



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

学位論文

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

藤林えみ

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

顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）

目次

目次.....	1
緒言.....	2
材料と方法.....	6
結果.....	14
考察.....	21
結語.....	26
謝辞.....	27
参考文献.....	28
図の解説.....	30
図.....	38

緒言

1. 口腔癌における現状

口腔癌は本邦において全癌の約 1%, 全頭頸部癌の約 40%を占めている。そのうち 90%が口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma : 以下 OSCC) であると言われており、比較的多い悪性腫瘍である¹⁾²⁾³⁾。口腔扁平上皮癌のうち舌を原発とするものは 60%を占め、他国よりも舌原発が多い⁴⁾。舌口腔扁平上皮癌は視診にて発見可能なため、5 年生存率は比較的高いが、浸潤や局所再発、頸部リンパ節転移、遠隔転移により予後不良となる症例も散在し、予後予測は困難を極める。この浸潤や転移のメカニズムを明らかにすることは、治療方針の決定だけでなく、予後予測にも大きな影響を与える。舌癌において、予後に影響する重要な因子として、原発巣の制御が挙げられており、原発巣の再発の可能性を治療前に予測することが重要であると考えられ、臨床型分類や癌周囲の上皮性異型性の有無等との関連が検証されている段階である。現在最も有効かつ一般的な予後判定として、病理組織学的な悪性度評価が挙げられる。従来の WHO の Grade 分類⁵⁾や、Jakobsson 分類⁶⁾または Anneroth 分類⁷⁾、それに波及する YK 分類⁸⁾といった評価法が用いられているが、判定が煩雑であるが故に広く普及するに至っておらず、悪性度の判定は施設での病理診断医の診断に委ねられている。つまり、初期治療の重要性が示唆されている中、各施設間で共通して判定可能な予後診断法が確立されていないのが現状である。

2. 癌の浸潤・転移における EMT および MET の意義

腫瘍の転移や浸潤に上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : 以下 EMT) が深く関わっていることが知られている⁹⁾。癌細胞が浸潤・転移するには、原発巣からの離脱と間質への浸潤、脈管侵襲、体内循環、転移先の血管への接着、血管外への浸潤、転移先臓器への定着と増殖の過程が必要となる。EMT は元来、原腸や神経系の発生においての中胚葉陥入といった初期発生の表現型転換であり、創傷治癒の再上皮形成過程や、器官形成期の組織繊維芽細胞発生の過程で働く。つまり EMT とは上皮細胞が細胞極性を失い間葉細胞へ転換するプロセスのことである。上皮は細胞接着分子によって互いに結合し合い、表層と基底膜の極性を有するが、EMT により接着結合を担う上皮系マーカーである E-cadherin、Occludin などの発現抑制、N-cadherin、Vimentin などの間葉系マーカーの発現亢進を生じ、細胞外基質分解酵素といったタンパク分解酵素の分泌を増加し、細胞外基質を分解し、運動能の向上を獲得する。癌細胞は細胞極性やアクチン骨格極性を失い、間葉細胞へ変化する EMT によって、移動能・浸潤能を獲得・増強し、播種や転移が可能となる。

また近年、転移臓器においては、間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition : 以下 MET) により、間葉系に転換されていた癌細胞が上皮系癌細胞となり、細胞増殖を伴った転移性コロニ

一形成が促され、転移先臓器への浸潤・定着が可能になることが示唆されている。EMT の分子機構に関しては次項に述べるように多方面から研究が進められている反面、MET に関しては不明な点が多く、詳細な EMT と MET の関連も明らかになっていない。

3. EMT を制御する因子

EMT の過程は、K-Ras 突然変異や Her2 過剰発現といった発癌刺激や、細胞外基質、線維芽細胞、筋線維芽細胞、免疫細胞、Wnt 因子・TGF- β ・Hedgehog 因子・上皮増殖因子・TNF- α や IL-6 といったサイトカインなどの微小環境からの外刺激によって惹起されうる。これらの増殖因子や炎症性サイトカインは、自己分泌や傍分泌によってもたらされる。また低酸素環境は癌細胞の EMT を誘導するという報告もある。これらの微小環境に TGF- β 、Wnt、Notch、Hedgehog シグナル経路が関与し、腫瘍増殖の過程において EMT が促進される¹⁰⁾。これらのシグナル経路は共通のエンドポイントとして接着結合タンパクである E-cadherin の発現調整というターゲットを有している。転写因子 twist、Snail、Slug、ZEB1、FOXC2 は E-cadherin のプロモーター領域である E-box 領域に結合し、E-cadherin の転写を抑制する¹¹⁾。実際、前立腺癌では Snail の発現と癌進行の関連性が報告され、非小細胞肺癌では Snail、ZEB1、twist が EMT 誘導に重要であるという報告もある¹²⁾。

4. Hippo pathway とは

1990 年代にショウジョウバエで発見された Hippo pathway¹³⁾は、組織や臓器のサイズを決定するリン酸化カスケードとして発生・分化の分野で研究が進められてきた。ショウジョウバエで発見された Hippo pathway は、Hippo→Wart→Yorkie を中心経路として持ち、Hippo がセリン/スレオニンキナーゼをコードし、Wart をリン酸化・活性化してキナーゼ・カスケードを形成する。また、このカスケードで Warts が Yorkie をリン酸化し、そのリン酸化部位を認識し結合した 14-3-3 タンパク質が Yorkie の細胞核への移行を抑制する。通常 Yorkie は核内へ移行して転写活性化因子として働き、細胞増殖を亢進する遺伝子や、細胞死抑制に関連する遺伝子の転写を活性化しているため、Yorkie の核内移行の抑制は、細胞周期阻止、細胞死誘導に働く。この Hippo pathway の中心経路は Mst→Lats→Yap/Taz として哺乳類でも保存されており、contact inhibition を担うシグナル伝達系として働き臓器サイズを保つが、Hippo pathway に機能不全が起こると、細胞増殖異常や細胞死への抵抗性を示すと考えられている。

この Hippo pathway の中心的な制御因子として、セリン/スレオニンキナーゼである Lats1/2 (Large tumor suppressor1/2) が挙げられる。Lats1/2 は C 末端側にセリン/スレオニンキナー

ゼ領域を有し、あらゆる生物種で高度に保存された構造を持つが、N末端側はユニークな構造を持つ。哺乳類の場合、細胞接着を感知して活性化した Mst1/2 キナーゼは、Lats1/2 の C 末端領域をリン酸化し、活性化した Lats1/2 が Yap/Taz の Ser127/Ser89 をリン酸化し核移行を阻害する。また、別のリン酸化サイトである Ser381 がリン酸化されると、ユビキチン依存性のタンパク分解が生じる。つまり、これら 2 つの機構により Yap の核移行が抑制され、細胞周期阻止や細胞死誘導を招く。

5. 癌の浸潤・転移における Lats1/2 の役割

Hippo pathway の機能不全は癌細胞の特徴であるアポトーシスや contact inhibition からの逃避についても説明することが出来るため、Lats1/2 は癌抑制遺伝子としても大変重要である。実際、Lats1/2 ノックアウト細胞は、中心体の過剰複製や成熟異常、染色体不整列、細胞質分裂失敗による多核化細胞の出現などを認め、癌細胞で観察される染色体不安定性の増大を認める。St.John らは Lats1 ノックアウトマウスでは発育遅延を示し、致死性ではないものの、軟部組織肉腫 (soft tissue sarcoma) や卵巣腫瘍を形成すると報告した¹⁴⁾。また当研究共同研究者である Yabuta らは Lats2 ノックアウトマウスで脳や脊髄における神経細胞の減少を認め、致死性であったことから、Lats2 が胚発生分化に必須な遺伝子であると報告している¹⁵⁾。

一方で、Hippo pathway を介さない Lats キナーゼの働きも報告されている。Oren らは癌抑制遺伝子 p53 の制御に関して Lats2 を介した細胞周期チェックポイントを制御する Lats2-Mdm2-p53 経路と Late2-ASPP1-p53 経路を示した。Lats2-Mdm2-p53 経路は M 期ストレス応答として細胞周期を停止させ¹⁶⁾、Lats2-ASPP1-p53 経路は癌化ストレスに応答して細胞のアポトーシスを誘導する¹⁷⁾。また、Yabuta らは DNA 損傷応答機能に Lats2 が関連するという Chk1-Lats2-14-3-3 経路や、Aurora-A-Lats2 経路が Aurora-B の制御を介して正確な染色体分配と細胞質分裂を行うというシグナル経路に関しても報告している。つまり、Lats1/2 は Hippo pathway だけでなく、様々なシグナルに関与し癌化に影響していることは明らかである。

Lats1/2 によりリン酸化を受ける様々な転写因子が、Hippo pathway における Yap/Taz 以外にも存在することが近年明らかになってきている。Zhang らは Lats2 は Snail をリン酸化することで EMT を促進するという報告している¹⁸⁾が、Hippo pathway と EMT および MET との関連については未だ説明が進んでいない。

6. 本研究の概論

EMT と MET に関しては現在研究が進められてきている段階ではあるが、以前から異なる経路をたどると指摘されてきた¹⁹⁾。今回、*in vitro*にて EMT を経て MET を引き起こした細胞株 (SAS-6) を樹立しその際の分子生物学的変化を検証することで、EMT と MET の可逆性について検討を行った。すると contact inhibition への回避に関する Hippo pathway の経路に大きな変化を生じることが明らかとなったため、Hippo pathway と EMT および MET との関連について論証した。また、EMT および MET の過程における新たな細胞性質獲得に関して、新たなメカニズムとして提唱した。

また、Hippo pathway の中心的なキナーゼである LATS1/2 によってリン酸化を受ける可能性がある SLUG に関して検証し、LATS1/2 によって SLUG がリン酸化を受けることを明らかにした。このリン酸化部位に対する抗体を作成し臨床応用への可能性を提言した。

材料と方法

1. 細胞株と培養

実験には、ヒト扁平上皮癌から樹立された細胞株である SAS を理研バイオリソースセンターから購入し使用した。SAS は 10%FBS (fetal bovine serum) 〈Hyclone〉 を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 〈Sigma-Aldrich〉 に抗生物質 Penicillin-streptomycin mixed solution (Stabilized) 〈Nakarai tesque〉 を 1% 添加し培養を行った。いずれの細胞も 37°C、5%CO₂ 存在下において培養し、0.02%-EDTA Solution 〈Nakarai tesque〉、0.25%-Trypsin Solution 〈Nakarai tesque〉 で処理し、継代した。

2. 実験試薬と抗体

2µg Recombinant TGF-β1, Human は PEPROTECH より購入し使用した。TGF-β1 は 10ng/ml の濃度で培地に添加した。また使用した抗体は表 (表 1.) にまとめる。

3. 細胞への遺伝子の導入

リポフェクション法により遺伝子を導入した。細胞はトランスフェクションする時点で細胞が 70% 程度になるように径 60 mm のディッシュに前日に播種し、1 晩培養を行った。2µg の plasmid DNA、250µg Opti-MEMI 〈Gibco〉、8µl PLUS Reagent 〈Invitrogen〉 を混合し、室温で 15 分間静置した。その間、12µg Lipofectamine Reagent 〈Invitrogen〉、250µg Opti-MEMI を混合し、この 2 つを混和し、さらに 15 分間室温で静置した。細胞は PBS(-) にて洗浄後、Opti-MEMI にて洗浄、2.5ml の Opti-MEMI を加え、その上で混合溶液を加えた。3 時間培養後、2.5ml の 2 倍量 FBS を含む培地を加え、21 時間培養した。リポフェクション後 24 時間経過後に、10%FBS を含む培地に交換し、さらに 24 時間培養後に解析を行った。

4. 細胞の目的遺伝子のノックダウン

細胞はトランスフェクションする時点で細胞が 50% 程度になるように径 60 mm のディッシュに前日に播種し、1 晩培養を行った。10µl Lipofectamine 2000 〈Invitrogen〉、500µg Opti-MEMI を混合し、室温で 5~30 分間静置した。その間、2µM siRNA、500µg Opti-MEMI を混合し、この 2 つを混和し、さらに 20 分間室温で静置した。細胞は PBS(-) にて洗浄後、Opti-MEMI にて洗浄、3ml の Opti-MEMI を加え、その上で混合溶液を加えた。6 時間培養後培地交換を行い、さらに 18 時間培養した。リポフェクション後 24 時間経過後に、10%FBS を含む培地に交換し、24 時間培養後に解析を行った。siRNA の効果はウェスタンブロッティングを行い、

バンドの消失にて確認をおこなった。

5. 細胞タンパク質の抽出とウェスタンブロット解析

細胞は種々の条件で培養し、PBS(-)にて洗浄後、PBS (-) 1ml 添加の上でスクレーパーを用いて回収し、4℃、8000rpm で2分間遠心分離した後、PBS(-)を除去し、細胞ペレットを作成した。得られたペレットを Lysis buffer : TNE250 (10mM Tris(pH8.0)、1mM EDTA、250mM NaCl、0.25%NP40、2mM Benzamidine) にプロテアーゼインヒビターおよびフォスファターゼインヒビター (1mM DTT、1μg/ml Aprotinin、1μg/ml Pepstatin A、10μg/ml Leupeptin、100μg/ml PMSF、1mM Na₃VO₄、1mM NaF、10mM β-glycerophosphate、100nM Okadaic acid) を加えた溶液にて溶解させ、4℃で30分間回転撹拌した後、4℃、15000rpm にて30分遠心分離し、上清を回収した。最終比率が20%になるようにグリセロールと混和し、再び4℃で30分間回転撹拌し、細胞抽出液とした。タンパク濃度は Bradford 法により定量を行い決定した。細胞抽出液は 4×DB(denaturation buffer;0.2M Tris-HCl(pH6.8)、8% SDS、0.2%Bromophenol blue、20%Glycerol、10%2-mercaptoethanol)を加え、7分間煮沸した。

上記のプロトコールで得られたサンプルを8%~15%のアクリルアミドゲルにアプライし、40mA で100分間電気泳動を行った。その後、分離したタンパクを PVDF メンブレン; Immobilon-P (Millipore) にセミドライ式ブロッティング装置を用いて 1.5mA/cm² で95分間転写した。その後、TBS-T (20mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.05%Tween20) で調整した5%もしくは0.5%スキムミルクにて室温で1時間ブロッキングを行い、1次抗体をブロッキング液で希釈し室温で3時間、または4℃で over night で反応させた。洗浄は TBST を用いて7分間×3回行った。2次抗体は HRP-anti-rabbit IgG または HRP-anti-mouse IgG をブロッキング液で希釈し、室温で90分間反応させた。発光検出には Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer) を用い、X線フィルムにて撮影を行った。Cleaved Caspase-3 抗体使用の際は、5%BSA(Bovine Serum Albumin) (MILLIPORE) にてブロッキングおよび抗体希釈を行い、発光検出には Western Lightning ECL Pro (PerkinElmer) を用いた。

6. Wound healing assay

細胞を播種培養後、コンフルエントな状態で実験に使用した。PBS(-)にて細胞を洗浄後、ブルーピペットチップの先端を細胞層に対して直角に圧接し、一定の力で引っ掻き、一定の幅の wound を形成した。その後、十分に PBS(-)にて洗浄し、浮遊細胞を可及的に除去した。細胞が欠失した wound 方向へ細胞が遊走する過程を位相差顕微鏡で経時的に観察し、wound の幅

に対する修復距離を計測して修復率を求めた。

7. Growth curve

細胞 0.5×10^5 個を 6well に播種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 存在下において培養。16 時間経過後に細胞が接着したことを確認し、day 0 として細胞を Countess 自動セルカウンター

〈Invitrogen〉を用いてトリパンブルー色素排除試験を行い計測し、各 well に存在する細胞数を記録した。その後、24 時間毎に同様に細胞をカウントし、細胞の増加率を計測した。すべての群は 3 日毎に培養液を交換し、TGF- β 1 投与群に関しては、培養液交換と同時に薬剤添加を行った。

8. 蛍光免疫染色

6well plate 内でカバーガラス上に細胞を播種培養し、接着細胞を 2ml の PBS(-) で洗浄し、2ml 4% formaldehyde (FA) in PBS(-)、0.1% Triton X-100 in PBS(-)、0.05% Tween 20 in PBS(-) の順で各工程を室温で 10 分間ずつインキュベートし、細胞固定を行った。

固定した細胞を PBS(-) で洗浄した後、2ml のブロッキング液 (TEST + 5% FBS) にて室温で 1 時間インキュベートした。1 次抗体はブロッキング液で希釈し、室温で 3 時間反応させた。洗浄は TEST を用いて 5 分間 $\times 4$ 回行った。2 次抗体は Alexa Fluor 488 の anti-rabbit IgG を用い、室温で 2 時間反応させた。その後、TBST にて 5 分間 $\times 1$ 回洗浄した後、Hoechst 溶液を 5 分間反応させた。細胞骨格の観察には、TRITC-Phalloidin 〈Sigma-Aldrich〉を用い、2 次抗体と同時に反応させた。TBST にて再度 5 分間 $\times 3$ 回洗浄し、10 μl の Slow Fade A にて封入した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

また、細胞の重なりを検討するため、共焦点レーザー顕微鏡での観察時に Z 軸を設け、一定の間隔にて撮影を行った。3 次元構築を行った後に、2 次元化し、Hoechst 33258 にて染色された核での明暗を imageJ にて数値化した。

9. Invasion assay および migration assay

Invasion assay は、2 層構造の transwell chamber (Corning BioCoat マトリゲルインベージョンチャンバー) 〈Corning〉を用いた。マトリゲルをコートした $8\mu\text{m}$ の小孔を有するメンブレンが張られた上層チャンバーに血清を含まない DMEM にて細胞を懸濁させ播種し、下層チャンバーには 10% FBS 含有 DMEM を加えた。細胞は 5.0×10^5 個/ml とし、2ml ずつ播種し、assay 開始から 72 時間 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 存在下において培養後、上層チャンバーに残存している細胞を

綿棒で完全に除去した後、Diff-Quik にて固定・染色を行った。その後、メンブレンを外してスライドガラス上で封入し、顕微鏡〈Leica〉下にてメンブレンを通過した細胞を観察した。メンブレン上の細胞は 10 点を撮影し、同一範囲視野内での浸潤・遊走細胞数をカウントした。

Migration assay は、2 層構造の transwell chamber (Corning セルカルチャーインサート)を用いた。以後は Invasion assay と同様の条件・方法で assay を行った。メンブレン上の細胞は無作為に 5 点を撮影し、同一範囲視野内での浸潤・遊走細胞数をカウントした。

10. Contact inhibition の影響の確認

SAS および SAS-8 を 2.0×10^6 個ずつ径 60mm シャーレに播種し、37°C、5%CO₂ 存在下において培養を行った。播種翌日を day 0 とし、day 2,4,6,8 に細胞を回収しサンプルとした。

11. Sphere formation assay

細胞の 3 次元培養のため、低接着表面加工された 96 穴プレート (EZ-BindShut II Cell Culture Products, Low-adhesion Surface) 〈IWAKI〉を使用した。Sphere formation Medium として、DMEM および Ham's F-12 (Kaighn's) Medium 〈Sigma-Aldrich〉を 1:1 で混合したものに、1% Penicillin-streptomycin mixed solution (Stabilized)、2% B27(x50) Supplement 〈Gibco〉、0.002% Epidermal Growth Factor human, recombinant expressed in *E.coli* (最終濃度 20ng/ml) 〈Sigma-Aldrich〉、0.08% Fibroblast Growth Factor-Basic human, recombinant expressed in *E.coli* (最終濃度 20ng/ml) 〈Sigma-Aldrich〉を添加し使用した。SAS および SAS-8 を Countess 自動セルカウンター 〈Invitrogen〉を用いて計測し、各 well に 10 個/200μL になるよう希釈し播種した。37°C、5%CO₂ 存在下において培養した。翌日各 well に播種された全細胞をカウントし assay 母数とし、4 日後、7 日後に Sphere 形成率を確認した。4 日後は細胞数 10 以上で Sphere と定義、7 日後は球形の細胞塊を呈し、各細胞形態が不明瞭になり、細胞外マトリックスに覆われているものを Sphere と定義した。

12. γ-ray treatment assay および Drug treatment assay

γ-ray treatment assay は細胞に γ 線を 10 Gy 照射し、その後 12 時間後および 24 時間毎に 96 時間まで培養の後、細胞を回収しサンプルとした。

Drug treatment assay は細胞に CDDP 5μM、5FU 0.5μL/mL になるよう希釈し投与の後、24 時間毎に細胞を回収しサンプルとした。Medium の交換は 48 時間毎に行い、その際薬剤投与も再度行った。

13. マウス舌腫瘍モデルの作成と生存曲線、体重変化、病理検体の作成

SAS、SAS-6 細胞 2.0×10^6 個を、それぞれ 50 μ l の DMEM (Serum free) に希釈し、5 週齢 BALB/c-*nu/nu* 雌マウス (ヌードマウス) (日本エスエルシー株式会社) の左側舌縁より 26G 針を用いて舌内に移植し、舌腫瘍を作成した。腫瘍移植日を day 0 とし、以下の観察を行った。

生存率に関しては、各 8 匹を用いて検定を行った。また朝 11 時に体重を測定し、体重の変化率を評価した。病理検体に関しては、day8 に舌腫瘍を組織バサミで切除した。また同時に両側リンパ節も切除した。検体は 10%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業) にて 1 日間固定後、一般財団法人阪大微生物病研究会へ提出し、切片作成を依頼した。薄切は 3 μ m で行った。

14. HE 染色

マウス検体は一般財団法人阪大微生物病研究会において、自動染色装置テッシュ・テック・プラズマ (サクラファインテックジャパン株式会社) を用いて HE 染色を行った。使用薬剤はキシレン (和光純薬)、病理用アルコール (武藤化学工業)、ヘマトキシリン (サクラファインテックジャパン株式会社)、エオジン Y (WALDECK GmbH and Co. KG) を用いた。ヘマトキシリンおよびエオジンはそれぞれ 5 分間浸漬し染色を行った。

