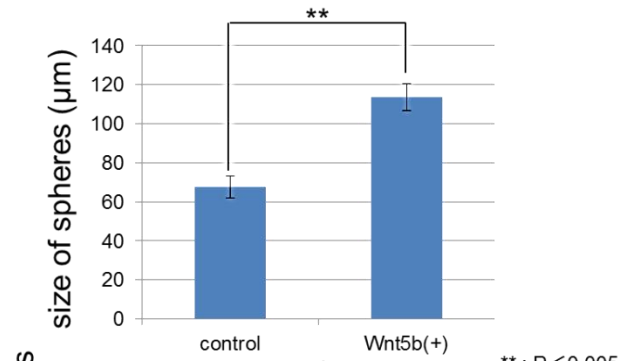
図 12 Wnt5b が EMT 関連遺伝子に及ぼす影響

SAS-GFP 細胞(A)および HSC3-GFP 細胞(B)に対して、半定量逆転写 PCR にて、EMT に関与するとされる転写因子の *slug*, *snail*, *twist*, 上皮細胞マーカーである *E-cadherin* および間葉細胞マーカーの *vimentin* と *N-cadherin* の変化を評価した。SAS-GFP 細胞では、Wnt5b 処理群で *vimentin* と *N-cadherin* の発現上昇を認めた。E-cadherin に著明な変化はみられなかった。HSC3-GFP 細胞では、E-cadherin の発現減少傾向を認めたが、*vimentin* や *N-cadherin* に大きな変化は認めなかった。

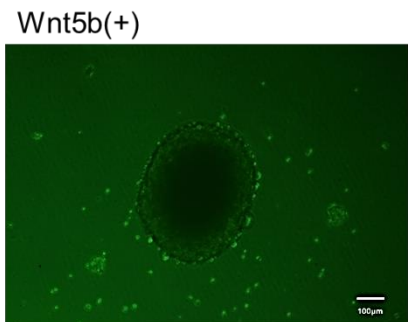
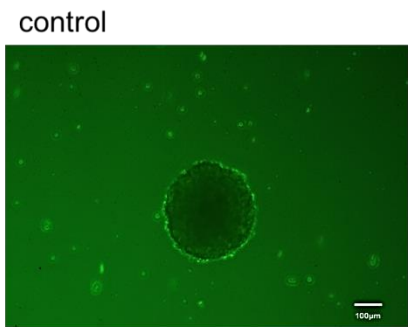
A



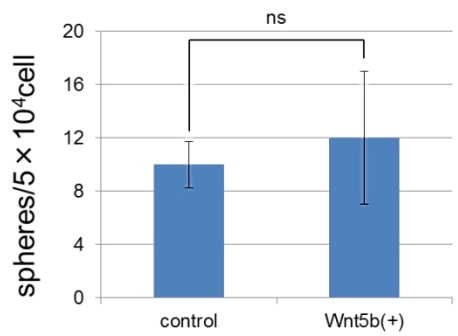
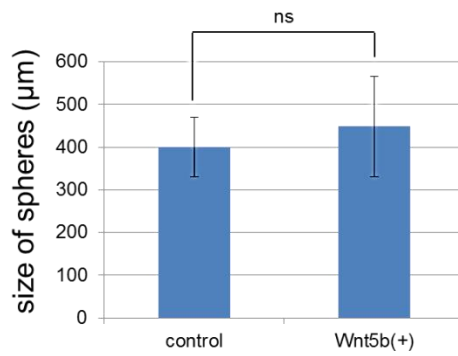
3 days after plating



