The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	間葉上皮転換を示す口腔扁平上皮癌細胞株（SAS-δ）の樹立と新規EMTマーカーの同定
Author(s)	藤林, えみ
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61643
rights	This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License.
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　（　藤林　えみ　）	
論文題名	間葉上皮転換を示す口腔扁平上皮癌細胞株(SAS-δ)の樹立と新規EMTマーカーの同定

論文内容の要旨

【緒言】

腫瘍悪性度の判定は治療方針を決定する上で重要である。悪性度の重要な要素である浸潤転移の解明が進む中、初期胚の発生学で提唱された細胞形質の転換機構である上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal transition：以下EMT）や間葉上皮転換（Mesenchymal-Epithelial transition：以下MET）という概念が癌研究の分野にも取り込まれ注目を集めている。このEMTやMETのメカニズムを明らかにすることは、初期治療のみならず、病巣の局所再発や頸部リンパ節転移および遠隔転移治療後の経過に多大なる影響を与える。今回、可逆的であると考えられているEMT、METを*in vitro*にて誘導する細胞系を確立し、EMTとMETの分子機構の可逆性について検討した。

【方法】

1) 口腔扁平上皮癌細胞株であるSASを*in vitro*においてTGF-β1刺激することにより細胞遊走を促進させ、遊走能が亢進した細胞を選択的に回収した。この操作を4回繰り返し、高い遊走能を有した細胞集団（Delta-SAS）を回収した後、METを誘導するためTGF-β1刺激を解除した培養液にて、さらに２回継代培養することで新たな細胞系（SAS-δ）を樹立した。
2) SAS-δとSASとの性質および分子細胞生物学的な比較を行った。まず、wound healing assayおよびEMTマーカーにおいて遊走性やEMTマーカーの変動を明らかにした。また遊走性について詳細に検討するため、Migration assayを施行し、同時にInvasion assayにて浸潤能を検討した。さらに、細胞増殖についてGrowth curveを作成して比較し、SAS-δの細胞増殖に異常を認めたため、細胞増殖の制御経路として近年注目を集めるHippo経路関連タンパク質をウェスタンブロッティングにて検討比較した。
3) SAS-δにおいてHippo 経路の中心的な制御因子であるセリン/スレオニンキナーゼLarge tumor suppressor1/2(以下LATS1/2)の挙動に異常が認められたため、LATS1/2によってリン酸化を受ける新たな基質を検索し、それに特異的な抗体を作製し、それをツールとして詳細な分子制御機構について検証考察を行った。

【結果】

1) SAS-δでは細胞増殖に明らかな差異を認め、EMTおよびMETを経た細胞は非可逆的な性質を獲得していた。まずHippo経路に関して検討を行ったところ、SASではLATS1が主に作用していた一方、SAS-δはLATS2が主に作用しており、SAS-δは接触阻害の変動とは無関係にLATS2をリン酸化していた。つまりSAS-δではLats2に異常が生じており、YAP/TAZへのリン酸化が正常に作用せず、Hippo経路に破綻を来している可能性が示唆された。次に、EMTおよびMETとHippo経路の関連を検討すると、LATS１/2の上流にあるMSTは、EMT誘導にてp-MST/MST比が増加しているにも関わらず、p-LATS2/LATS2比は低下しており、SAS-δはHippo経路におけるMST2-LATS2のリン酸化の移行に不調和が生じているということが明らかとなった。またヌードマウス舌腫瘍モデルの実験において、病理学的にもSAS-δが悪性度の高い細胞集団であることが示唆された。さらにSAS-δは幹細胞性を示唆する高いSphere形成能や放射線および化学療法抵抗性を得ていた。この結果より

EMTおよび癌幹細胞の特徴獲得という二つの制御機構にHippo経路が関連している可能性が示唆された。

2) 次にこのSAS-δがLATS2に異常を認めたことから、LATS1/2のリン酸化基質を検索し、SLUGがリン酸化されることを見出した。さらにこのリン酸化部位（SLUG-pT208）を特定し、それを認識する抗体を作製しEMTおよびMET時の動態を検討した。結果、Slugの増加に伴いリン酸化を受けたSLUG pT208も相対的に増加していたが、EMTの増加に伴いリン酸化率は低下することが明らかとなった。そこで、SLUGをノックダウンし浸潤能を比較すると、浸潤能は明らかに上昇（特にEMT_METを経たSAS-δにおいて顕著）した。この結果はLATSよるSLUG T208のリン酸化が上皮系の維持に作用する可能性を示唆した。

【考察】

EMT_METの経路は、細胞を上皮系から間葉系へ、続いて間葉系から上皮系へ細胞内でリプログラミングし、EMTマーカーや遊走能といった運動性に関しては可逆的な機構として維持される。しかしながら細胞増殖に関してはLATS2異常によりHippo経路に破綻を来し、足場非依存的な増殖能を獲得していたという点で不可逆な機構を新たに獲得する、悪性化を伴う変異を今回見出した。EMTとMETの連続的な転換は、ループ状の単純な逆戻り現象を繰り返すわけではなく、螺旋的な段階を経て細胞がより悪性度の高いステージに至る現象であるということが示唆され、この悪性度の上がった上皮系細胞をActivated Epithelial cell (aE)と命名した。

さらに、SLUGのLATS1/2によるリン酸化は、間葉系の状態から上皮系の状態へ戻しそれを維持するという過程に働く可能性が示唆された。またこのSLUG pT208抗体は、EMTによるSLUG高発現にも相関して高値を示すことから、EMTを生じている細胞、かつMETにより再度上皮系の性質を獲得しながらも一つ悪性度のステージを上がった高度な悪性癌細胞（aE細胞）も認識可能な抗体であることが示唆された。実際、患者組織にて免疫組織化学染色を行うと、EMTを生じている可能性が高い細胞基底膜から浸潤した部位で強い染色が見られた検体や、明らかに上皮系細胞で強い染色を生じている検体など様々な染色結果が得られた。今後更なる症例数の増加や臨床経過との相関性の有無等、検討を重ねる必要はあるが、まさにEMT_METを認識することが可能となれば、治療方針の決定の際の大きな足掛かりの一つになり得る可能性が示唆された。

【結語】

本研究にて、EMTおよびMETの変換は浸潤や転移を制御する可逆的な機構のみならず、細胞の足場非依存的な増殖能の獲得や、放射線化学療法抵抗性を獲得するという悪性化変異を進める一つの過程である可能性を示唆した。またその悪性化変異した細胞（Advanced Epithelial cell）を認識する抗体として、SLUG　pT208抗体が臨床応用できる可能性を示した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　藤林　えみ　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	古郷　幹彦
	副 査	教授	豊澤　悟
	副 査	准教授	波多　賢二
	副 査	講師	岩井　聡一

論文審査の結果の要旨

本研究はヒト舌扁平上皮癌細胞株を用いて上皮間葉転換（EMT）と間葉上皮転換（MET）について検討を行ったものである。その結果 EMT および MET は浸潤や転移を制御する可逆的な機構に関与するだけでなく、細胞の足場非依存的な増殖能や放射線化学療法抵抗性の獲得という悪性化の一つの過程であることを明らかにした。またそれによって発現した細胞は SLUG pT208 抗体によって認識され臨床応用の可能性を示唆した。

これらの結果は口腔がん研究に新たな知見を与えるものであり、博士（歯学）に値する。