15. GST 融合タンパクの精製

GST-Slug WT、GST-Slug all-A、GST-Slug T183A、GST-Slug T209A をそれぞれ大腸菌 BL21RIL 株に形質転換させた。前培養として、アンピシリン (最終濃度 50 μ g/mL) を含む LB 液体培地に植菌し、37°C で一晩振とう培養を行った。翌日本培養として、アンピシリンを含む LB 液体培地 200mL に植菌し、37°C で OD 値が 0.5~0.8 になるまで振とう培養を行った。OD 値が 0.5~0.8 の範囲内になったところで、IPTG (最終濃度 0.1mM) を加え、20°C で一晩振とう培養を行い、GST 融合タンパクの発現誘導を行った。翌日、回収した大腸菌は PBS(-) に 1mM NaF、1mM Na₃VO₄、1mM Benzamidine、100 μ g/mL PMSF、1 μ g/mL Aprotinin、1 μ g/mL Leupeptin、1 μ g/mL PepstatinA、1% TritonX-100 を加えたもので懸濁し、超音波処理により菌体を破碎させた。遠心後上清に 50% グルタチオンセファロースを加え、4°C で一晩ローテーションを行った。セファロースを回収後、還元グルタチオンで GST 融合タンパク質を解離させ、溶出を行った。次にこれらの溶出した GST 融合タンパク質にグリセロール (最終濃度 50%) を加え、4 \times sample buffer を加え、7 分間ボイルしサンプルを精製した。電気泳動後、ゲルを CBB に浸透させ 15 分間染色の後、脱色液をゲルに 6 時間浸透させ脱色を行い、GST 融合タンパク質が精製できているか確認した。

16. *in vitro* キナーゼアッセイ

GST 融合 MmSlug WT、MmSlug all-A、MmSlug T183A、MmSlug T209A を基質として、GST 融合 Lats1/2 をキナーゼとして以下のように実験を行った。Kinase buffer(10mM HEPES pH7.5、50mM NaCl、10mM MgCl₂、5mM MnCl₂、1mM DTT、5mM NaF、50mM β -glycerophosphate)に 5 μ M ATP と 10 μ Ci(Y-³²P)ATP (PerkinElmer,NEG502A)を加え、キナーゼと基質を 30℃で 30 分間反応させた。その後、4×sample buffer を加え、7 分間ボイルを行った。これらのサンプルは PAGmini グラジエントゲル (第一化学薬品)を用いて電気泳動し、Simply Blue™Safe Stain (Invitrogen) で 30 分間染色後、純水で脱色した。取り込まれた ³²P の検出は Bass Mac および X 線フィルムを用いて行った。

17. SLUG pT208 抗体の作成

抗体の作成は GenScript へ作製依頼して行った。2 羽のウサギに 3 回免疫して精製した抗体を、精製抗体の ELISA 力価 \geq 1:64,000 および非リン酸化抗体との交差反応が 10%以下であることを確認の上、提供を受けた。

18. SLUG pT208 抗体のクオリティーチェック

SLUG の 208 番目の Thr(SLUG T208)に対する抗リン化抗体(pT208 抗体)のクオリティーは、ドットブロットとペプチド競合にて確認した。

ドットブロットは、PBS(-)で溶解した SLUG T208 の非リン酸化ペプチドと、SLUG T208 のリン酸化ペプチドをそれぞれ 10ng、100ng、500ng 相当を Immobilion membrane (Millopore)上にスポットし、Western blotting のブロッキング以降のプロトコールと同様に、一次および二次抗体反応を行い、シグナルの検出を行った。

ペプチド競合は SLUG T208 の非リン酸化ペプチドと、SLUG T208 のリン酸化ペプチドを PBS(-)で溶解し、一次抗体である pT208 抗体 1.0 μ g に対して 5 倍量のペプチドをそれぞれ抗体に加え室温で 1 時間反応させた。pT208 抗体+SLUG T208 リン酸化ペプチド、pT208 抗体+SLUG T208 非リン酸化ペプチド、pT208 抗体のみの 3 種類を用いて、ウェスタンブロッティングを行い、3 者間でのシグナル強度を比較した。

19. 細胞の画分

回収した細胞を Schreiber's buffer A(10mM HEPES pH7.9、10mM KCl、0.1mM EDTA、0.1mM EGTA)+inhibitors(1mM NaF、1mM Na₃VO₄、1% protease inhibitor cocktail (Sigma-

Aldrich)、10mM β -glycerophosphate、1mM DTT) で懸濁し、氷上で 15 分間静置後、10%NP-40 を加え、遠心をして上清を回収した。さらに、上清をもう一度遠心し、得られた上清を細胞質画分とし、最終濃度が 20%になるようにグリセロールを加えた。一方で、核画分は遠心後に得られたペレットを Schreiber's buffer C(20mM HEPES pH7.9、0.4M NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA)+inhibitors(1mM NaF、1mM Na_3VO_4 、1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)、10mM β -glycerophosphate、1mM DTT) を懸濁したものを核画分として、最終濃度が 20%になるようにグリセロールを加えた。

20. タンパク質の安定性評価 (シクロヘキシミド処理)

リボソームサブユニットの 60S に作用してペプチド鎖伸長を阻害することで、タンパク質の翻訳過程を阻害するシクロヘキシミド(CHX)を用いた。最終濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調整したシクロヘキシミド添加培地を細胞に加え、培養の後、0 分、1 時間、2 時間、4 時間後に細胞を回収しサンプルとした。

21. ヒト組織検体の抽出

大阪大学歯学部附属病院 口腔外科 1 (制御系) にて過去に舌悪性腫瘍との診断の下、切除加療を受けた検体について検討を行った。検体を利用するにあたり、該当患者に対してはホームページ上にて説明文を掲載し、同意を得た。また、大阪大学歯学部附属病院倫理委員会の承認を得た。検体抽出に関しては、病歴・加療歴・予後がすべてカルテ上で確認できるものとした。

また本研究にて使用した検体は、stage 分類、病理組織診断結果を踏まえてグループ分けし、無作為に抽出した。

22. 免疫組織化学染色

脱パラフィンおよび親水化処理を行った切片を免疫組織化学染色に用いた。10 μm pH6.0 クエン酸にスライドを浸水し、圧力鍋 (Pascal、Dako) にて抗原性賦活処理を行った。Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution (Dako) を滴下し、室温で 5 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。Dako REAL Antibody Diluent (Dako) にて抗体を希釈し、4 $^{\circ}\text{C}$ で overnight 反応させた。TBST で 3 回洗浄後、二次抗体として Dako REAL EnVision キット/HRP RABBIT/MOUSE (Dako) を滴下し、室温で 30 分間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、DAB Subrtarate kit (Dako) にてシグナルの検出、ヘマトキシリンによる核染色を行った。

23. eSAS の樹立

口腔扁平上皮癌細胞株 SAS を使用した。培養プレートは径 100mm の低接着性プレート(EZ-BindShut II Cell Culture Products,Low-adhesion Surface) 〈IWAKI〉を使用した。Sphere formation Medium として、DMEM および Ham's F-12(Kaighn's)Medium 〈Sigma-Aldrich〉を 1:1 で混合したものに、1%Penicillin-streptomycin mixed solution (Stabilized)、2%B27(x50) Supplement 〈Gibco〉、0.002%Epidermal Growth Factor human, recombinant expressed in *E.coli* (最終濃度 20ng/ml) 〈Sigma-Aldrich〉、0.08%Fibroblast Growth Factor-Basic human,recombinant expressed in *E.coli* (最終濃度 20ng/ml) 〈Sigma-Aldrich〉を添加し使用した。細胞はカウンスにて計測の後、 3.1×10^4 cells/100mm dish を播種した。

非接着プレートにて 5-10 日間培養した Sphere は、Spheroid Catch を通過させ、200 μ m の孔よりも大きな Sphere のみを選択的に回収した。その後 PBS(-)にて洗い、細胞離散液(accumax) 〈Funakoshi〉にて Spheroid Catch から分離させた上で、Medium にて中和後、25G の注射針にてピペッティングし、Sphere をシングル細胞へ分解した。その後、同様のアッセイを 5 回繰り返し回収した細胞集団を通常培養することで、eSAS とした(補足図 1-A)。

24. 統計処理

Growth curve、Invasion/Migration assay のデータは、student's T test 検定を用いた。生存期間の解析は 4Steps エクセル統計 〈オーエムエス出版〉に従い、Statcel-The Useful Addin Forms on Excel-4th ed.にて、Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を描き、Log-rank 法検定を行った。 p 値 0.05 未満を有意とし、 $* < 0.05$ 、 $** < 0.01$ 、 $*** < 0.001$ と表記した。

3 群間比較を行った補足実験に関しては、Turkey-Tramer 法を用いた。 p 値 0.05 未満を有意とし、 $* < 0.05$ 、 $** < 0.01$ と表記した。

結果

1. in vitro での EMT および MET を経た細胞集団、SAS-δ の樹立

1-1. SAS-δ の樹立方法

ヒト舌扁平上皮癌由来培養細胞である SAS を TGF-β1 10ng/ml 添加の培地にて径 100 mm のディッシュにて培養し、コンフルエントな状態になった時点で、外周 10mm を残しスクレーパーで内周の細胞を除去し、PBS (-)にて浮遊細胞がなくなるまで可及的に洗浄を行った。その後、TGF-β1 10ng/ml 添加の培地にて培養を継続し、内側に遊走してきた細胞を確認し、遊走細胞の増殖を認めた時点で外層の細胞をスクレーパーで除去し、PBS(-)にて浮遊細胞がなくなるまで洗浄した。内部の遊走細胞に 0.02%-EDTA Solution、0.25%-Trypsin Solution で処理し、継代することで、Alpha-SAS を樹立した。Alpha-SAS 樹立と同様の工程を 4 回まで繰り返し、Beta-、Gamma-ならびに Delta-SAS の細胞集団を樹立した。その後、TGF-β1 添加を行わずに継代を 2 回行い、SAS-δ とした(図 1)。

1-2. SAS-δ において EMT マーカーは可逆的な変化を有する

Wound healing assay では SAS と Delta-SAS では明らかな遊走性の亢進を認めた($p<0.01$)。Gamma-SAS、Delta-SAS は 1 時間の時点ですでに明らかな遊走性の亢進を認め、6 時間では優位に遊走性が亢進した (図 2-A,B)。

Western Blotting では Gamma-SAS、Delta-SAS において上皮系マーカーである Occludin 発現の減少、および間葉系マーカーである N-cadherin、Vimentin の発現上昇を認め強く EMT が生じた細胞集団であることを確認した。また、その後 MET を生じた SAS-δ では Occludin の高発現および N-cadherin および Vimentin の低発現を認め、EMT および MET 変換の過程において、EMT マーカーは可逆的であることが明らかとなった (図 2-C)。

SAS-δ における遊走性を確認するため、Wound healing assay を行った。SAS、SAS-δ は 12 時間の時点で明らかな差を認めず、遊走能に関しても可逆的であった。また、TGF-β1 投与群においても明らかな差を認めず、TGF-β1 応答に関しても可逆的であった。しかし、Delta-SAS に関しては、細胞個々の遊走が目立ち、6 時間の時点で遊走最前線が不明瞭になっていた(図 2-D,E)。

1-3. SAS-δ は parental SAS と比較して、低い遊走能・浸潤能を有する

Migration assay (corning) を用いて比較したところ、SAS よりも SAS-δ は明らかに遊走性が低下しており、それは TGF-β1 投与下においても同様の結果を得た ($p<0.01$)。ここで興味深いことに、SAS に 48 時間 TGF-β1 を加えた結果と、Delta-SAS が Migration および Invasion

assay において明らかな遊走能、浸潤能の差が認められず、Western blotting での明らかなタンパク量の変化と相関性はないことが示唆された(図 3-A,B,C)。また Invasion assay に着目して比較すると、SAS および SAS-6 に関しては、48 時間の時点では浸潤能に明らかな差は認められなかった。TGF- β 1 投与群においては、Delta-SAS は強く EMT を生じている細胞集団であるということが明らかとなったが、SAS・TGF- β 1 投与群と比較して明らかな有意差は認めなかった。また SAS-6 に TGF- β 1 再投与を行っても、SAS・TGF- β 1 投与群と同等程度の浸潤能しか有しておらず、TGF- β 1 応答性の浸潤能の獲得に関しては、可逆的であると明らかになった(図 3-C)。SAS と SAS-6 において浸潤能の差異を確認するため、72 時間にて assay を行ったところ、SAS-6 は SAS と比較して明らかな浸潤能、遊走能の低下を認めた (図 3-D,E,F)。

2. SAS-6 の表現型

2-1. SAS-6 は高い細胞増殖能を有する

SAS-6 において顕著であったのが、細胞増殖の様相の差であった。それを明らかにするため、Growth curve を作成した。day 5 の時点で SAS-6 以外はほぼコンフルエントな状態となり SAS-6 は依然細胞が接着していない面があるにも関わらず細胞上に積層して増殖していくという特性を認めた(図 4-A)。

細胞増殖率に関して比較すると、SAS-6 は増殖能の増大を認めた(図 4-B) ($p<0.01$)。また、Delta-SAS においてはすでに SAS よりも細胞増殖が顕著に増加しており(図 4-B) ($p<0.01$)、TGF- β 1 投与継続下、つまり EMT の過程で新たな性質を獲得している可能性が示唆された。またその性質は SAS-6 においても持続しており、この性質獲得は不可逆な変化であることが認められた。このことから、SAS-6 は細胞接着阻止を回避可能な性質を獲得していると示唆された。

2-2. SAS-6 は高い重積能を獲得した新規な細胞集団である

SAS-6 において細胞上への増殖が顕著である特性を明視化するため、Growth curve の day 13 と同様の状態を作成し、走査型レーザー顕微鏡で広範囲を 3 次元撮影したものを 2 次元化し、それを重ね合わせ、細胞核をドットとして色調の差を数値化し、3 次元的な細胞密度を数値化した(図 5-A,B)。Average of intensity にて一地点における細胞の重積が SAS-6 が優位に多く(図 5-C)、Integrated intensity にて一視野内の細胞数に SAS-6 が優位に多い(図 5-D)と結論づけることが可能となった。つまり、SAS-6 は SAS と比較して同一範囲内に多く細胞が存在し、全体として細胞が積み重なるように縦に積層増殖 (パイルアップ) していることが明らかとなり、SAS-6 は強い足場非依存的な増殖能を有した細胞集団であることが示唆された。

細胞密度が低い状態では、SAS- δ において細胞骨格である Phalloidin、Vimentin とともに強く発現していたが、細胞の形態に著明な差異は認めなかった。通常 Phalloidin、Vimentin が高発現の場合は運動能が高い細胞と言えるが、SAS- δ に関して運動能は parental SAS と比較して低いことが明らかとなっており、この高い重積能を有することと、Phalloidin および Vimentin の高発現との関連が新たに示唆された(図 5-E)。また、SAS と SAS- δ の核を比較すると、SAS- δ は核が大きい傾向を認めた(図 5-E)。

2-3. SAS- δ は細胞接着阻止の回避に関連する Hippo pathway に異常を来す

細胞接着阻止を回避する性質の影響を明らかにするため、細胞増殖と関連すると言われている Hippo pathway 関連タンパクについて Western blotting にて検討を行った。興味深いことに、SAS では LATS1 が優位に、SAS- δ では LATS2 が優位に働いていることが明らかとなった。SAS では細胞密度が低い状態では、LATS1 活性が低いことから、YAP、TAZ のリン酸化率が低く核移行が生じ細胞増殖が進み、Hippo pathway が OFF の状態を示す。しかし、細胞密度が上がると LATS1 の発現が上昇、それに応答して p-LATS1/LATS1 比も上昇し、LATS1 活性化による p-YAP/YAP 比・p-TAZ/TAZ 比が増加することで、核移行が阻害され細胞増殖が抑制される。よって Hippo pathway が正しく稼働していることが明らかとなった(図 6-A,B,C,D)。

一方、SAS- δ は細胞密度が低い状態においても Hippo pathway 誘導の LATS2 のリン酸化率が高く、LATS2 に異常が生じている可能性が示唆された。また、LATS2 活性の上昇に反して、YAP、TAZ タンパクが非常に多く維持されており、Hippo pathway のシグナル伝達に異常を生じていることが明らかとなった。また、細胞密度が高い状態においても、YAP、TAZ のリン酸化量は変化せず、LATS2 下流へのリン酸化が稼働せず Hippo pathway に破綻を来し、細胞接着阻止を回避している可能性が示唆された(図 6-A,B,C,E)。

以上のことから SAS- δ において YAP、TAZ 以外の LATS のリン酸化基質の存在が示唆された。

2-4. SAS- δ は Hippo pathway におけるリン酸化の移行に機能不全が生じている

次に Hippo pathway に関連する分子機構のタンパク量の変化と、EMT との関連を Western blotting にて検討した。LATS1 では TGF- β 1 投与により p-LATS1/LATS1 比が増加した。また、Delta-SAS でも高い状態を維持し、SAS- δ にて TGF- β 1 を投与しない状態でもその性質は持続し、常に高いリン酸化の割合を示した。

一方 LATS2 では SAS・TGF- β 1 投与群にて p-LATS2/LATS2 比は減少した。EMT を強く生

じた Delta-SAS でも SAS と比較してリン酸化率が減少し、その後 SAS-δ では TGF-β1 投与の有無に関わらず、リン酸化率は低い状態を維持した。つまり、LATS1 は SAS-δ においても EMT を生じた状態と同様に TGF-β1 に応答し高いリン酸化率を維持したが、LATS2 に関しては、低いリン酸化率を維持するという結果を得た。

ここで興味深いことに、SAS-δ において、LATS1/2 の上流である mammalian Ste20-like protein kinase (MST)では EMT 誘導にて p-MST2/MST2 比は増加しており、それは Delta-SAS、SAS-δ でも同様であることから、仮想 MET 細胞である SAS-δ は、Hippo pathway における MST2-LATS2-TAZ リン酸化の移行に機能不全が生じているということが明らかになった (図 7-A,B)。

3. ノードマウス舌癌モデルにおいて、SAS-δ は病理学的に悪性度の高い細胞である

生存率に関しては、SAS と比較して SAS-δ は有意な差はなかったものの、SAS-δ の方が早期に死亡する傾向を認めた(log-rank test $p=0.30$ 、図 8-A,B)。

体重変化は SAS-δ の方が高い減少率を認めた。また、固体死亡にて平均体重が一度増加しても、その後減少するまでの期間が短いことから、体重減少のスピードが速いことが示唆された(図 8-C)。

day 8 の検体で病理組織検体にて比較すると、SAS は舌移植巣が境界明瞭であるのに対し、SAS-δ は筋繊維内へ進展しており、境界は不明瞭で、腫瘍は胞巣を作らずび漫性に浸潤していた。また、筋繊維へ進展している部位には濃染性の核や形状不整の核が目立ち、細胞異型が SAS よりも強く認められ、病理学的に悪性度の高い細胞であることが示唆された(図 8-D)。

4. SAS-δ は高い Sphere 形成能を持つ

SAS は高い Sphere 形成能を持つ細胞であると報告されている²⁰⁾が、と比較しても SAS-δ は day 4 にて Sphere 形成率が高かった (図 9-A)。day 7 においても SAS-δ は高い Sphere 形成能を有した (図 9-B)。つまり、SAS-δ は Sphere 形成の初期段階で高い形成能を獲得し Sphere 形成の開始率が高いだけでなく、それを維持増大する能力を獲得していることが示唆された。

5. SAS-δ は γ 線および CDDP/5-FU 投与に対して耐性を有する

γ 線照射後、SAS において 48 時間後にアポトーシスの上昇に伴って分解された Caspase3 (Cleaved Caspase-3) の上昇を認めたが、SAS-δ は明らかな上昇を認めなかった (図 9-C)。

CDDP 投与後は SAS では 48 時間経過後から継続して Cleaved Caspase-3 の発現上昇を認め

たが、SAS-8 では明らではなかった (図 9-D)。

また 5-FU も同様に SAS では 24 時間後から Cleaved Caspase-3 の発現上昇を認めたが、SAS-8 では明らではなかった (図 9-E)。

6. SLUG pT208 抗体の作成

SAS-8 が新たな性質を獲得していることが明らかになったことから、臨床応用に向けて SAS-8 のように EMT および MET を経た細胞を認識できる抗体の作成を検討した。その際、SAS-8 が LATS2-YAP/TAZ のシグナル経路に異常を生じていたことが明らかになり、新たなリン酸化基質の存在が示唆された (図 6-E) ことから、このリン酸化基質を摸索した。LATS1/2 はキナーゼであり、YAP、TAZ のみならず SNAIL もリン酸化し EMT を誘導するという報告¹⁶⁾、および SAS-8 が TGF- β 1 投与による EMT および非投与による MET 誘導にて樹立した細胞であることを受け、LATS1/2 のリン酸化標的となる基質として EMT 調整因子であり、SNAIL と相同性の高い SLUG に関して検討を行った (図 10-A)。

放射性リンを用いた *in vitro* キナーゼアッセイにて LATS1/2 共に Slug のリン酸化を認めた。また、209 番目アラニン変異体でリン酸化を受けた Slug が減少したことから、209 番目のスレオニンがリン酸化標的になると示唆された (図 10-B)。次に、209 番目を特異的に認識する抗体を GeneScript 社にて作成し、この抗体を用いて同様の *in vitro* キナーゼアッセイを行うと、LATS1/2 共にアラニンにてリン酸化のバンドが消失し、*in vitro* で 209 番目のスレオニンが LATS1/2 によってリン酸化されることが明らかになった (図 10-C)。

cell culture 下でも同様の結果が得られるか確認するため、SAS にて抗体のドットプロット (図 10-D)、Phosphatase assay (図 10-E) および Peptide competition (図 10-F) を行い、抗体の品質を確認した。

7. EMT に伴い SLUG はタンパク発現量・リン酸化量ともに増加し、MET 後も高いリン酸化を維持する

EMT の増加に伴い SLUG および SNAIL タンパクは発現量を上昇させ、MET を生じた SAS-8 になると共に減少した。しかし SLUG および SNAIL は SAS・TGF- β 1 投与群よりも高い発現レベルを維持した。興味深いことに再度 TGF- β 1 を投与した SAS-8 群においては、すぐさま SLUG および SNAIL の発現量は Beta-SAS 程度にまで上昇し、TGF- β 1 応答に対して感受性が高くなっている可能性が示唆された (図 11-A,B,C)。

LATS1/2 誘導の SLUG リン酸化および SNAIL のリン酸化に関しては、両者に全く異なる結

果が得られた。SLUG pT208 は SAS-6 において Delta-SAS と同程度の発現を認めたが、その後再度の TGF- β 1 添加に関しては SLUG タンパク量が増加しているにもかかわらず、リン酸化量は SAS-6 よりも減少した。つまり、SAS の持つ TGF- β 1 応答性のリン酸化反応と全く異なる結果が得られた。一方 SNAIL pT203 は SAS-6 において SAS と同程度のリン酸化量にまで減少し、TGF- β 1 添加においても同程度のタンパク量を認め、SAS のもつ TGF- β 1 応答性のリン酸化反応と同様の結果が得られた。

SLUG および SNAIL のタンパク量と、LATS 1/2 によってリン酸化を受けたタンパク量の間には、SAS においては相関性があるが、MET を生じた SAS-6 においては相関性がなくなるということが明らかとなった。