n=3



10 days after plating

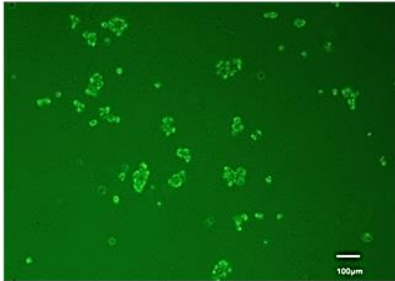


n=3

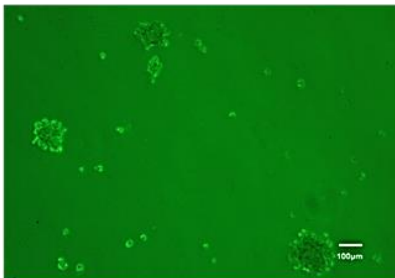


B

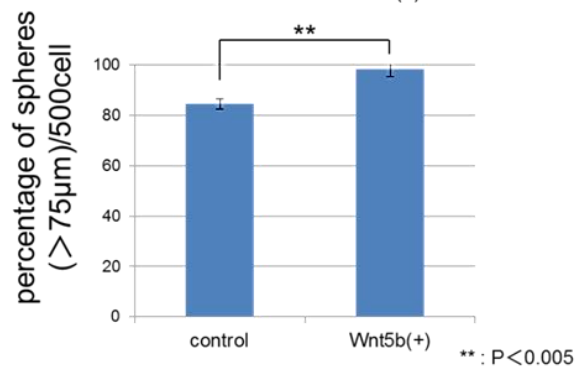
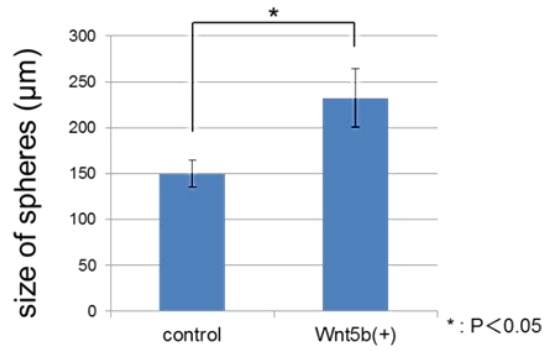
control



Wnt5b(+)

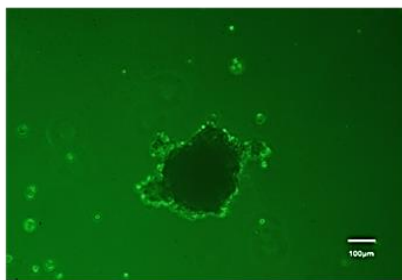


3 days after plating

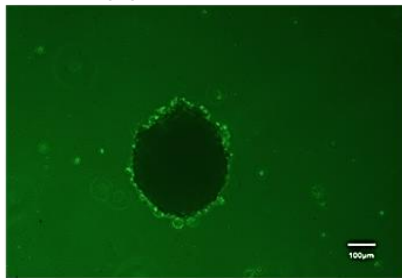


n=3

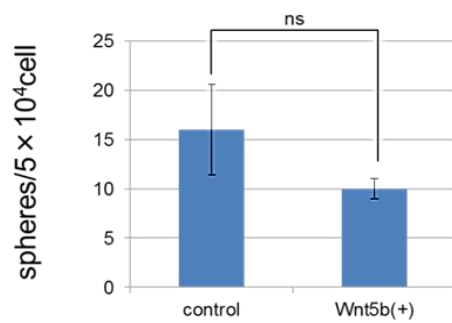
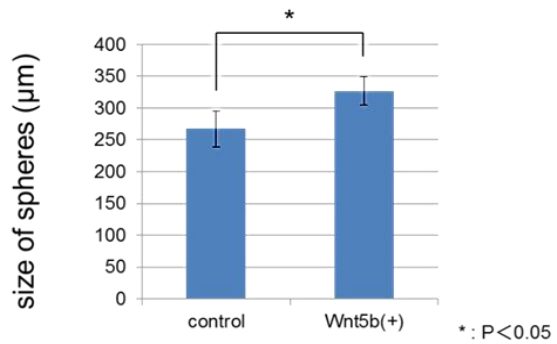
control



Wnt5b(+)



10 days after plating



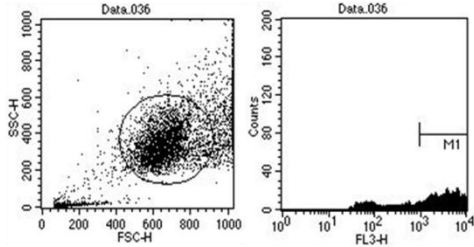
n=3

図 13 Wnt5b が sphere 形成に及ぼす影響

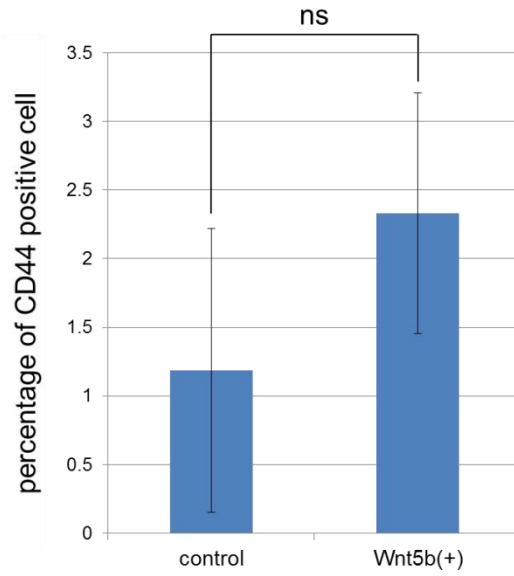
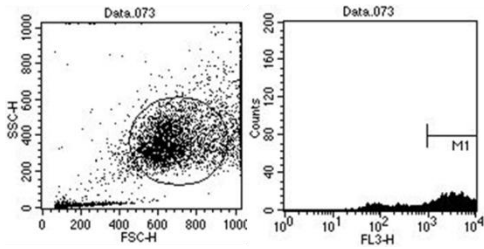
超低接着 6 well プレートに Wnt5b を 48 時間処理した SAS-GFP 細胞 (A) あるいは HSC3-GFP 細胞 (B) を癌幹細胞増殖培地で培養した。SAS-GFP 細胞において培養後 3 日目では、Wnt5b 処理群で形成された sphere の径は対照群の 1.7 倍であった。長径が 75  $\mu\text{m}$  以上の sphere の数の割合は、Wnt5b 処理群で対照群の 7.6 倍であった。培養後 10 日目には、Wnt5b 処理群と対照群とも sphere の径や数は増大した。形成された sphere の形態は維持されていた。HSC3-GFP 細胞では、培養後 3 日目に形成された Wnt5b 処理群の sphere の径は対照群の 1.6 倍であった。長径が 75  $\mu\text{m}$  以上の sphere の数の割合は、Wnt5b 処理群で対照群の 1.2 倍であった。10 日目においても Wnt5b 処理群の sphere の径は対照群の 1.2 倍であり、形成された sphere は Wnt5b 処理群で有意に増大していた。

A

control

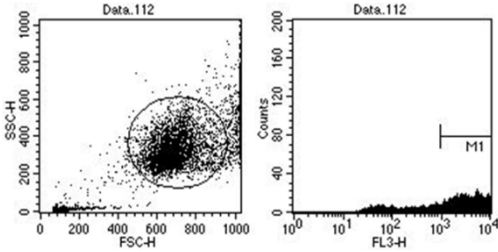


Wnt5b(+)

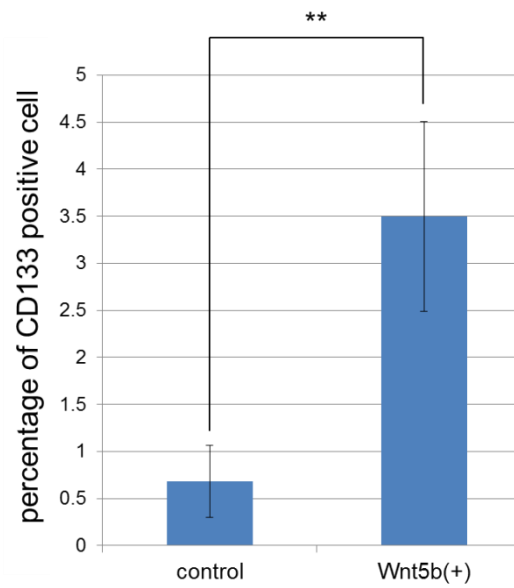
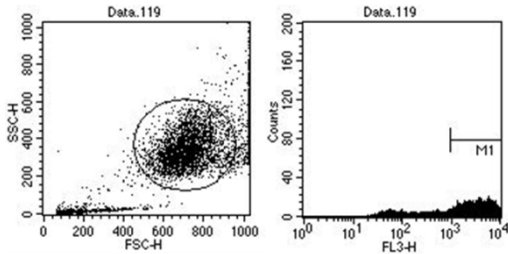


n=3

control



Wnt5b(+)