また、LATS2 ノックダウン時の SLUG のタンパク安定性に関しては、細胞質画分、核画分ともに変化はなく、SLUG タンパクの安定性は LATS2 依存性ではないことが明らかとなった。つまり、LATS2 により SLUG T208 がリン酸化され、安定化することが示唆された (図 11-D)。

8. Slug は Invasion を抑制した

EMT の転写因子として E-cadherin のプロモーター領域に結合する SNAIL および SLUG は、非常に相同性の高い因子であり、SNAIL が EMT を誘導すると明らかにされてから SLUG に関しても同様の結果が得られると考えられていた。しかし、近年 SNAIL と SLUG が異なるターゲット遺伝子の発現を調整していることが報告されており²¹⁾、本研究においても、SAS-6 においては同じ挙動を示さなかったことから、EMT および MET の過程で SNAIL および SLUG が異なる働きをしている可能性を検討するため、Invasion / Migration assay を行った。

Migration に関しては control と同程度の Migration を示した (図 12-A,B) が、Invasion に関しては、SLUG のノックダウンにて Invasion が促進した (図 12-C,D)。それは EMT および MET 転換を経た SAS-6 において著明であった。これらの結果から、Index of invasion (%浸潤 siRNA 細胞 / %浸潤コントロール細胞) を求めると、SAS-6 において明らかに SLUG をノックダウンすると上昇しており (図 12-E)、EMT および MET の経過の中で細胞が上皮系の形態を維持するのに SLUG が大きく影響していることが示唆された。また Western blotting にて SLUG がノックダウンされていることを確認した (図 12-F)。

9. SLUG pT208 抗体での免疫組織化学染色が可能である

SLUG pT208 抗体にて認識される T208 がリン酸化された SLUG は悪性腫瘍部位でも上皮内および上皮より一部浸潤した部位で認められ、顆粒層に関しては、正常部位でも染色を認めた。

悪性腫瘍で染色が強い部位に関しては、核のみならず細胞質にも抗原抗体反応を認めた (図 13)。

10. SAS- δ の有する高い Sphere 形成能は、癌幹細胞に関連する Hedgehog 経路とは異なる経路の稼働により獲得可能となっている

EMT と Sphere 形成能の獲得に関して、その独立性についても検討を加えた。この検討において、SAS- δ は EMT 誘導性にて Sphere 形成能を獲得している細胞系であるとし、大阪大学微生物病研究所野島研において、Sphere 形成能の高い細胞を選択的に回収して樹立した eSAS (補足図 1-A)と比較した。

Sphere 形成能を比較すると、SAS- δ 、eSAS、SAS の順に Sphere 形成能が高いことが明らかとなった(補足図 1-B,C,D,F)。

Growth curve の結果、eSAS は他群と比較して細胞増殖率が低く (補足図 2-A)、通常の接着プレート上での増殖において、SAS- δ のようなパイルアップするような異常増殖は認めなかった(補足図 2-B)。つまり高い Sphere 形成能を有することと、SAS- δ の持つパイルアップする特性を有することには、相関関係がないことが示唆された。

Wound healing assay による細胞遊走性の比較については 3 細胞間で明らかな優位差を認めなかった(補足図 2-C,D)が、SAS- δ は eSAS と同程度に SAS よりも低いことが明らかとなった(補足図 2-E,F)。しかし、Invasion assay においては、SAS- δ は eSAS と比較して優位に浸潤能が高く、Sphere 形成能(補足図 1-C,E)と浸潤能の関連については相関関係がないことが示唆された(補足図 2-E,G)。

また、*in vivo* マウス舌腫瘍モデルでは SAS と比較して高い死亡傾向は認められたものの、舌腫瘍巣は SAS と同程度の境界明瞭さを示し、細胞異型も明らかに SAS- δ 程の悪性度の増悪は認めなかった(補足図 2-H,I)。

ここで興味深いことに、DNA マイクロアレイにて、eSAS のみに癌幹細胞と関連していると報告されている Hedgehog(Hh) acyltransferase(HHAT)²²⁾が突出して高値を示しており、高い Sphere 形成能を有する SAS- δ においては SAS と同程度であるという結果が得られた(補足図 3-A,B,C)。

考察

悪性腫瘍に対する治療において、予後予測は治療方針を決定する治療初期段階で大きな指標となる。近年、浸潤転移に対する研究が進む中、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 EMT 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。EMT が初期治療後の病巣の局所再発や、頸部リンパ節転移および遠隔転移へ関与する可能性が明らかになれば、初期治療のみならず、その後の経過に多大なる影響を与える。EMT の研究が進められている中、EMT を調整する機構に関しては明らかになってきつつあるが、転移巣で生じると考えられている MET に関しては不明な点が多く、加えて病理組織像において EMT を生じている細胞が明らかでないこともあり、EMT や MET に関しては未だ解明が進んでいないのが現状である。

1. 仮想 EMT および MET 細胞である SAS-6 が獲得した性質について

本研究において、口腔扁平上皮癌の細胞株である SAS を *in vitro* で人為的に EMT と MET を連続的に生じさせた結果、明らかに SAS (SAS-6 細胞の元株) と異なる性質を有する細胞株 SAS-6 が樹立された。当初 TGF- β 1 添加により EMT を誘導して回収した SAS-6 は、潜在的に EMT を生じやすい細胞集団であり、TGF- β 1 刺激がない状態であっても SAS と比較して EMT を生じやすい細胞であると仮説を立てた。しかし、TGF- β 1 刺激を除いた SAS-6 は、明らかに Migration / Invasion が低下し、細胞形態および細胞増殖が SAS と異なる性質を有していた。このことから、TGF- β 1 刺激により EMT を生じ、その後に無刺激になることで細胞が MET を生じ、それは上皮系細胞の特性を有しながらも、明らかに新たな性質を獲得したことが示唆された。つまり、EMT および MET の変換が完全に可逆的であるならば、SAS-6 は SAS と同じ性質を有するものと考えられる一方、なんらかの変化が生じていれば不可逆的变化が誘導された新しい株であると考察できるため、EMT と MET は完全なる可逆ではないことが示唆された。

in vitro での細胞培養では、通常細胞はプレートに満遍なく増殖しコンフルエントな状態に近づくにつれて増殖スピードが弱まることが知られている。そもそも悪性腫瘍細胞である SAS はこの細胞増殖に異常が生じていることが自明なので、一面に細胞が播種するコンフルエントな状態になった後に一部盛り上がるように細胞増殖が継続する。一方、樹立した SAS-6 では、一度もコンフルエントな状態になることなく細胞が積み重なる (パイルアップ) するように増殖が進み、ある一定の高さまで増殖すると、ようやく細胞が播種していない場所をプレート上で探すように増殖し、一面に細胞が播種される。増殖が進むにつれて、SAS-6 の細胞数が明らかに SAS よりも多く、かつそれは TGF- β 1 の影響ではないこと (図 4)、細胞増殖が三次元的に異常を呈していることが明らかになった (図 5)。この細胞増殖に関して、contact inhibition 関連タンパク

質の発現を調べると、Hippo pathway に異常を呈していることが示唆された。また、SAS-6 において、LATS2 と YAP、TAZ のシグナルに異常を認め (図 6)、EMT および MET と Hippo pathway との関連性の検討で、MST-LATS2 のシグナル経路に異常を認めた (図 7) ことから、LATS2 の異常が Hippo pathway 破綻の一因になっている可能性が示唆された。

in vivo ノードマウス舌腫瘍モデル作成による細胞悪性度の判定では、SAS-6 群は、高い死亡傾向と細胞悪性度の増強が示された。生存率を議論するには死亡原因を考慮する必要がある。すなわち、①摂食困難による栄養失調、②全身転移による悪液質の 2 点が挙げられ、早期の死亡原因として①、中長期的な死亡原因としては②であると考えられる。さらに、摂食困難の原因としては、(ア)腫瘍増大による口腔内舌容量の増大、(イ) 腫瘍硬結による運動能力の低下、(ウ) 腫瘍形成による筋組織の萎縮が考えられるが、早期の死亡率が高いことを考慮すると、(ア)および (イ) の可能性が示唆される。実際、SAS-6 は *in vitro* での細胞増殖が SAS 群と比較して高く、病理組織像からも筋繊維内へ入り込むように腫瘍が増大していることとも一致する。また、HE 染色の結果から、SAS-6 は濃染性の核や形状不整の核が目立ち、細胞異型が SAS よりも強いことが明らかとなった。つまり、SAS-6 は SAS と比較して高い悪性度を獲得している傾向にあると結論付けることができる。

さらに、近年癌幹細胞の研究が進む中、幹細胞性の特徴の一つである Sphere 形成能の獲得に EMT が関連していることが示唆されている²³⁾。そもそも SAS は他の悪性腫瘍と比較しても Sphere 形成能の高い細胞であると報告されている²⁰⁾が、SAS-6 は、day 4 の時点では明らかに SAS よりもさらに高い Sphere 形成能を有していた (図 9-A,B)。この結果は、EMT を経ることで Sphere 形成能を獲得するという他の報告とも一致する。大阪大学微生物病研究所の野島らのグループは LATS2 が Sphere 形成の初期段階で必要であるというデータを得ており (未発表)、SAS-6 は EMT および MET の経路において LATS2 の高い活性を獲得することで、初期段階における Sphere 形成能を向上させた可能性が考えられる。また、YAP や TAZ が癌幹細胞に影響する²⁴⁾とする報告もあり、SAS-6 が常に YAP、TAZ の高発現であることもこれらの性質の獲得の一因である可能性もある。SAS-6 においては Hippo pathway 破綻により、LATS2 の高発現および YAP、TAZ の高発現の混在があり、LATS2・TAZ/YAP のいずれの高発現が Sphere 形成に関連するのか検討の余地があるが、いずれにせよ Hippo pathway 破綻による悪性化変異の獲得は明らかである。

さらに、癌幹細胞の性質維持に Hedgehog signaling pathway が関連するとの報告がある²²⁾が、DNA マイクロアレイの結果、Sphere 形成能に特化して採取した eSAS(補足図 1-A)では HHAT が明らかな高値を示した(補足図 3-A,B,C)。しかし Sphere 形成能の上昇している SAS-

δ は上昇を認めなかったことから、EMT を経て得られる Sphere 形成能は、現在解明されている癌幹細胞で活性化されると言われているシグナル経路と異なる経路の活性化を獲得していることが示唆され、Hippo pathway の破綻による足場非依存的な増殖能の獲得が Sphere の維持にも関連していることが明らかとなった。これは eSAS が重積する特性を有していない(補足図 2-A,B)ことから示唆することができ、EMT によって獲得する高い Sphere 形成能は、もともと持つ細胞の癌幹細胞の特性である Sphere 形成能とは異なる機序を辿る可能性が示唆された。

次に Sphere 形成能獲得に関して議論するにあたり、Sphere 形成によって放射線、薬剤耐性が獲得されるという報告が散見されることから、 γ 線および薬剤耐性についても検討を行った。 γ 線照射、CDDP 投与、5FU 投与全ての条件において SAS- δ では caspase-3 の分解が抑制されており、耐性を獲得していることが示唆された。プレート上で重積するように増殖する SAS- δ は Sphere 様の細胞塊を形成していると考察でき、それは、Hippo pathway の破綻により細胞接着阻止から回避することで得られた特異的な性質であることが示唆される。

EMT および MET の連続した変換により SAS- δ 細胞は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プログラミングされていると考えられる。SAS- δ において EMT マーカーや浸潤能、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たままであったが、細胞増殖に関しては Hippo pathway に破綻を来し、足場非依存的な増殖能を獲得し、関連して高い Sphere 形成能や放射線、化学療法抵抗性を獲得していたという点で不可逆な機構を新たに獲得し、悪性化変異していると考えられた。すなわち、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た。また、EMT と MET が可逆的な分子機構でないことが明らかになった。

これまで EMT により原発巣から浸潤転移した癌細胞が、転移巣にて MET を生じて定着するという概念が提唱されてきたが、本研究から、原発巣内においても TGF- β 1 等の EMT 誘導刺激を有する微小環境に晒され EMT を生じた細胞がそれらの誘導刺激から解除されるという、刺激と解除の繰り返しによっても悪性化変異するというモデルが示唆され、本メカニズムにより悪性化変異した細胞を Advanced Epithelial (aE) cell と名付けることとした。この aEcell は Hippo pathway の破綻により足場非依存的な増殖能の有すること、高い Sphere 形成能を有すること、薬剤および放射線抵抗性を有することを特徴とした。2005 年に 2 つの研究グループが、EMT は化学療法抵抗性の獲得に影響するが、EMT による浸潤、転移に必要な前提条件ではないというデータを示しており^{25),26)}、本研究結果も EMT 研究に対する新たな方向性の一つとして提言できると考えている(図 14)。

さらに、現在 EMT の有無の判断に使用されている上皮系マーカー (Occcludin)、間葉系マーカー (N-cadherin、Vimentin) に関して、TGF- β 1 の投与に影響された可逆的な結果 (図 2-C) を得ており、現時点で EMT の判定に用いられているマーカーはある時点での EMT を判定することはできても、SAS-6 のような EMT および MET を経て新たな性質を獲得している aE 細胞は認識できないということが明らかになり、新たなマーカー選択の必要性が示唆された。

2. SLUG のリン酸化抗体の作成と臨床応用への提言

本研究にて、LATS により SLUG の 208 番目のスレオニンがリン酸化を受けることが明らかとなった。SLUG のリン酸化は EMT に伴い上昇し、SAS-6 においても高リン酸化が維持された (図 11-A)。つまり、SAS-6 に限らず EMT および MET を経た癌細胞でも高リン酸化状態であることが示唆された。また、このリン酸化抗体 (SLUG pT208) は、前述の細胞増殖の異常や高い Sphere 形成能、 γ 線や薬剤耐性能の獲得を生じた SAS-6 で SLUG の高リン酸化維持を認識できることから、組織内で EMT を生じている細胞、且つ MET により再度上皮系の性質を持ちながらも一つ悪性度のステージを上った高度な悪性癌細胞も認識可能な抗体であることが示唆された。

実際、臨床検体を用い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 および MET の経過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ことが期待される。

3. SLUG pT208 は MET を誘導し Epithelial な状態を維持する

SLUG は EMT の初期段階においてデスモゾームによる細胞間結合に関与するタンパク質の制御を行い、その後 SNAIL と同様に E-cadherin の転写抑制を行うと考えられている。しかし本研究において SAS および SAS-6 で SLUG をノックダウンすると浸潤指数が上昇し、特に EMT および MET を経た SAS-6 において顕著に上昇するという結果が得られた。そもそもこれまでの EMT の研究では、TGF- β 1 投与等で細胞に EMT 誘発刺激が加えられており、EMT の開始 (上皮から間葉系への転換) についての議論であることが多い。今回は EMT 誘発刺激を加えずに Invasion / Migration を比較しており、SLUG が元来の上皮系の状態を維持しようとする働きを持ち合わせている可能性が示唆され、この傾向は SAS-6 において顕著であった。本研究では、SAS-6 は LATS2-SLUG 経路が強く働くことが Hippo pathway の破綻に影響している

可能性を示唆しており、LATS1/2 からリン酸化を受ける SLUG-T208 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。

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。

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、終始ご親切なるご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻 顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始有益な助言並びにご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学微生物病研究所 分子遺伝研究分野、野島博教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の全般に渡りご指導をいただいた同研究分野、藪田紀一准教授、内藤陽子博士研究員、愛知県立がんセンター研究所 分子腫瘍学部 向井智美博士に深甚なる謝意を表します。また臨床的な観点から有益なご助言を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻 顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）田中晋講師に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を行うにあたり、多大なるご協力を頂きました大阪大学医学系研究科 病態制御医学専攻 野島聡助教、大阪大学医学部大阪大学微生物病研究所 分子遺伝研究分野の皆様、内橋俊大医員をはじめとする大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻 顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

また終始変わらぬ協力と理解を示してくれた家族に感謝いたします。

参考文献

- 1) 桐田忠昭, Zheng, Y., 他:わが国の口腔癌の疫学的検討ーその推移と将来予測ー.日本口腔外科学会誌 1997,43:140-147.
- 2) Lingen M., Kalmar J., et al.: Critical Evaluation of Diagnostic Aids for the Detection of Oral Cancer. Oral Oncology 2008, 44:10-22
- 3) César Rivera: Essentials of oral cancer. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 2015,8:11884-11894
- 4) Report of head and neck cancer registry of Japan, Clinical statistics of registered patients, 2002. Oral cavity. Japan Journal of Head and Neck Cancer 2006, 32:15-34.
- 5) Kramer I.R, Pindborg J.J, et al.: The World Health Organization histological typing of odontogenic tumours. Introducing the second edition. Europe Journal of Cancer Part B: Oral Oncology 1993, 29:169-171.
- 6) Jakobsson P.A., Eneroth, C, et al.: Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. Acta Radiologica:Theraoy,Physics,Biology 1973,12:1-8.
- 7) Anneroth, G., Hansen, L.S.: A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. Scandinavian Journal of Dental Research 1984, 92: 448-468.
- 8) Yamamoto, E., Kohama, G., et al.: Mode of invasion, bleomycin sensitivity and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cancer 1983, 51: 2175-2180.
- 9) Nieto M., Huang R., et al.: EMT:2016 ,Cell 2016, 166:21-45.
- 10) Xia L., Yun F., et al.: Role of Signaling Pathways in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2015, 15:6201-6206.
- 11) Cano A., Perez-Moreno MA., et al.: The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nature Cell Biology 2000, 2:76-83.
- 12) Takeyama Y., Sato M., et al.: Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. Cancer Letter 2010, 296:216-224.
- 13) Pan D: The hippo signaling pathway in development and cancer. Developmental Cell 2010, 19:491-505.
- 14) St. John MA, Tao W., et al.: Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas,

- ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature genetics* 1999, 21:182-186.
- 15) Yabuta N., Okada N., et al.: Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *The Journal of Biological Chemistry* 2007, 282:19259-19271.
 - 16) Aylon Y., Michael D., et al.: A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes & development* 2006, 20:2687-2700.
 - 17) Aylon Y., Ofir-Rosenfeld Y., et al.: The Lats2 tumor suppressor augments p53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASPP1. *Genes & development* 2010, 24:2420-2429.
 - 18) Zhang K., Rodriguez-Aznar E., et al.: Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *EMBO Journal* 2012, 31:29-43.
 - 19) Kim HY., Jackson TR., et al.: On the role of mechanics in driving mesenchymal-to-epithelial transitions. *Seminars in Cell and Development Biology* 2016, S1084-9521:30137-30139
 - 20) Chen SF, Chang YC, et al.: Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties. *PLoS One* 2012, 7:e31864.
 - 21) Ye X, Tam WL, et al.: Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* 2015, 525:256-260.
 - 22) Justilien V., Walsh MP., et al.: The PRKCI and SOX2 Oncogenes are Co-amplified and Cooperate to Activate Hedgehog Signaling in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Cell* 2014, 25:139-151.5.
 - 23) Mani SA, Guo W, et al.: The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 2008, 133:704-71.
 - 24) Zanconato F, Cordenonsi M, et al.: YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* 2016, 9:783-803.
 - 25) Fischer KR, Durrans S, et al.: Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015, 524:472-476.
 - 26) Zheng X, Carstens JL, et al.: Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 2015, 527:525-530.

図の解説

図 1. SAS-δ の樹立方法

SAS を TGF-β1 10ng/ml 添加の培地にて径 100 mm のディッシュにて培養し、コンフルエントな状態になった時点で、外周 10mm を残しスクレーパーで内部の細胞を除去し、PBS(-)にて浮遊細胞がなくなるまで可及的に洗浄を行った。その後、TGF-β1 10ng/ml 添加の培地にて培養を継続し、内周に遊走してきた細胞を確認し、遊走細胞の増殖を認めた時点で外周の細胞をスクレーパーで除去し、PBS(-)にて浮遊細胞がなくなるまで洗浄した。内周の遊走細胞に 0.02%-EDTA Solution、0.25%-Trypsin Solution で処理し、継代することで、Alpha-SAS を樹立した。Alpha-SAS 樹立と同様の工程を 4 回繰り返して、Delta-SAS の細胞株を樹立した。その後、TGF-β1 添加を行わずに継代を 2 回行い、SAS-δ とした。

図 2. SAS-δ の EMT 応答および遊走性の比較

- (A) SAS から Delta-SAS までの wound healing assay。+または-にて TGF-β1(10 ng/ml)投与の有無を示す。記録は wound 形成後 0、0.5、1、2、4、6 時間にて行った。スケールバー,1mm
- (B) 図 2-A において各視野内で 5 点を wound と垂直に計測し、平均を求めることで各視野における遊走距離を求めた。計測はそれぞれ 3 回施行し、その平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。 ** $p < 0.01$
- (C) EMT に関連するタンパクの発現を上皮系マーカーである Occludin、間葉系マーカーである N-cadherin、Vimentin を Western blotting にて調べた。+または-にて TGF-β1(10 ng/ml)投与の有無を示す。α-tubulin はローディングコントロールとして、各レーンにアプライした総タンパク質量が揃っていることを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。
- (D) SAS、Delta-SAS、SAS-δ における TGF-β 投与時の wound healing assay。+または-にて TGF-β1(10 ng/ml)投与の有無を示す。記録は wound 形成後 0、3、6、12 時間にて行った。スケールバー,1mm
- (E) 図 2-A において各視野内で 5 点を wound と垂直に計測し、平均を求めることで各視野における遊走距離を求めた。計測はそれぞれ 3 回施行し、その平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。

図 3. 遊走能、浸潤能の比較

- (A) SAS、Delta-SAS、SAS-δ における TGF-β1 投与時の Invasion、Migration assay (assay total; 48 時間、 1.0×10^6 cells/well)の結果の一例を示す。+または-にて TGF-β1(10 ng/ml)投与の有

無を示す。スケールバー,200 μ m

- (B) Migration assay は 3 回施行し、各々 5 視野を光学顕微鏡で撮影した。目視にて細胞をカウントし、平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。** $p < 0.01$ 、NS $p > 0.05$
- (C) Invasion assay は 3 回施行し、各々 10 視野を光学顕微鏡 (Leica) で撮影した。目視にて細胞をカウントし、平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。** $p < 0.01$ 、NS $p > 0.05$
- (D) SAS、SAS- δ における TGF- β 1 投与時の Invasion、Migration assay (assay total 72 時間 assay) 時の SAS、SAS- δ の結果の一例を示す。スケールバー,200 μ m
- (E) Migration assay は 3 回施行し、各々 5 視野を光学顕微鏡で撮影した。目視にて細胞をカウントし、平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。*** $p < 0.001$
- (F) Invasion assay は 3 回施行し、各々 10 視野を光学顕微鏡で撮影した。目視にて細胞をカウントし、平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。*** $p < 0.001$

図 4. Growth curve での比較

- (A) SAS、SAS+TGF- β 1、Delta-SAS、SAS- δ 、SAS- δ +TGF- β 1 の Growth curve 描写時の細胞増殖形態の変化を示す。上記の数値は測定開始日を day 0 とし、day 13 まで記録、計測した。+または-にて TGF- β 1(10 ng/ml)投与の有無を示す。スケールバー,500 μ m
特徴的な day 5 および day 10 を拡大図として下に示す。スケールバー,200 μ m
- (B) Growth curve を示す。+または-にて TGF- β 1(10 ng/ml)投与の有無を示す。検定は 3 回施行し、平均値をグラフ化した。標準偏差(SD)を棒線で示す。** $p < 0.01$

図 5. 細胞増殖の 3 次元比較

- (A) Growth curve と同条件で day 13 まで培養し、Hoechst33258 にて蛍光免疫染色を行いレーザー顕微鏡 (FV10i) にて観察した。10 倍の対物レンズを使用し、広範囲を 3 次元撮影した。Fluoview のソフトウェアを使用し、Z 軸の撮影範囲は目視にて、スライス幅は自動設定し、total で最も多い部位で 25 枚程度撮影するように設定した。すべての撮影は同条件で行い、3 視野撮影した。撮影した XY 軸を順に重ね合わせ二次元化したものを示す。
スケールバー,200 μ m
右下に Hoechst33258 での蛍光免疫染色の拡大図を示す。スケールバー,10 μ m
- (B) 3 次元構築した細胞増殖の様子および、XZ 軸の例を示す。
- (C) 図 5-A を ImageJ のプログラムを使用し、色調として数値化したものの比較を示す。Average

of intensity は Z 軸方向へ細胞の積み重なるの程度を示す。無作為に 3 視野を抽出して検定を行い、平均値をグラフ化した。標準偏差(SD)を棒線で示す。**<0.01

(D) 図の解説 図 5(C)と同様の方法で色調を数値化したものを示し、Integrated intensity は視野全体での細胞密度を示す。無作為に 3 視野を抽出して検定を行い、平均値をグラフ化した。標準偏差(SD)を棒線で示す。*** $p < 0.001$


(E) Hoechst33258(核、青)および Phalloidin(F-actin、赤)、Vimentin(緑)にて蛍光免疫染色したものを示す。スケールバー,10 μ m

図 6. 細胞密度の変化に伴う、Hippo pathway 関連タンパクの比較

(A) SAS および SAS- δ を 2.0×10^6 cells を直径 60mm シャーレに播種培養し、細胞密度を上昇させ day 2、4、6、8 にて回収した時点での細胞密度を示す。スケールバー,1mm

(B) Hippo pathway に関連するタンパク質の Western blotting を示す。 α -tubulin はローディングコントロールとして、各レーンにアプライした総タンパク質量(50 μ g 相当をアプライ)が揃っていることを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。

(C) 図 6-B のデータを ImageJ プログラムにて数値化したものを示す。LATS1/2、YAP/TAZ は α -tubulin での差異を反映している。

(D) SAS での細胞密度変化に伴う Hippo pathway の変動を模式図で示す。P;リン酸化 ;作用不調和を示す。

SAS では細胞密度が低い状態では、LATS1 活性が低いことから、YAP、TAZ のリン酸化率が低く核移行が生じ細胞増殖が進み、Hippo pathway が OFF の状態を示す。しかし、細胞密度が上がると LATS1 の発現が上昇、それに応答して p-LATS1/LATS1 比も上昇し、LATS1 活性化による p-YAP/YAP 比・p-TAZ/TAZ 比が増加することで、核移行が阻害され細胞増殖が抑制される。よって Hippo pathway が正しく稼働する。

(E) SAS- δ での細胞密度変化に伴う Hippo pathway の変動を模式図で示す。

SAS- δ は細胞密度が低い状態においても Hippo pathway 誘導の LATS2 のリン酸化率が高く、LATS2 に異常を認めた。また、LATS2 活性の上昇に反して、YAP、TAZ タンパクが非常に多く維持されており、Hippo pathway のシグナル伝達に異常を生じていることが明らかとなった。また、細胞密度が高い状態においても、YAP、TAZ のリン酸化量は変化せず、LATS2 下流へのリン酸化が稼働せず Hippo pathway に破綻を来し、細胞接着阻止を回避する。

図 7. EMT_MET の際の Hippo pathway 関連タンパクの比較

- (A) Hippo pathway に関連するタンパク質の Western blotting を示す。 α -tubulin はローディングコントロールとして、各レーンにアプライした総タンパク質量(50 μ g 相当をアプライ)が揃っていることを示す。+または-にて TGF- β 1(10 ng/ml)投与の有無を示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。
- (B) 図 7-A のデータを ImageJ プログラムにて数値化したものを示す。LATS1/2、MST2、SAV、YAP/TAZ は α -tubulin での差異を反映している。

図 8. マウス舌腫瘍モデルでの比較

- (A) 舌腫瘍モデル作成方法を示す。SAS および SAS- δ は 2.0×10^6 cells/50 μ L を左側舌縁より 26G 針にて移植した。マウスは BALB/c Slc-*nu/nu* 5 week-old の雌ヌードマウスを各々 12 匹使用し、そのうち 8 匹は生存率を検定し、4 匹は day8 にて安楽死の上、舌を剖出した。
- (B) Kaplan-Meier を示す。n=8, log-rank test $p=0.30$
- (C) 体重変化を示す。●は死亡前日を含むことを示す。
- (D) 舌腫瘍部位の HE 染色での病理組織像を示す。拡大率 x4 ; スケールバー, 1mm、x40 ; スケールバー, 100 μ m

図 9. Sphere 形成能および放射線・化学療法抵抗性の比較

- (A) 検討 4 日目の Sphere 形成の一例をそれぞれ示す。スケールバーは 100 μ m。3 回施行し平均値をバークラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。* $p < 0.05$
- (B) 検討 7 日目の Sphere 形成の一例をそれぞれ示す。スケールバーは 100 μ m。3 回施行し平均値をバークラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。* $p < 0.05$
- (C) γ 線照射後のアポトーシス関連タンパクの Western blotting を示す。 α -tubulin はローディングコントロールとして、各レーンにアプライした総タンパク質量(50 μ g 相当をアプライ)が揃っていることを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。
- (D) CDDP 投与後のアポトーシス関連タンパクの Western blotting を示す。 α -tubulin はローディングコントロールとして、各レーンにアプライした総タンパク質量(50 μ g 相当をアプライ)が揃っていることを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。
- (E) 5FU 投与後のアポトーシス関連タンパクの Western blotting を示す。 α -tubulin はローディングコントロールとして、各レーンにアプライした総タンパク質量(50 μ g 相当をアプライ)が揃っていることを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。

図 10. SLUG pT208^{T209} 抗体の作成

- (A) Slug の構造を示す。薄い灰色のボックスは SNAG ドメイン、濃い灰色のボックスは SLUG ドメイン、白いボックスは zinc finger モチーフを示す。LATS1/2 のコンセンサス配列やリン酸化領域はヒトでは T182 および T208、マウスでは T183 および T209 であり、アミノ酸配列を下線で示す。
- (B) [γ -³²P]で標識した ATP の存在下で、GST 融合マウス Slug-WT (野生型)、-all-A (T183A および T209A)、-T183A および -T209A を基質として用いた *in vitro* LATS1/2 キナーゼアッセイを示す。SimplyBlue 染色にてタンパクを明視化した。
- (C) [γ -³²P]で標識した ATP の非存在下で、GST 融合マウス Slug-WT (野生型)、-all-A (T183A および T209A)、-T183A および -T209A を基質として用いた *in vitro* LATS1/2 キナーゼアッセイを示す。また、MmSlug pT209 を認識する抗体を用いた Western blotting の結果を示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。
- (D) 抗 SLUG pT208 抗体によるドットブロットアッセイを示す。リン酸化した T208 および非リン酸化ペプチドを含む抗原ペプチドを PVDF 上にスポットした、10、100、500 ng のペプチドを用いた。
- (E) SLUG pT208 抗体のホスファターゼアッセイを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。
- (F) SLUG pT208 抗体のペプチドコンペティションを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。

図 11. SLUG pT208 の作用

- (A) EMT および MET 時の SLUG、SNAIL および各リン酸化についての Western blotting の結果を示す。 α -tubulin はローディングコントロールとして、各レーンにアプライした総タンパク質量(50 μ g 相当をアプライ)が揃っていることを示す。+または-にて TGF- β 1(10 ng/ml)投与の有無を示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。
- (B) 図 11-A のデータを ImageJ プログラムにて数値化したものを示す。 α -tubulin での差異を反映している。
- (C) 図 11-A のデータを ImageJ プログラムにて数値化したものを示す。 α -tubulin での差異を反映している。
- (D) SAS の核画分施行時での LATS2 ノックダウンによる SLUG の安定性の変化についての Western blotting の結果を示す。 α -tubulin は細胞質タンパクのローディングコントロールとして、Lamin A/C は核タンパクのローディングコントロールとして、各レーンにアプラ

イした総タンパク質量(50 μ g 相当をアプライ)が揃っていることを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。

図 12. SLUG ノックダウン時の浸潤能、遊走能の変化

- (A) SAS、SAS- δ における SLUG ノックダウン時の Migration assay(assay total;72 時間 1.0 \times 10⁶cells/well)の結果の一例を示す。ネガティブコントロールとして siControl を使用した。スケールバー,200 μ m
- (B) Migration assay は 3 回施行し、各々5 視野を光学顕微鏡で撮影した。目視にて細胞をカウントし、平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。NS>0.05
- (C) SAS、SAS- δ における SLUG ノックダウン時の Invasion assay(assay total;72 時間 1.0 \times 10⁶cells/well)の結果の一例を示す。ネガティブコントロールとして siControl を使用した。スケールバー,200 μ m
- (D) Invasion assay は 3 回施行し、各々10 視野を光学顕微鏡 (Leica) で撮影した。目視にて細胞をカウントし、平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。
- ** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$**
- (E) 浸潤指数を示す。浸潤指数は (%浸潤試験細胞 / %浸潤コントロール細胞) で算出した。%浸潤は (平均浸潤細胞数 / 平均遊走細胞数) \times 100 で算出した。
- (F) SAS、SAS- δ においても Invasion および Migration assay 時のノックダウンを確認した Western blotting の結果を示す。 α -tubulin はローディングコントロールとして、各レーンにアプライした総タンパク質量(50 μ g 相当をアプライ)が揃っていることを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。

図 13. 患者組織での免疫染色の結果

患者の染色結果、TNM 分類、病理診断、YK 分類、5 年時点での初期治療術後 5 年の生存について示す。患者検体については病理診断を見て悪性度の高い症例、低い症例でグループ分けした中で無作為に抽出した。スケールバー,x4:1mm、x20:200 μ m、x40:100 μ m

図 14. 細胞の悪性化変異モデル

EMT および MET の経過による細胞の悪性化変異と、それに対する LATS2 の関わりを模式図で示す。

表 1. 使用した抗体の一覧

抗体名、販売元、カタログ番号、使用濃度、使用した図を示す。WB は Western blotting の略、IF は Immunofluorescence(蛍光免疫染色)の略、IHC は Immunohistochemistry(免疫組織化学染色)の略を示す。

補足図 1. eSAS の樹立方法、Sphere 形成率の比較

- (A) eSAS の樹立方法を示す。口腔扁平上皮癌細胞株 SAS を使用した。培養プレートは 100mm 径の低接着性プレート(EZ-BindShut II Cell Culture Products,Low-adhesion Surface)〈IWAKI〉を使用した。Sphere formation Medium として、DMEM および Ham's F-12(Kaighn's)Medium 〈Sigma-Aldrich〉を 1:1 で混合したものに、1%Penicillin-streptomycin mixed solution (Stabilized)、2%B27(x50) Supplement 〈Gibco〉、0.002%Epidermal Growth Factor human, recombinant expressed in *E.coli*(最終濃度 20ng/ml) 〈Sigma-Aldrich〉、0.08%Fibroblast Growth Factor-Basic human,recombinant expressed in *E.coli*(最終濃度 20ng/ml) 〈Sigma-Aldrich〉を添加し使用した。細胞はカウントスにて計測の後、 3.1×10^4 cells/100mm dish を播種した。非接着プレートにて 5-10 日間培養した Spheroid は、Spheroid Catch を通過させ、200 μ m の孔よりも大きな Sphere のみを選択的に回収した。その後 PBS(-)にて洗い、細胞離散液(accumax)〈Funakoshi〉にて Spheroid Catch から分離させた上で、Medium にて中和後、25G の注射針にてピペッティングし、Sphere をシングル細胞へ分解した。その後、同様のアッセイを 5 回繰り返し回収した細胞集団を通常培養することで、eSAS とした。
- (B) Sphere formation assay 検討 4 日目の Sphere の一例をそれぞれ示す。
- (C) 検討 4 日目のスケールバーは 100 μ m。3 回施行し平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。統計処理は Turkey-Kramer 法にて行った。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$
- (D) Sphere formation assay 検討 7 日目の Sphere の一例をそれぞれ示す。
- (E) 検討 7 日目のスケールバーは 100 μ m。3 回施行し平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。統計処理は Turkey-Kramer 法にて行った。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

補足図 2.eSAS との比較

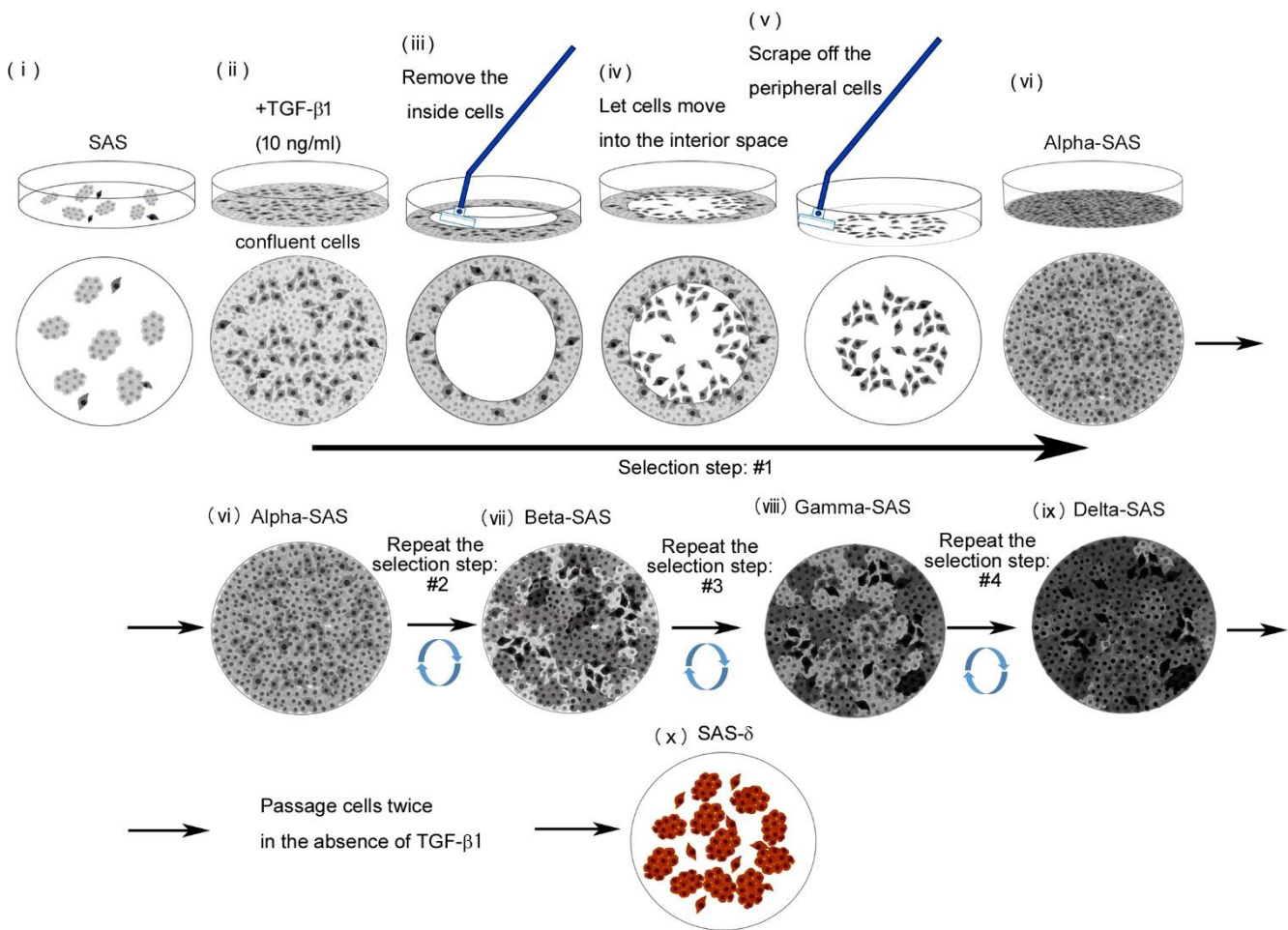
- (A) Growth curve を示す。検定は 3 回施行し、平均値をグラフ化した。標準偏差(SD)を棒線で示す。Turkey-Kramer 検定* $p < 0.05$
- (B) SAS、SAS-6、eSAS の Growth curve 描写時の細胞増殖形態の変化を示す。上記の数値は

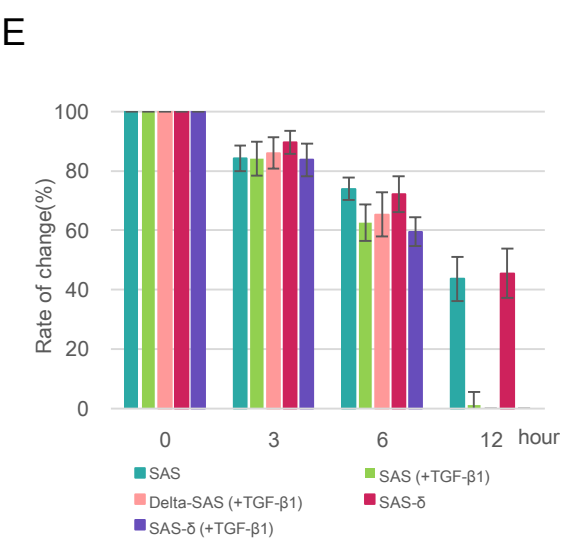
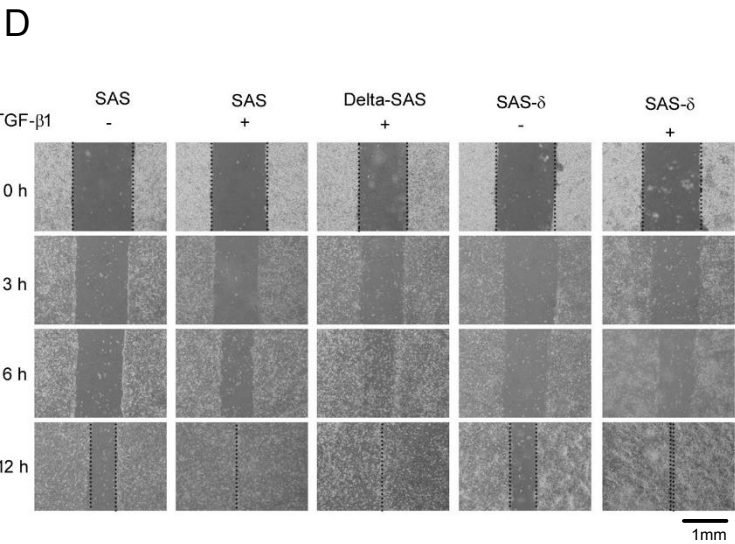
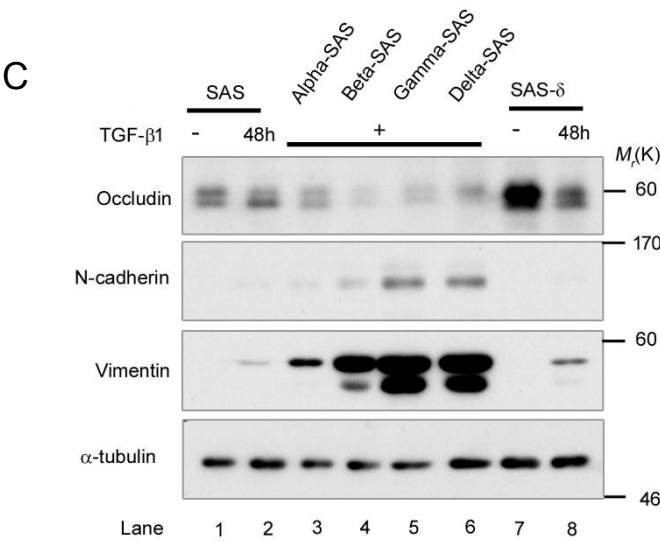
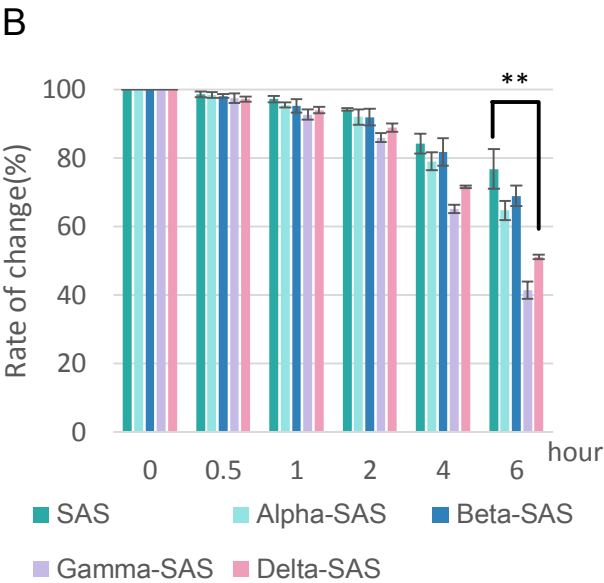
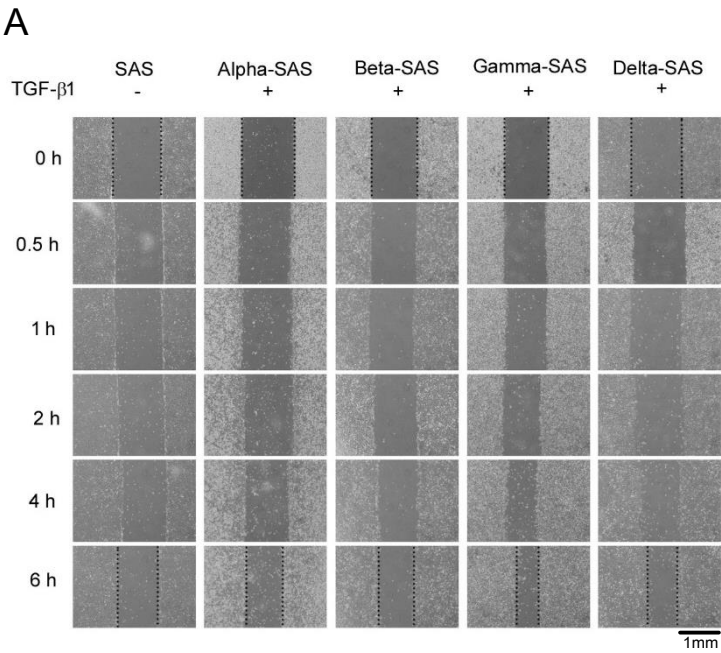
測定開始日を day 0 とし、day 6 まで記録、計測した。スケールバー,500 μ m