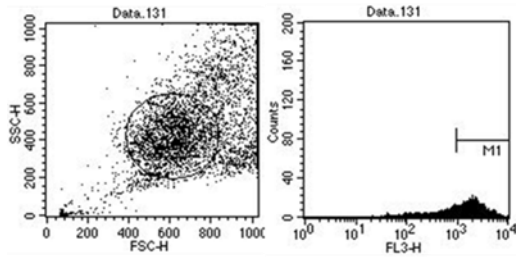


\*\* : P < 0.005

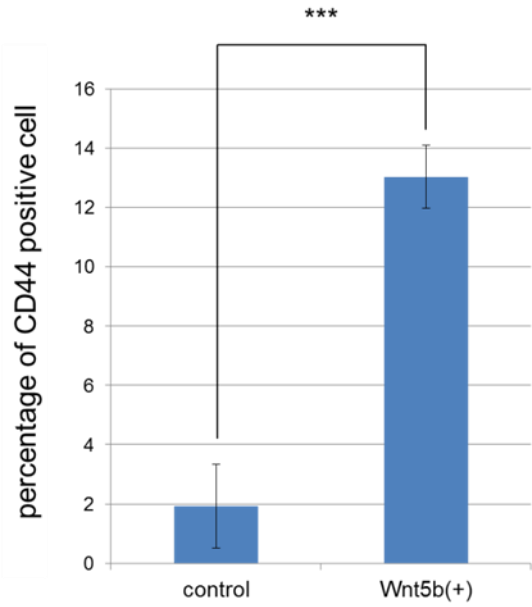
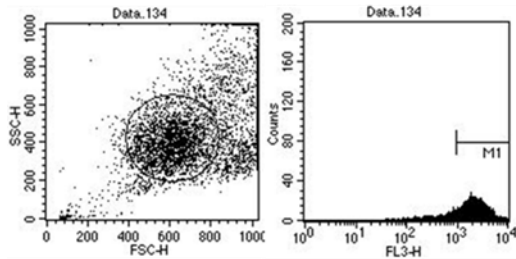
n=3

B

control



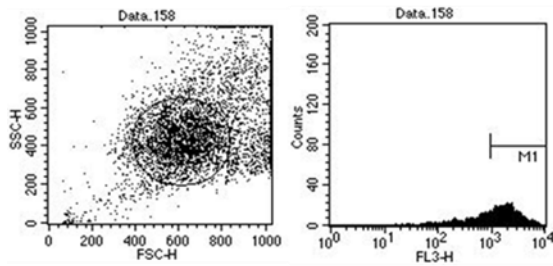
Wnt5b(+)



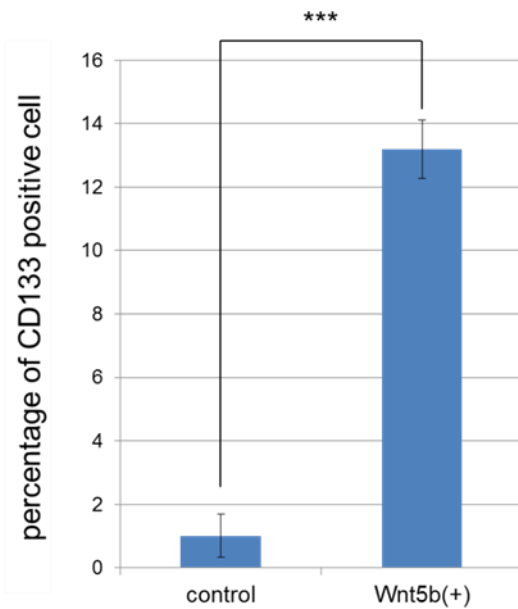
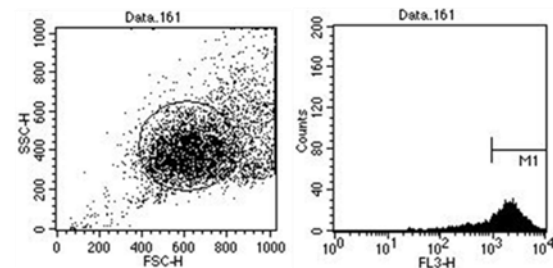
\*\*\* : P < 0.0005

n = 3

control



Wnt5b(+)



\*\*\* : P < 0.0005

n = 3

図 14 Wnt5b が幹細胞マーカーの CD44 および CD133 に及ぼす影響

Wnt5b で 48 時間処理した SAS-GFP 細胞(A)および HSC3-GFP 細胞(B)を, APC 標識抗ヒト CD44 抗体および抗ヒト CD133 抗体に反応させ, flow cytometer にて解析した. SAS-GFP 細胞では, CD44 陽性細胞数は対照群の 2.0 倍であったが有意差は認めなかった. CD133 陽性細胞は対照群の 5.1 倍で, Wnt5b 処理群で有意に増加していた. HSC3-GFP 細胞では, CD44 陽性細胞は対照群の 6.8 倍, CD133 陽性細胞は 13.1 倍で, いずれも有意に増加していた.