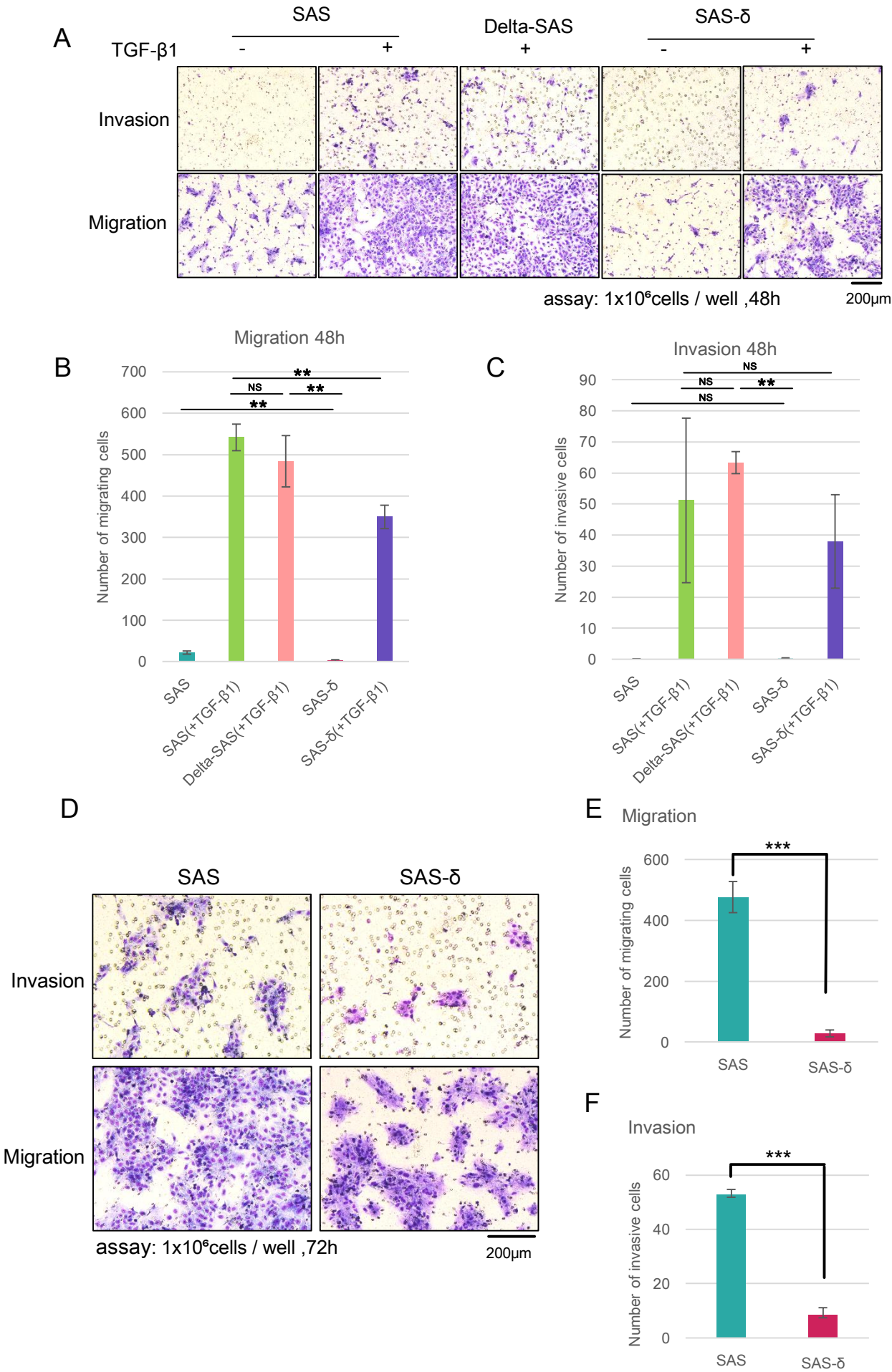
- (C) SAS、SAS- δ 、eSAS の wound healing assay。記録は wound 形成後 0、3、6、12 時間に行った。スケールバー,500 μ m
- (D) 補足図 2-C において各視野内で 5 点を wound と垂直に計測し、平均を求めることで各視野における遊走距離を求めた。計測はそれぞれ 3 回施行し、その平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。
- (E) SAS、SAS- δ 、eSAS における Invasion、Migration assay(assay total ; 72 時間、 1.0×10^6 cells/well)の結果の一例を示す。スケールバー,200 μ m
- (F) Invasion assay は 3 回施行し、各々 10 視野を光学顕微鏡〈Leica〉で撮影した。目視にて細胞をカウントし、平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。 ** $p < 0.01$
- (G) Migration assay は 3 回施行し、各々 5 視野を光学顕微鏡で撮影した。目視にて細胞をカウントし、平均値をバーグラフで示す。標準偏差(SD)を棒線で示す。 ** $p < 0.01$
- (H) マウス舌腫瘍モデルにおいての Kaplan-Meier を示す。n=8, log-rank test $p=0.42$
- (I) 舌腫瘍部位の HE 染色での病理組織像を示す。x4 ; スケールバー,500 μ m、x10 ; スケールバー,100 μ m、x40 ; スケールバー,50 μ m

補足図 3. DNA マイクロアレイ

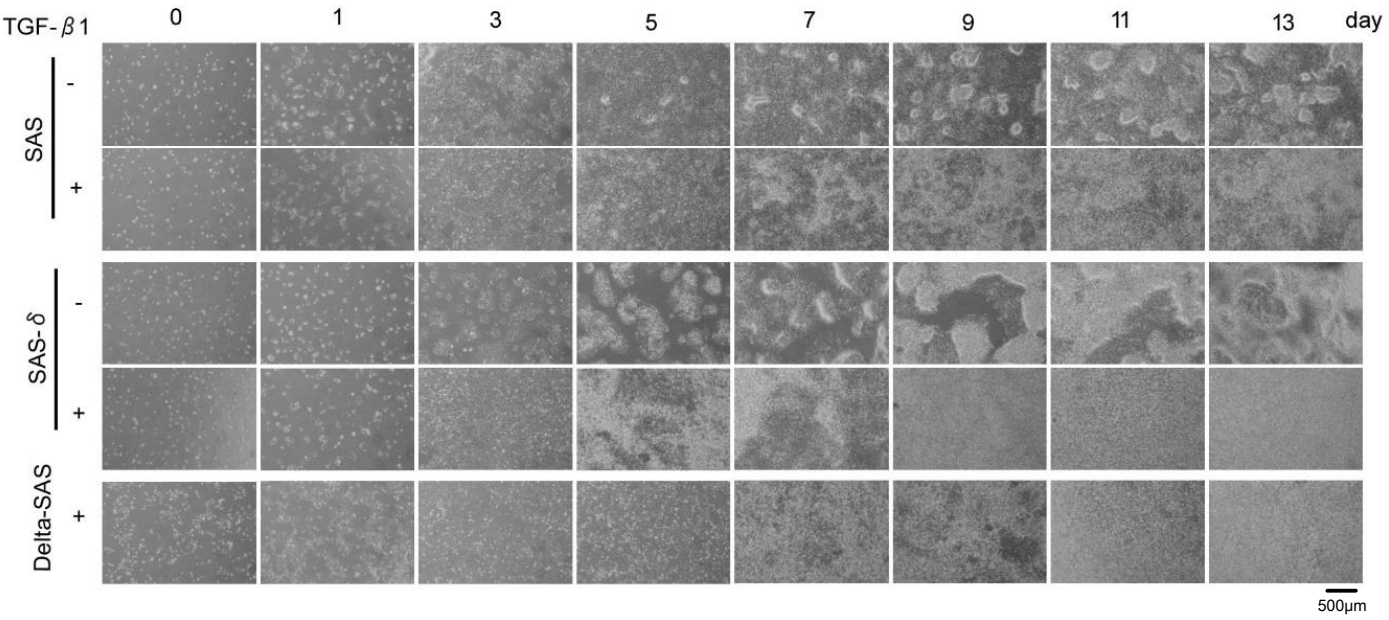
- (A) SAS と eSAS を比較したスキャッタープロットを示す。
- (B) SAS と SAS- δ を比較したスキャッタープロットを示す。
- (C) eSAS と SAS- δ を比較したスキャッタープロットを示す。



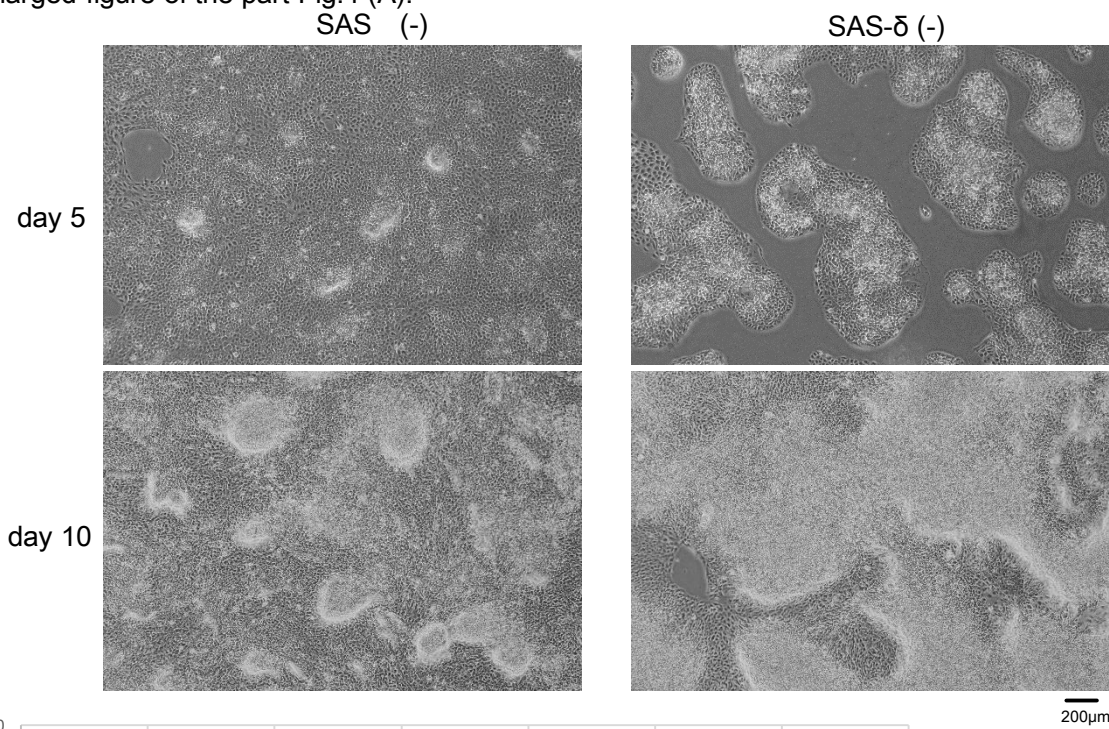




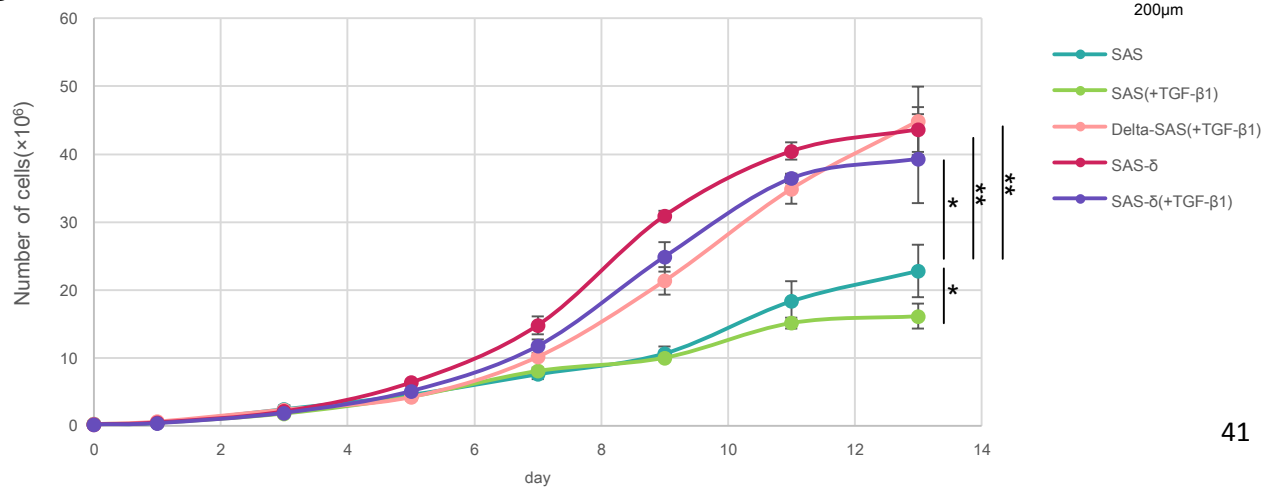
A



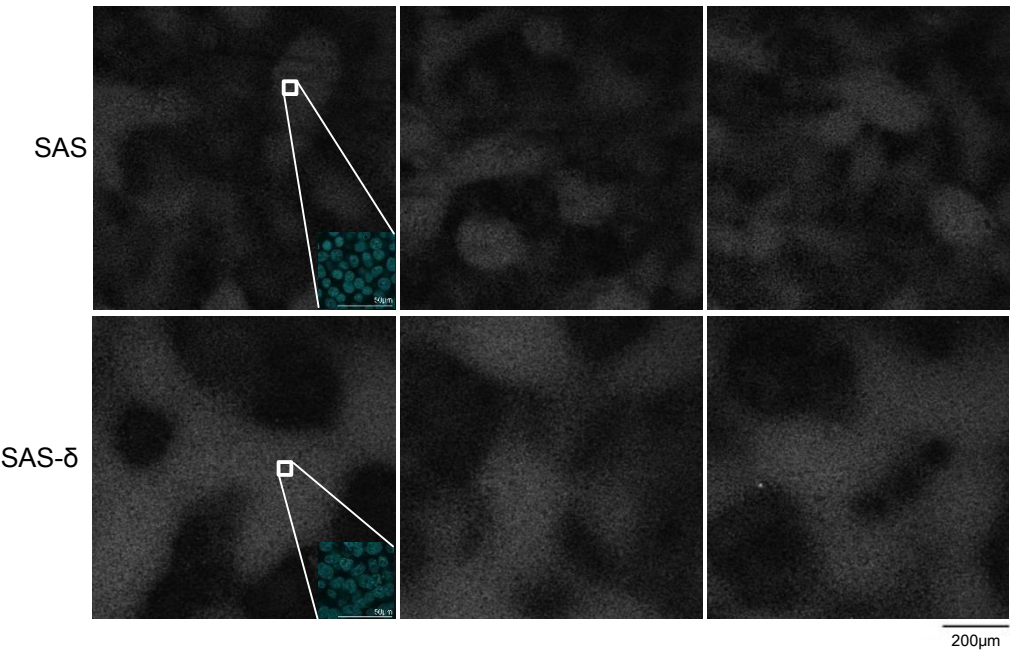
The enlarged figure of the part Fig.4 (A).



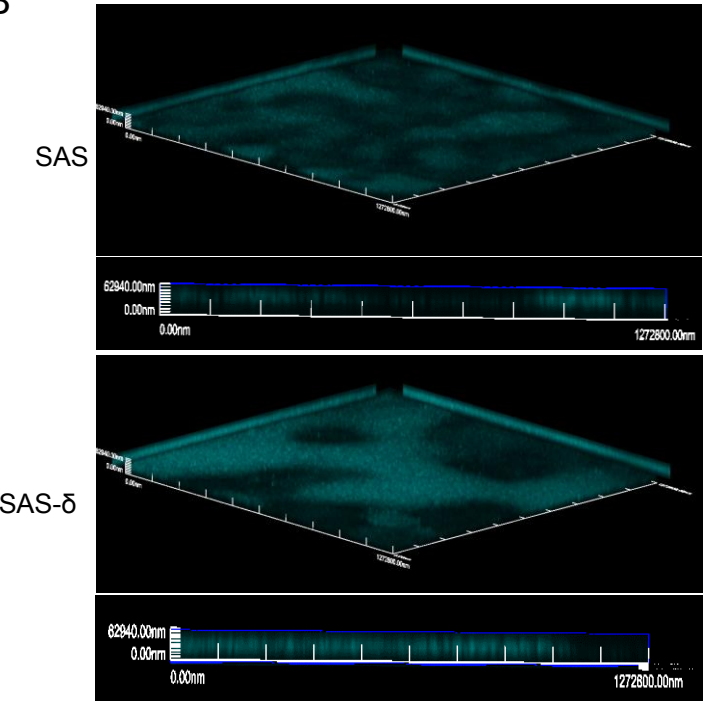
B



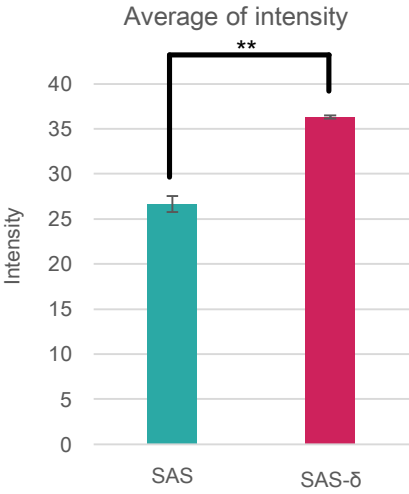
A



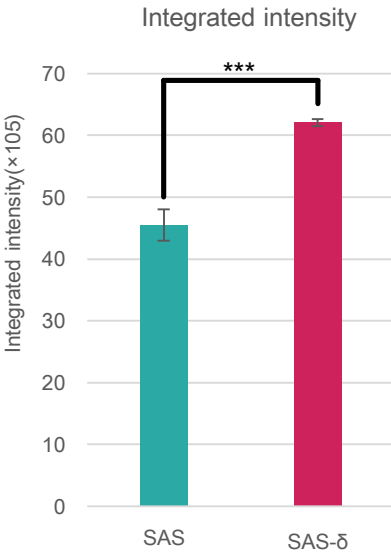
B



C



D



E

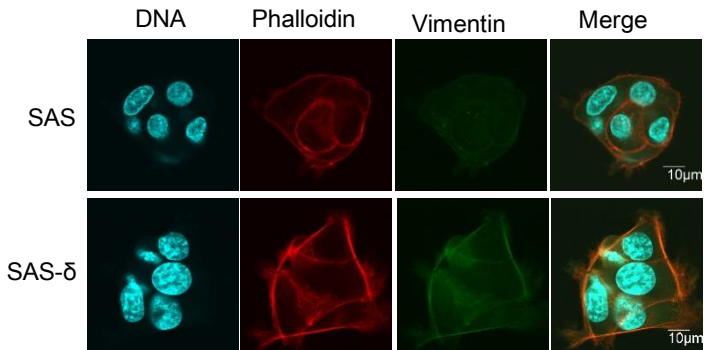
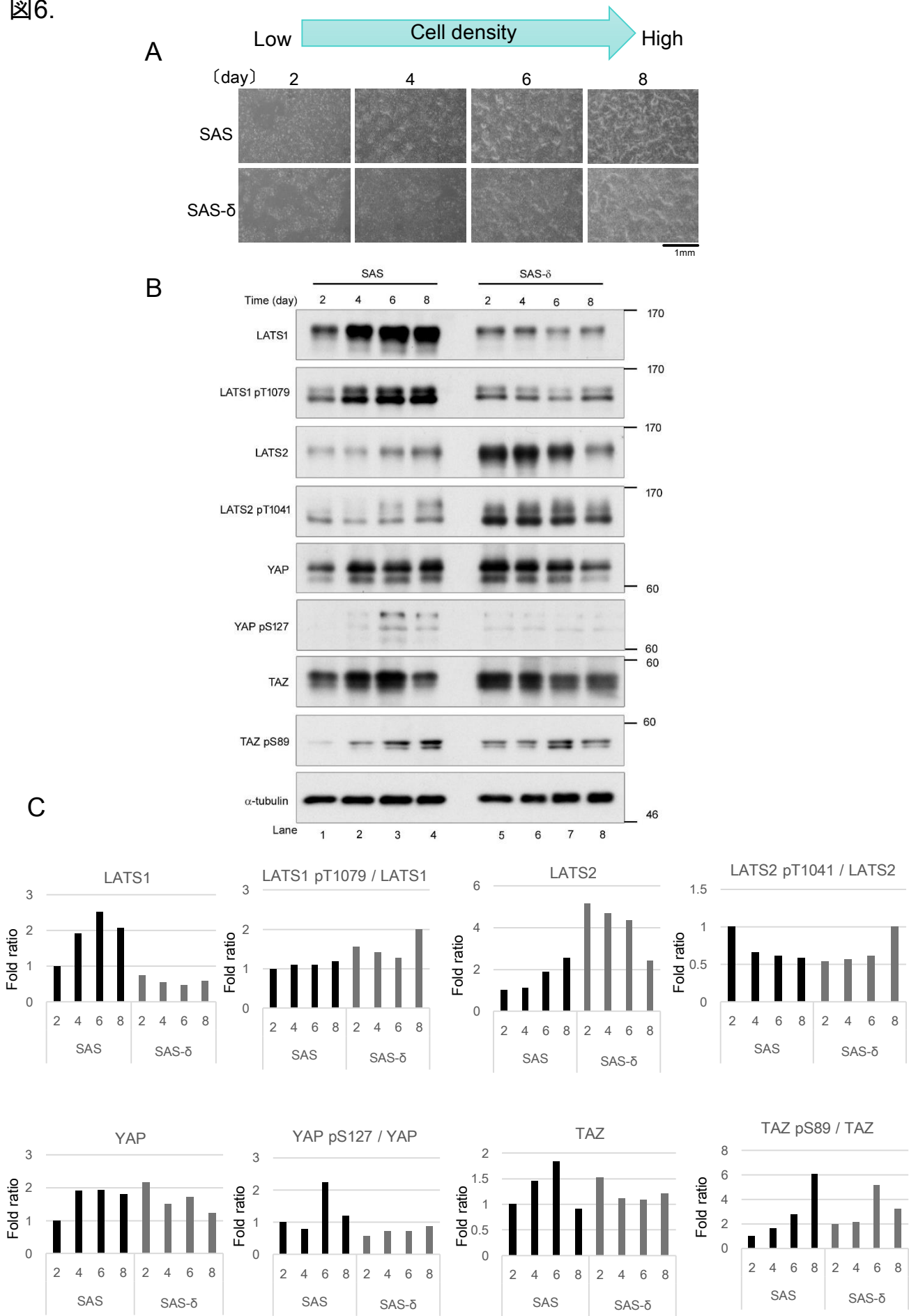
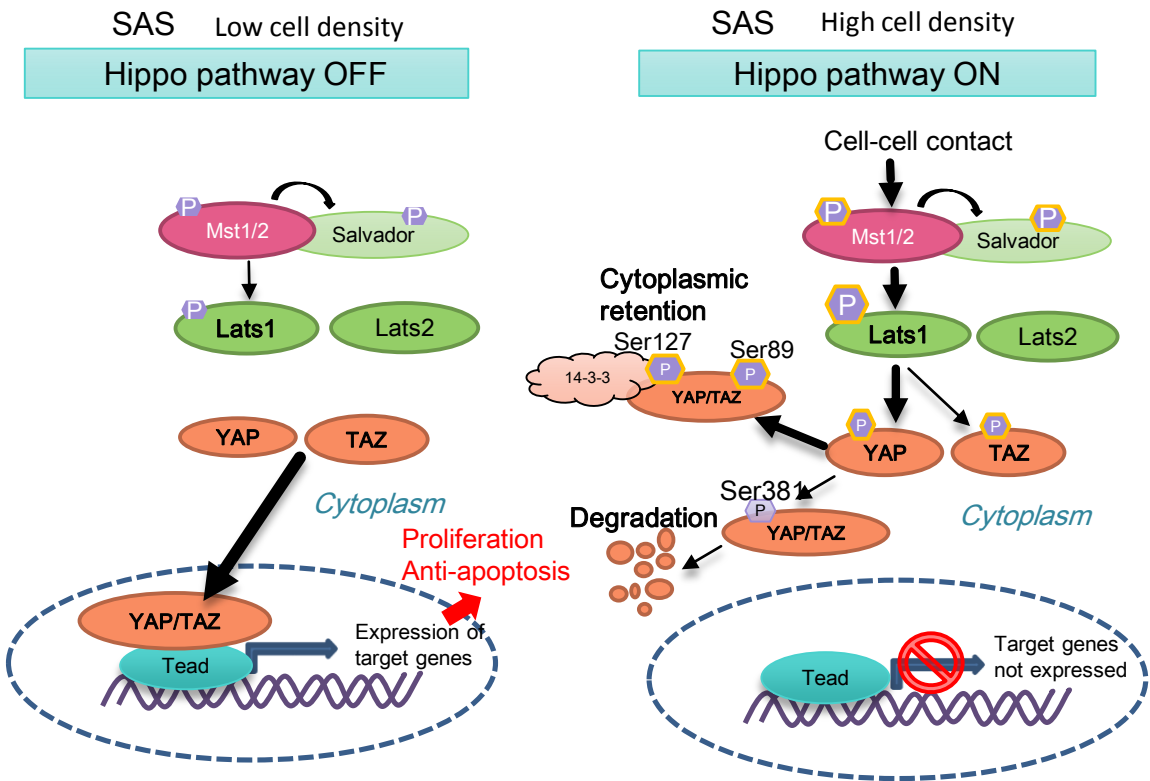


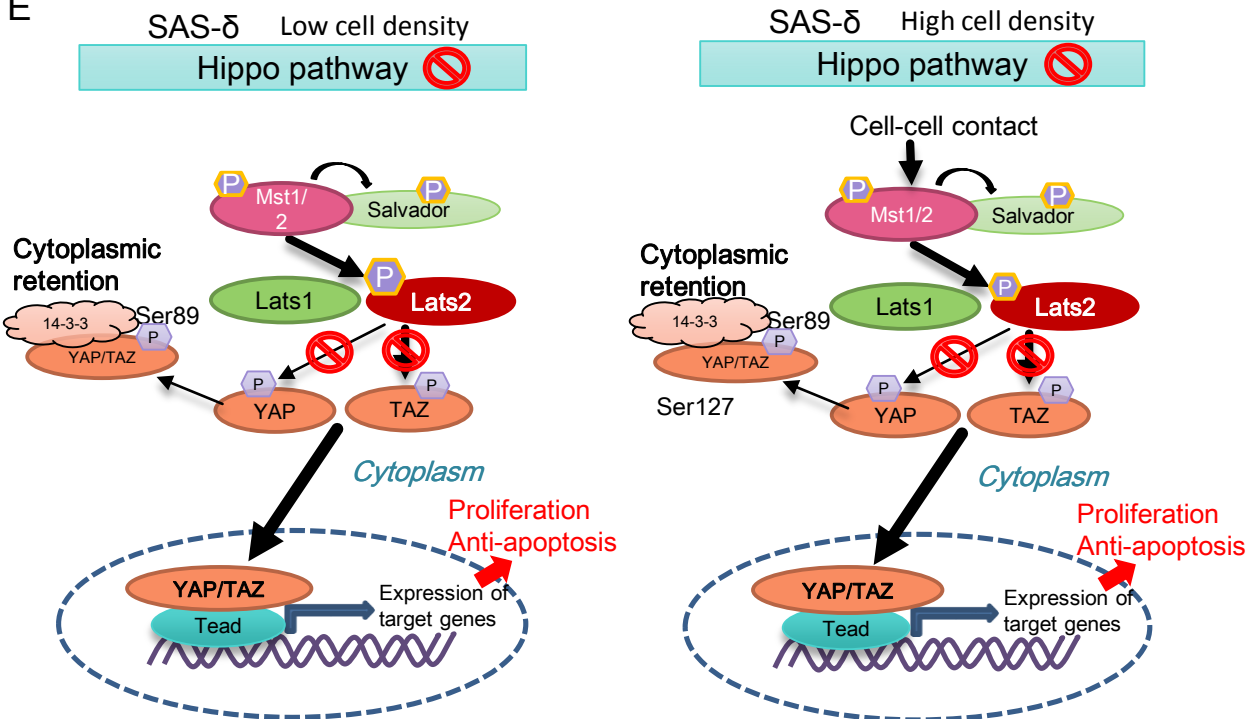
Figure 6.



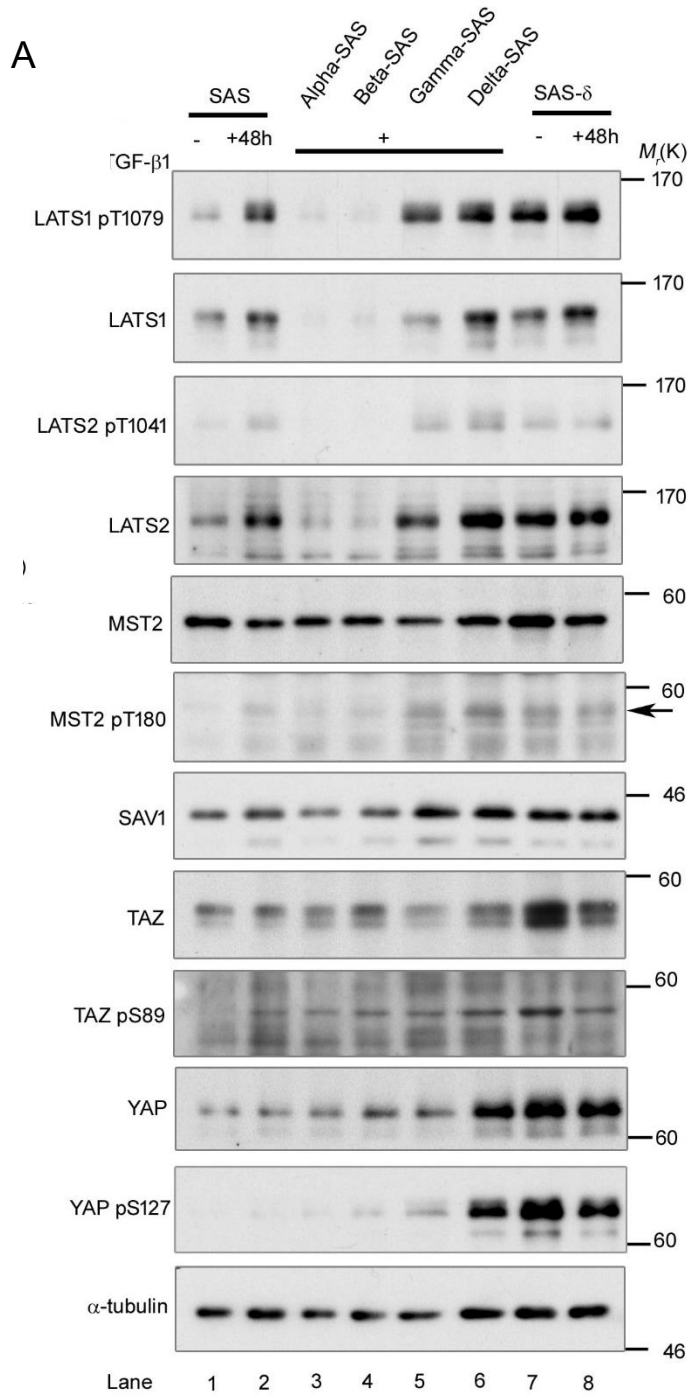
D



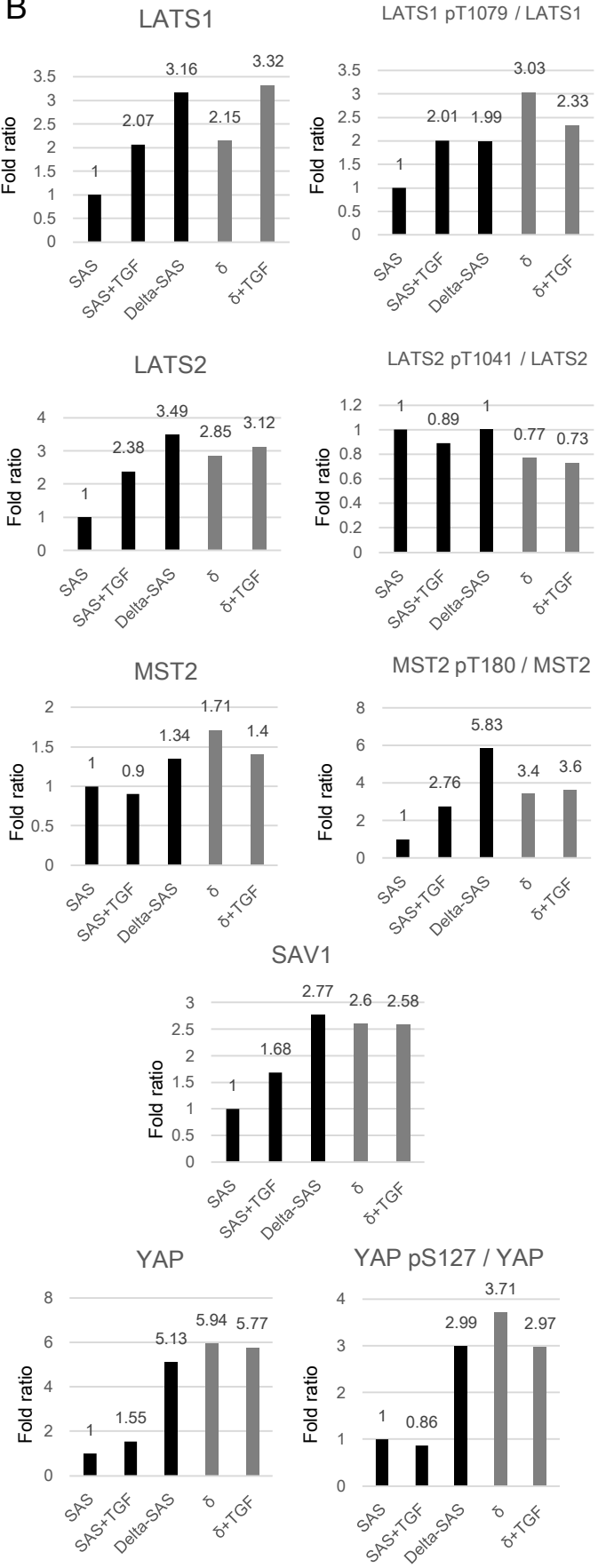
E

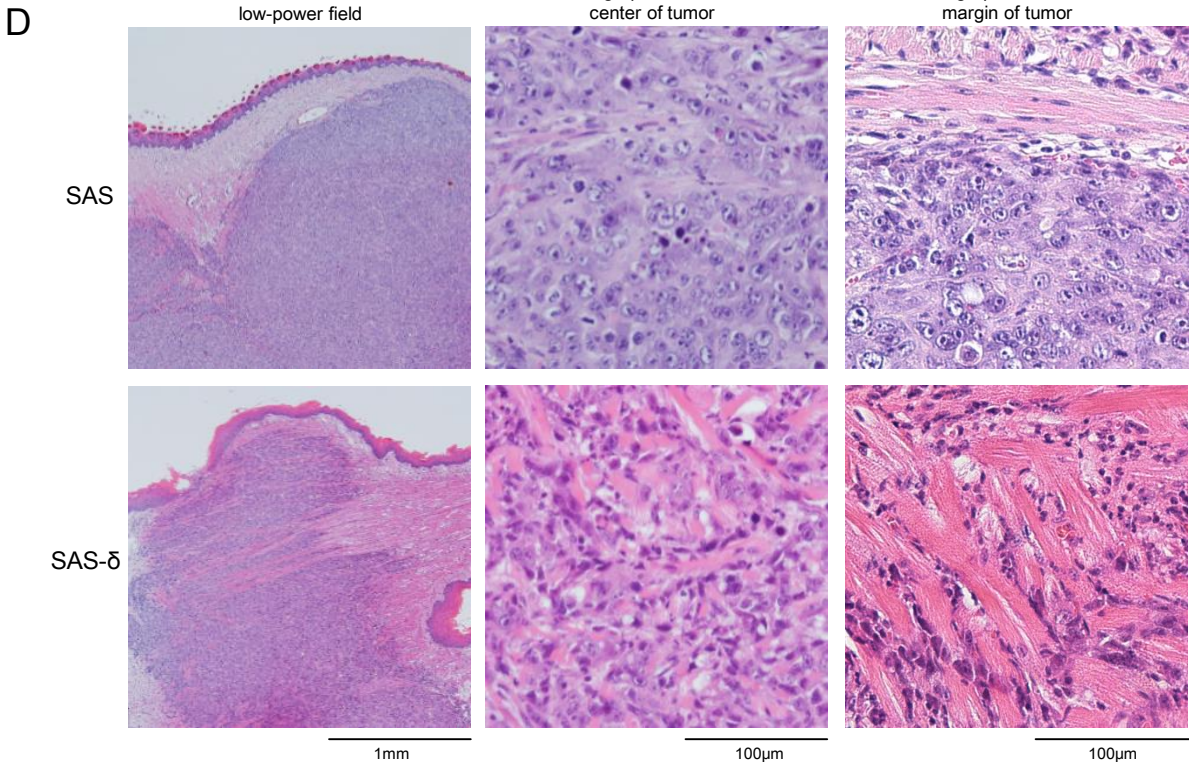
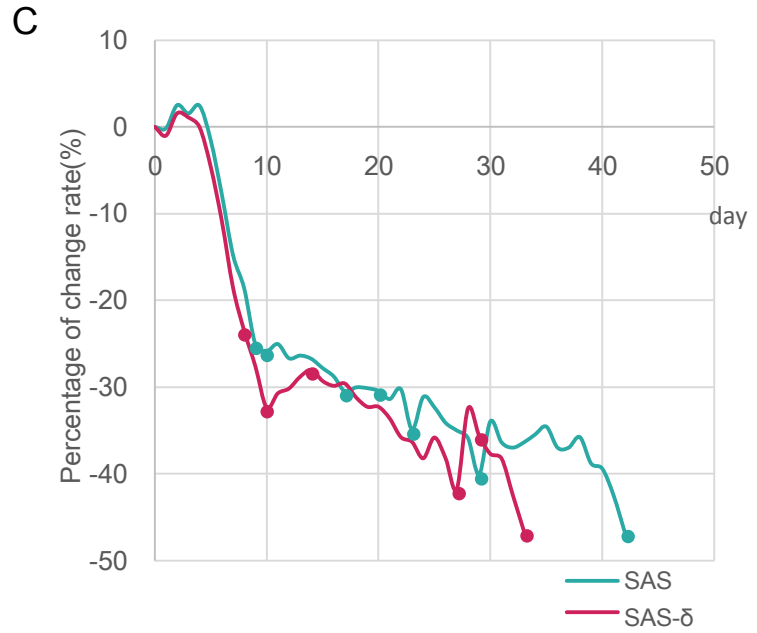
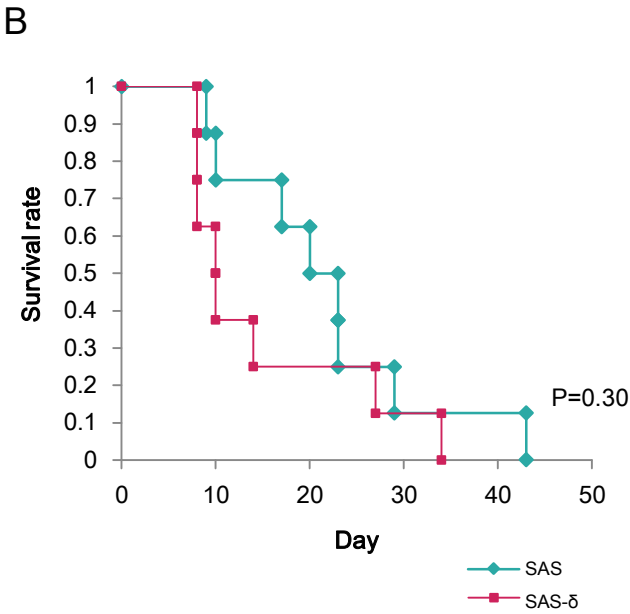
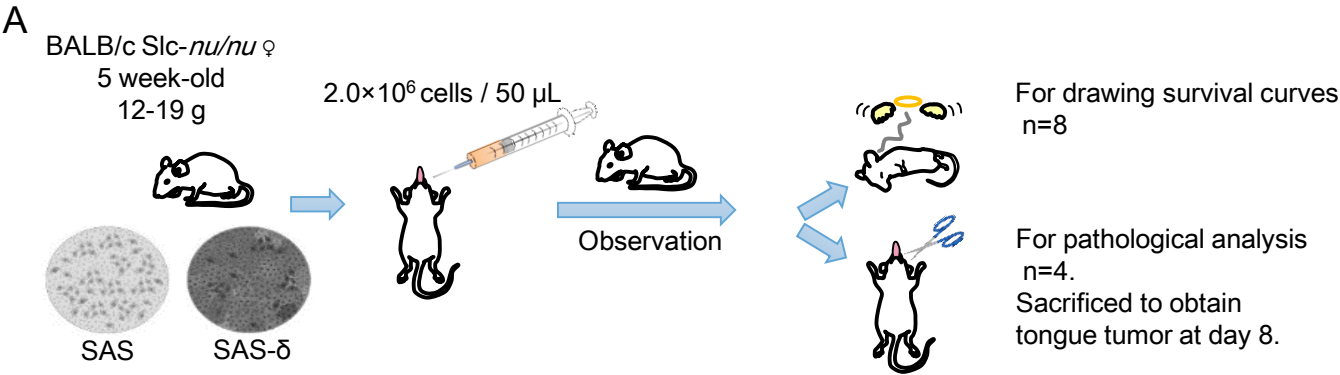


A

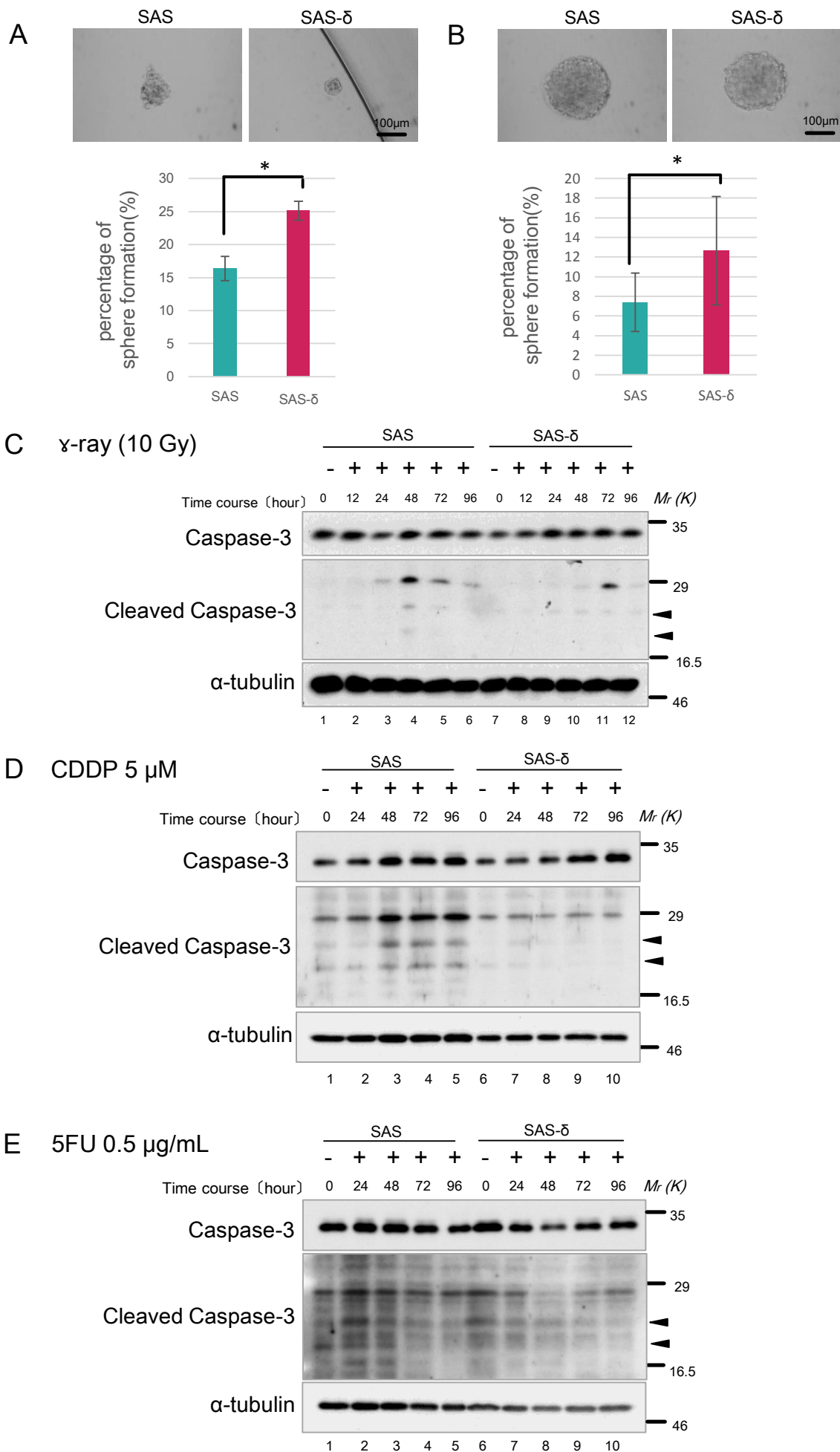


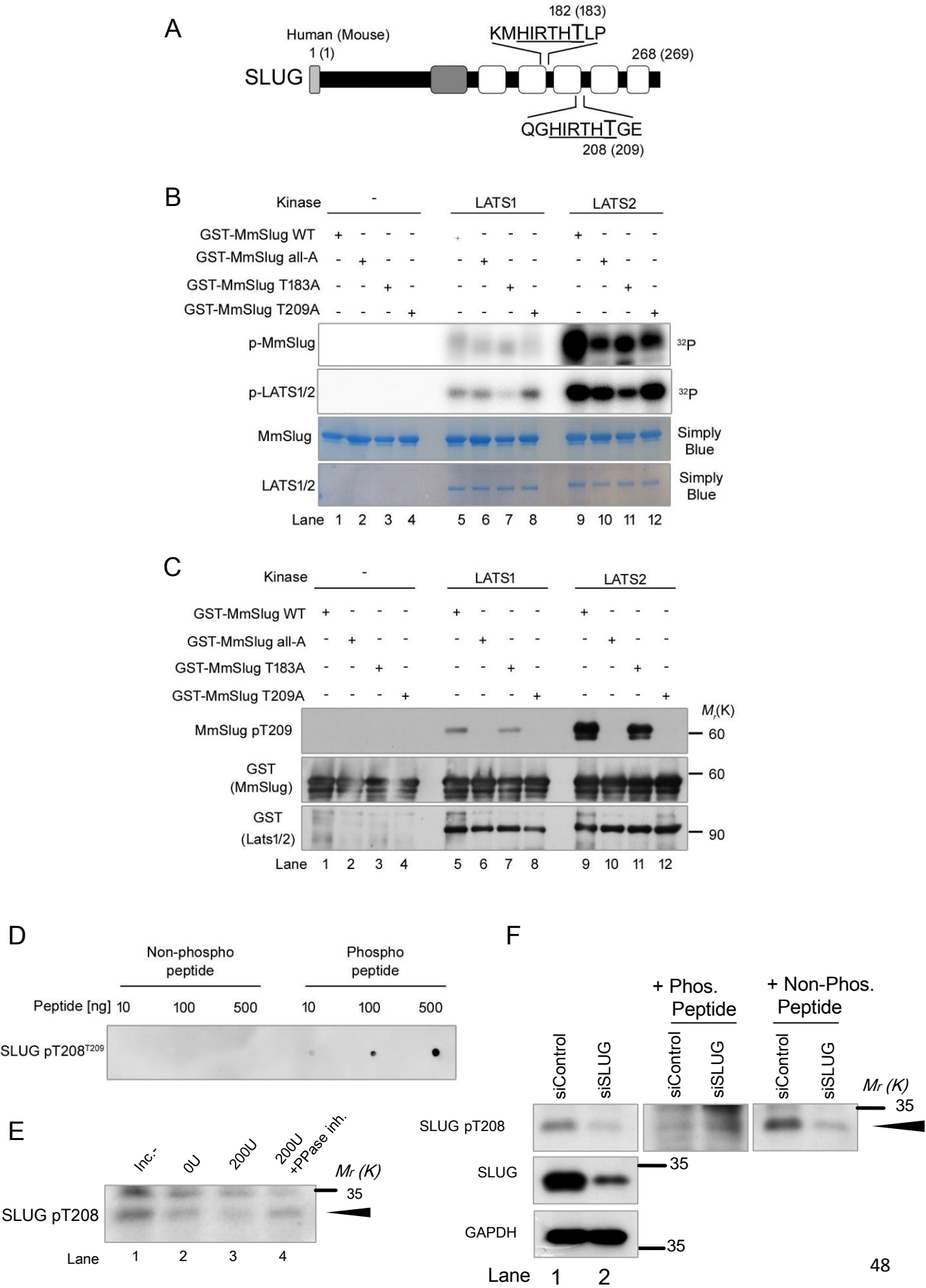
B



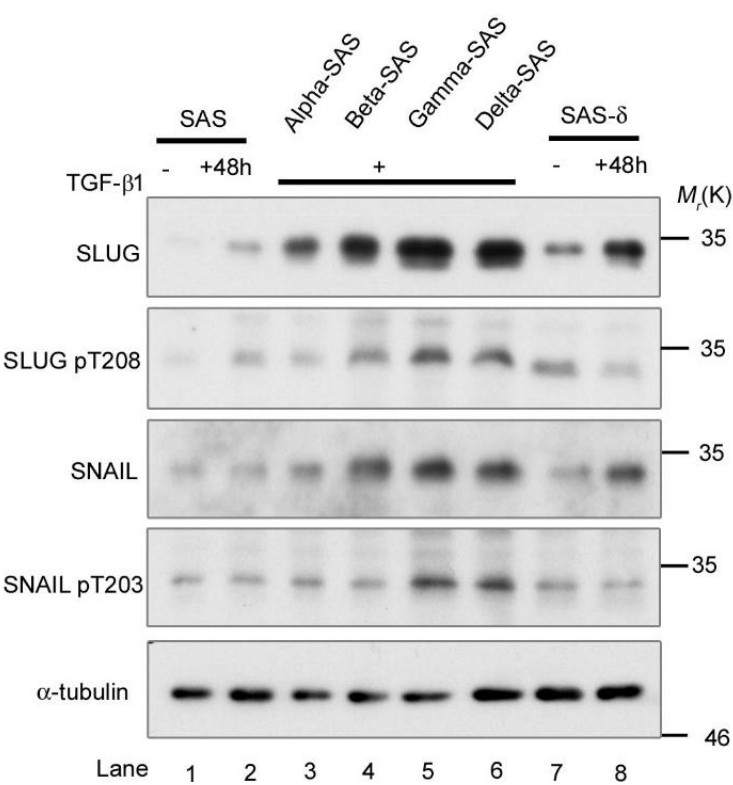


9.

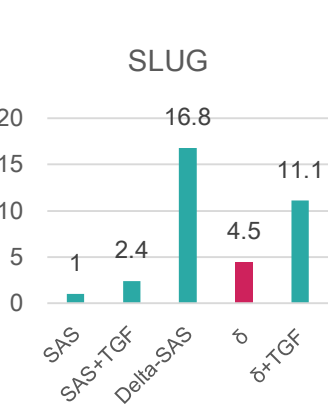




A



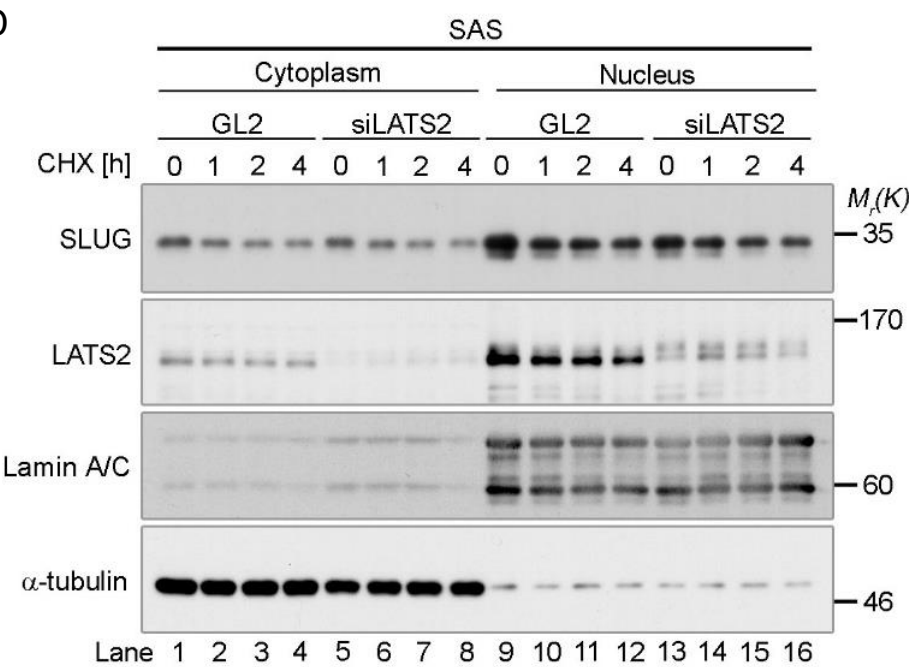
B

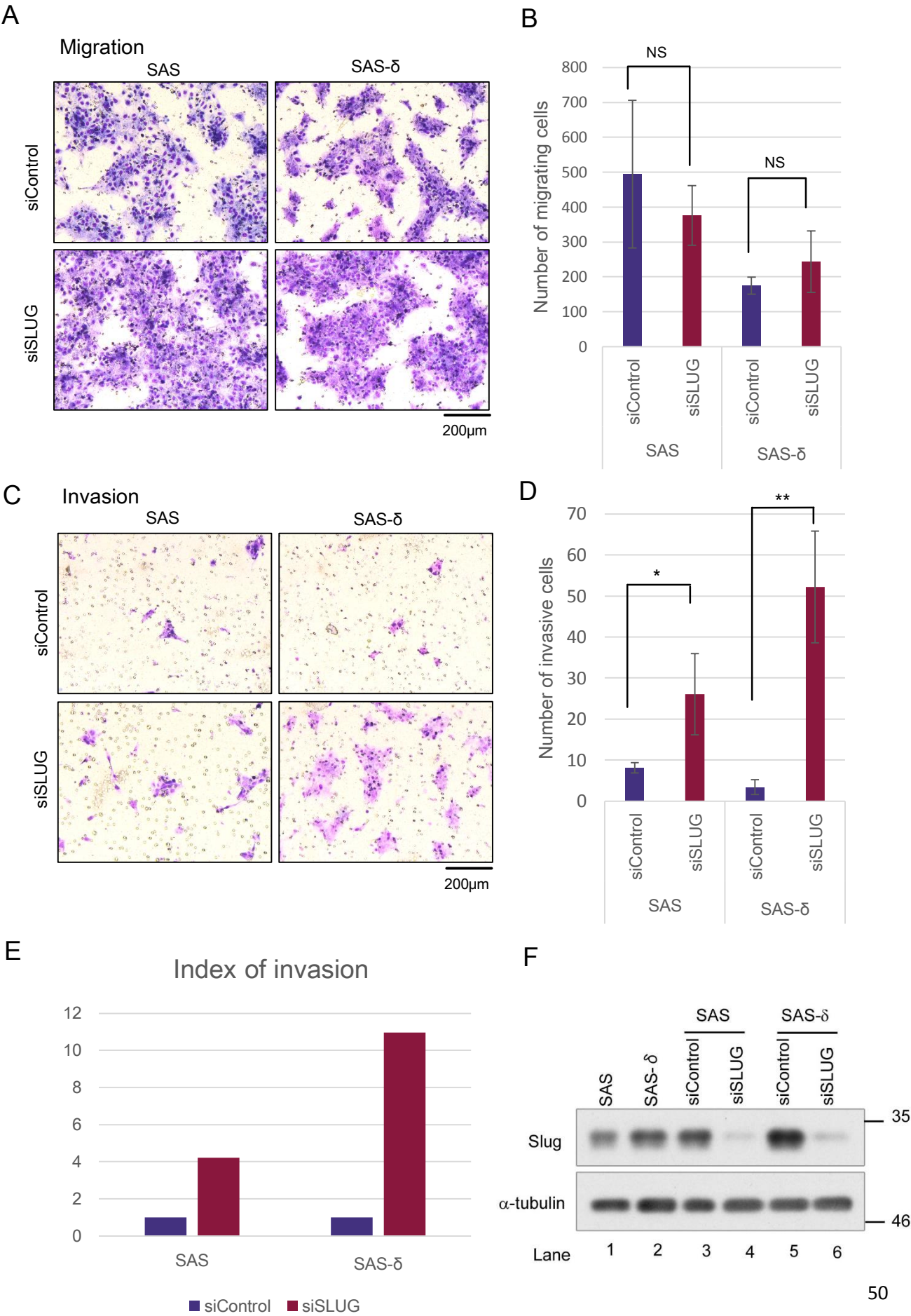


C



D





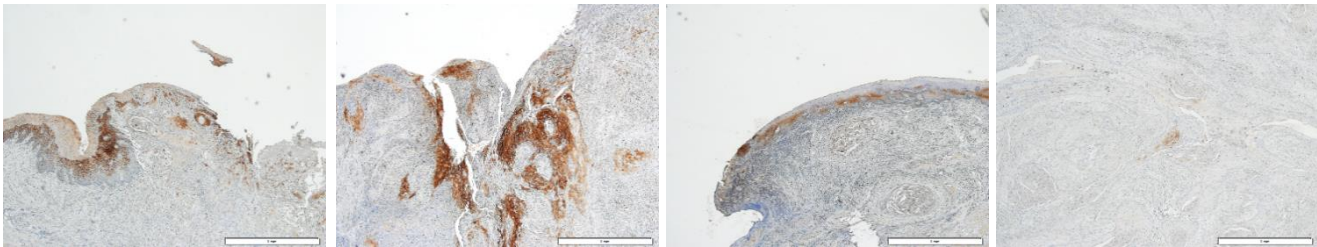
Kr. 1 T2N2bM0 stage4
Diag. moderate to poor
differentiated SCC
YK 4c
ft2N2cM0 stage4a
5y sterben

Kr. 2 T2N0M0 stage2
Diag. moderate to poor
differentiated SCC
YK 3
ft2N2cM0 stage4a
5y alive

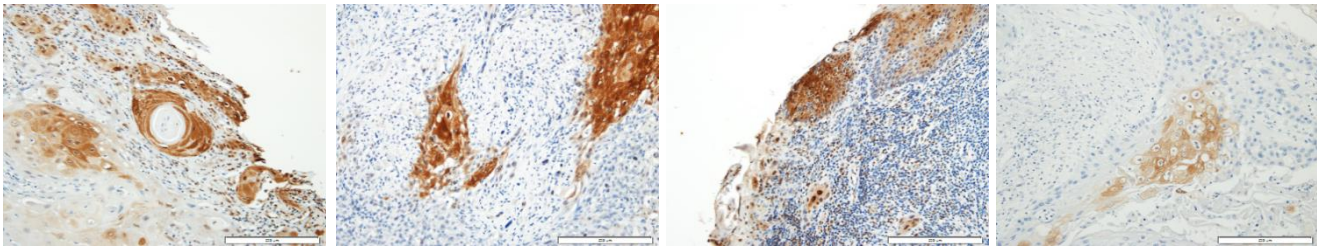
Kr. 3 T2N0M0 stage2
Diag. well to moderate
differentiated SCC
YK 3
ft2N0M0 stage2
5y alive

Kr. 4 T2N2cM0 stage4
Diag. well differentiated SCC
YK 3
ft4N2bM0 stage4a
5y alive

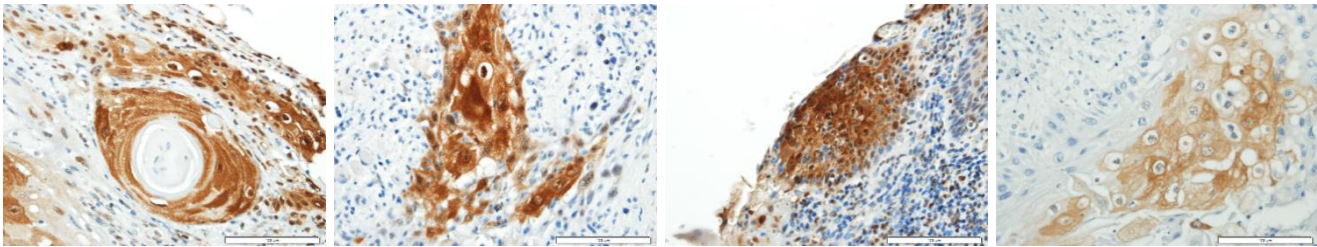
×4



×10



×40



Advanced Epithelial (aE) cell

- ・Hippo pathwayの破綻による足場非依存的な増殖能
- ・高いSphere形成能
- ・放射線、化学療法抵抗性を獲得した細胞集団

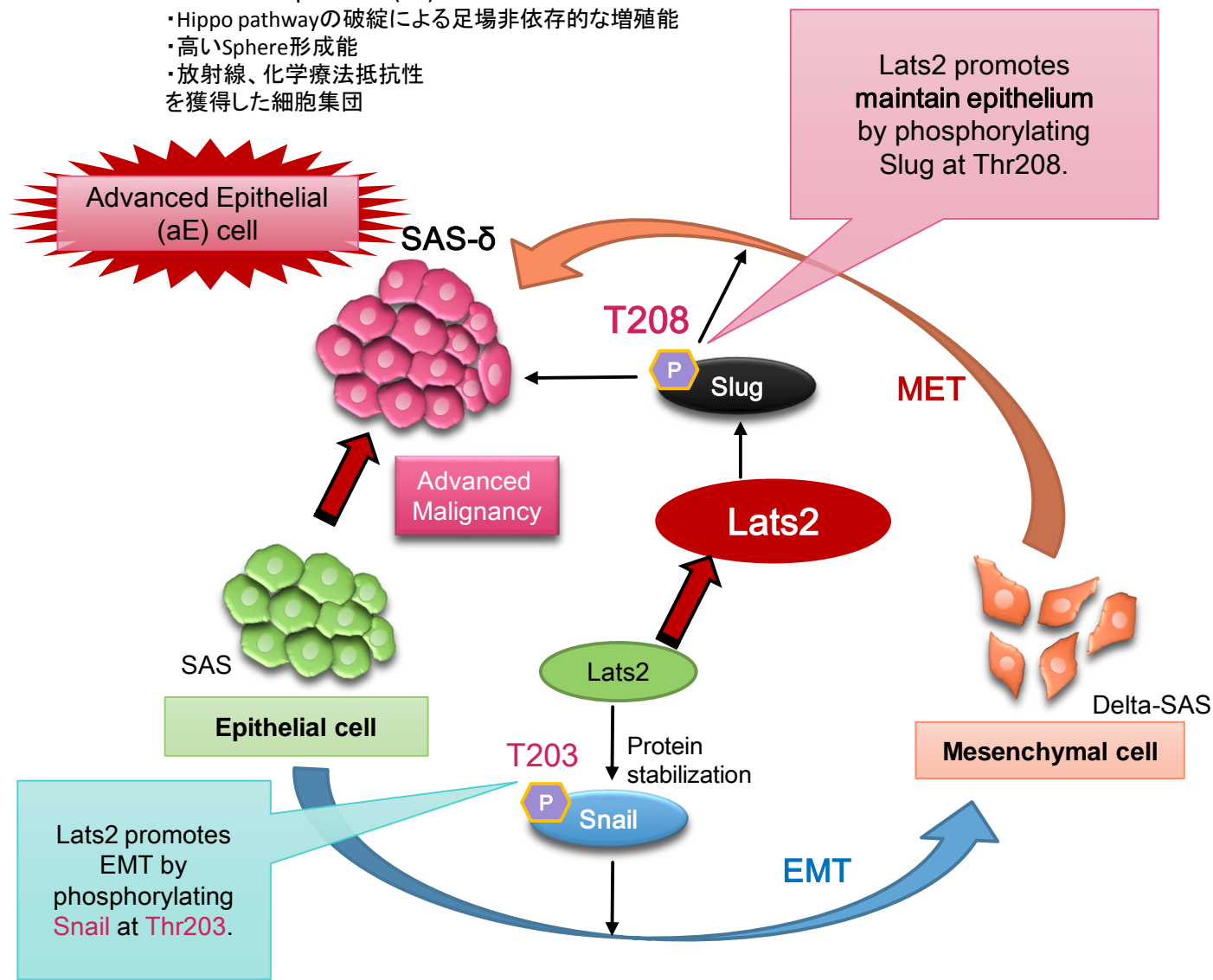
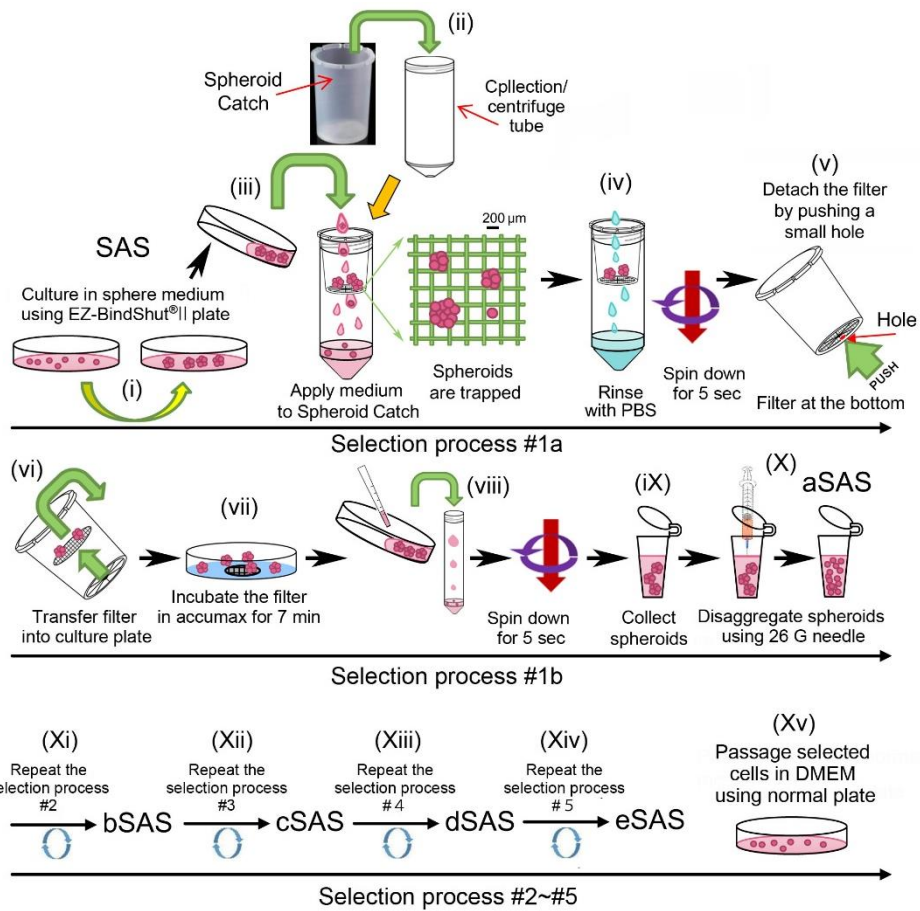


表1.

Antibody name	Distribution source	Catalog number	concentration	figure
EMT関連抗体				
Anti-Occcludin(C-terminal) antibody produced in rabbit,Affinity Isolated Antibody	SIGMA	SAB4200489	1:500(WB)	2-C
N-Cadherin Antibody	Cell Signaling	4061	1:250(WB)	2-C
Vimentin(D21H3) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling	5741	1:500(WB)	2-C
Hippo pathway 関連抗体				
LATS1(C66B5) Rabbit mAb	Cell Signaling	3477	1:500(WB)	6-B,7-A
PhosphoLATS1(Thr1079) (D53D3)Rabbit mAb	Cell Signaling	8654	1:100(WB)	6-B,7-A
LATS2 Antibody	BETHYL	A300-479A	1:500(WB)	6-B,7-A,10-D
aniti-pT1041-HsLats2 pAb	GeneScript	-	1:250(WB)	6-B,7-A
YAP Antibody	Cell Signaling	4912	1:500(WB)	6-B,7-A
Phospho-YAP(Ser127) Antibody	Cell Signaling	4911	1:500(WB)	6-B,7-A
Anti-WWTR1,antibody produced in rabbit,affinity isolated	SIGMA	HPA007415	1:200(WB)	6-B,7-A
p-TAZ(Ser89)-R:sc-17610-R	SANTA CRUZ		1:50(WB)	6-B,7-A
MST2 Antibody	Cell Signaling	3952	1:100(WB)	7-A
Phospho-MST1 (Thr183)/MST2 (Thr180) Antibody	Cell Signaling	3681	1:20(WB)	7-A
SAV1 (D6M6X) Rabbit mAb	Cell Signaling	13301	1:500(WB)	7-A
抗EMT調整因子抗体				
Slug(C19G7)Rabbit mAb	Cell Signaling	9585	1:500(WB)	10-G,11-A,D,12-F
Anti-Mm Slug pT209 pAb	GeneScript	-	1:100(WB) 1:20(IHC)	10-D,E,F,G, 11-A
Snail(L70G2)Mouse mAb	Cell Signaling	3895	1:500(WB)	11-A
Anti-Mm Snail pT203 pAb	GeneScript	-	1:100(WB)	11-A
アポトーシス関連抗体				
Caspase-3(8G10)Rabbit mAb	Cell Signaling	9665	1:500(WB)	9-C,D,E
Cleaved Caspase-3(Asp175)Antibody	Cell Signaling	9661	1:200(WB)	9-C,D,E
タンパク量コントロール使用抗体				
MONOCLONAL ANTI-α-TUBULIN	SIGMA	T5168	1:2000(WB)	2-C, 6-B,7-A, 11-A,D,12-F
Anti-GAPDH mAb	MBL	M171-3	1:1000(WB)	10-G
Lamin A/C(4C11)Mouse mAb	Cell Signaling	4777	1:2000(WB)	11-D
2nd抗体				
Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody	Cell Signaling	7074	1:1000(WB)	
Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody	Cell Signaling	7076	1:2000(WB)	
IF				
Phalloidin-Tetramethylrhodamine B is othiocyaminate-Phalloidin from Amanita Phalloides	SIGMA	P1951	1:800	5-E
Alexa 488 mouse	Invitrogen	A-11029	1:50	5-E
Alexa 495 rabbit	Invitrogen	A-11012	1:50	5-E
Hoechet33258			1:250	5-A,B,E

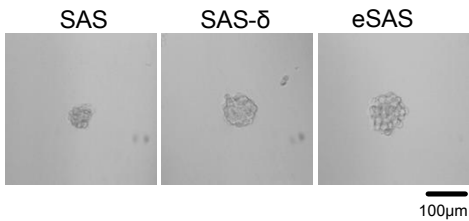
補足図1.

A



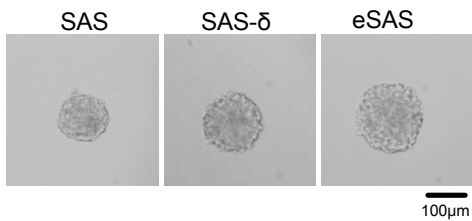
B

day4

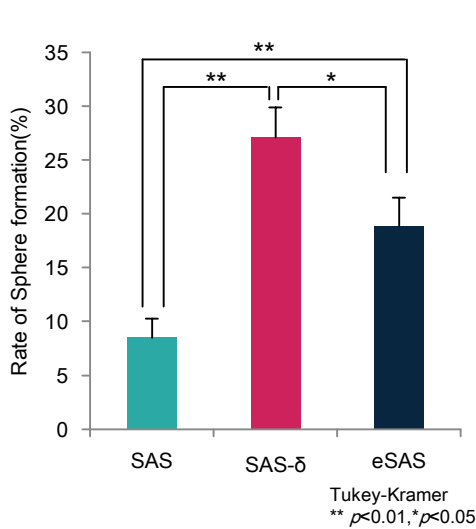


D

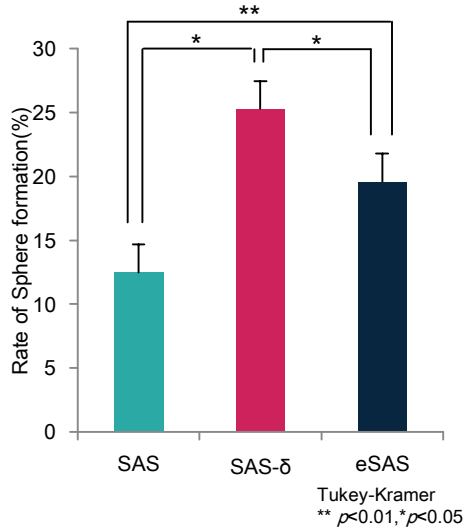
day7



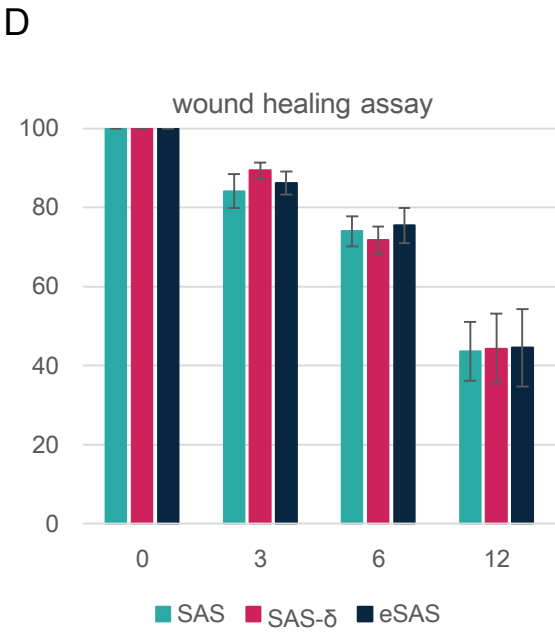
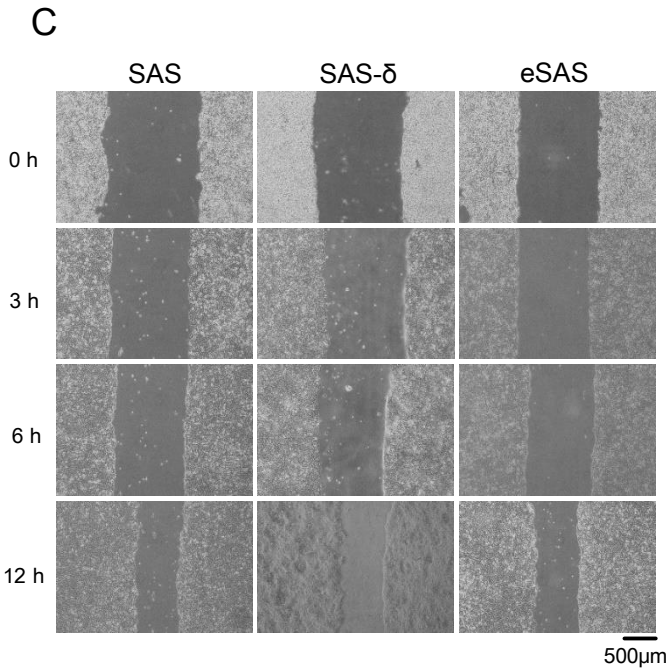
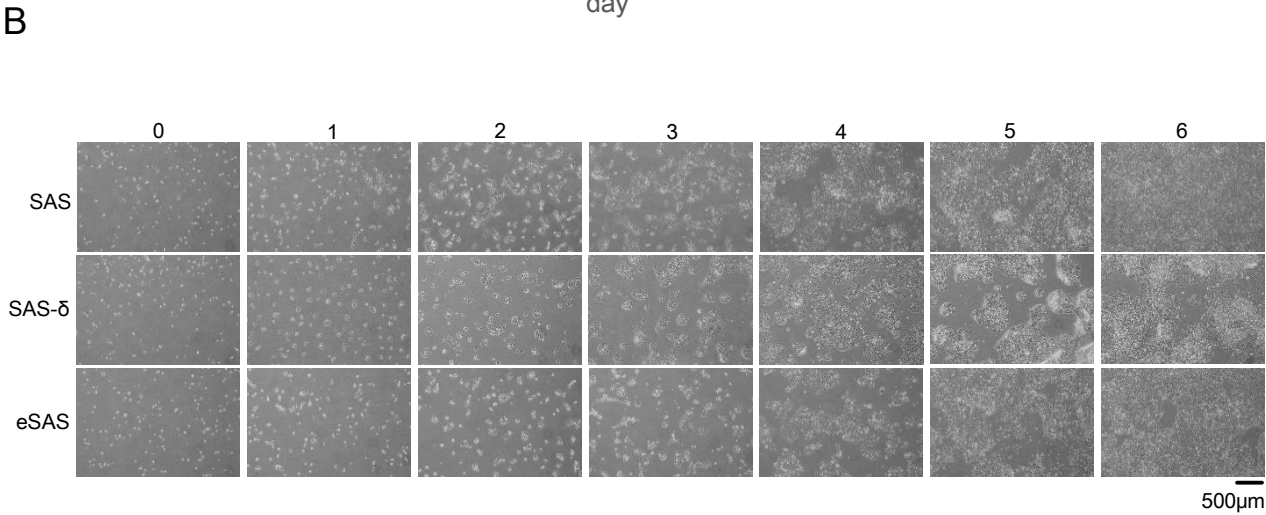
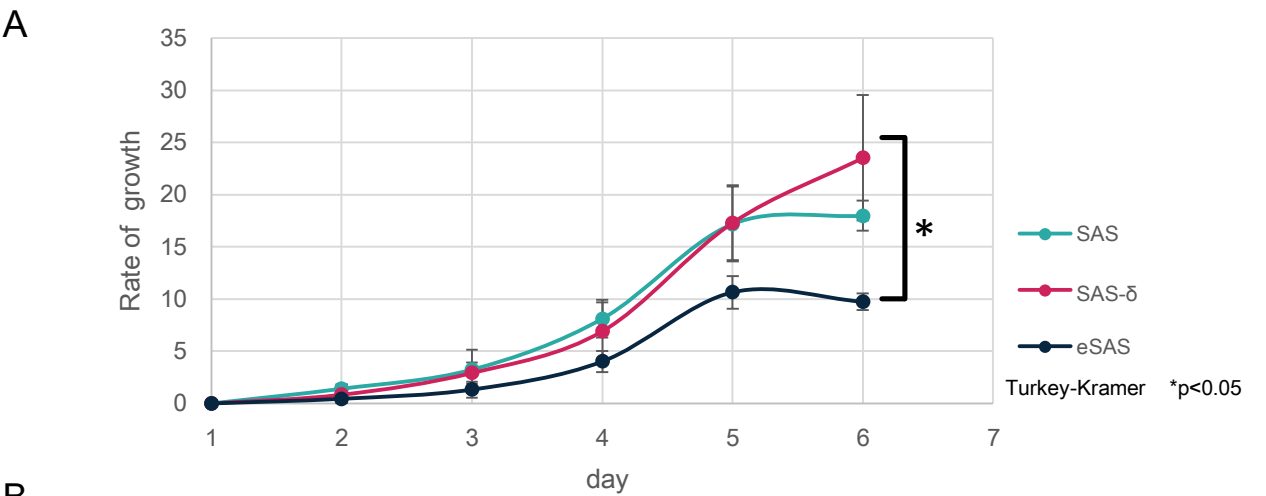
C



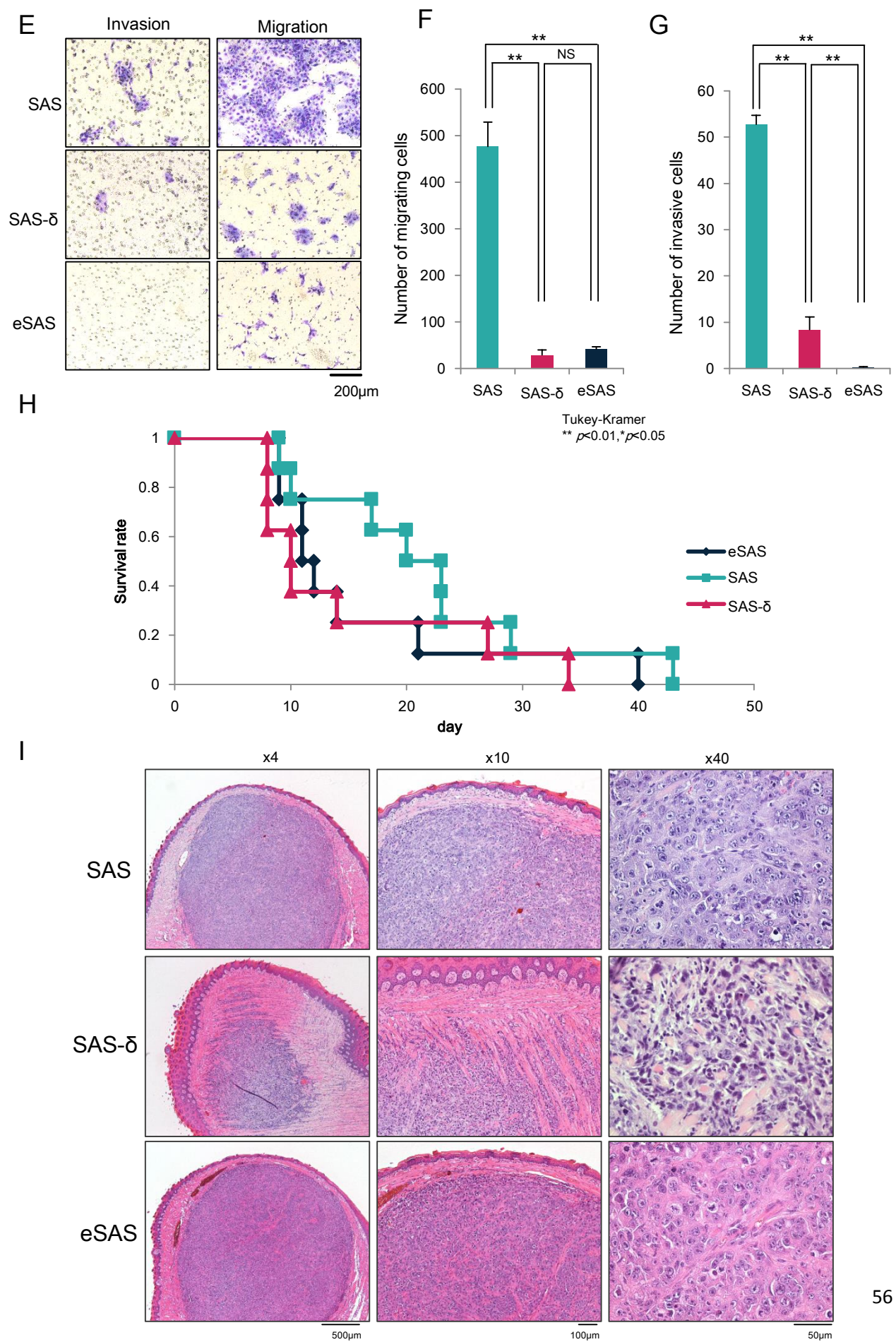
E



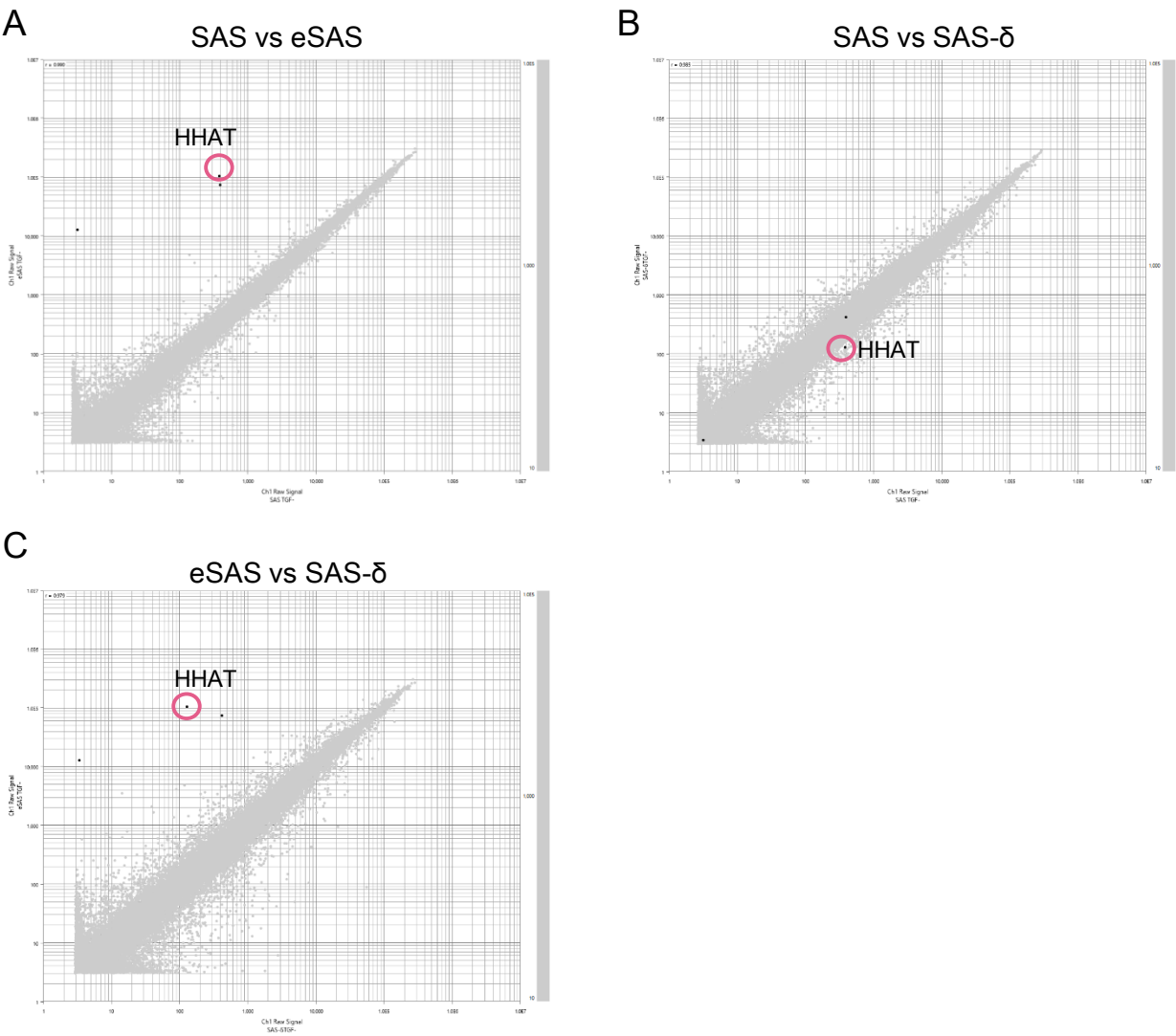
補足図2.



補足図2.



補足図3.



LATS kinases and SLUG regulate the transition to advanced stage in aggressive oral cancer cells

Emi Fujibayashi^{1, 2, a}, Norikazu Yabuta^{1, a, b}, Satomi Mukai^{1, 4}, Kosuke Torigata¹,
Yumi Ando¹, Toshihiro Uchihashi², Susumu Tanaka², Mikihiro Kogo²,
and Hiroshi Nojima¹

¹Department of Molecular Genetics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; ²First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dentistry, Osaka University, Suita, Osaka, Japan;

⁴Present address: Division of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute, 1-1 Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya City, Aichi 464-8681, Japan.

^aE. F. and N. Y. contributed equally to this work.

^bCorrespondence to N. Yabuta

Phone: +81-6-6875-3980, Fax: +81-6-6875-5192

E-mail: nyabuta@biken.osaka-u.ac.jp

Word count

Title: 15 words

Abstract: 176 words

Total character (including space, references, and figure legends but not supplementary data): 57,753 characters (methods section only: 7,862 characters)

Figures: 6; **Supplemental figures:** 3; **Supplementary Table:** 1

Abstract

The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a critical process by which cancer cells acquire malignant features, such as invasiveness and metastasis, in the primary tumor site. However, the molecular mechanism and functional implications of the EMT in tumor progression, as well those of the mesenchymal-to-epithelial transition (MET), a process with the opposite effect, remain elusive. In this study, we established two aggressive cancer cell lines, mesenchymal-like Delta-SAS and epithelial-like SAS- δ , from oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells. SAS- δ is a revertant cell obtained by inducing the MET in Delta-SAS. SAS- δ , but not Delta-SAS, exhibited abnormal cell growth, including piled-up overgrowth and invasive tumor formation in the tongues of nude mice, suggesting that SAS- δ represented more advanced cancer cells than the parental SAS cells. The EMT-related transcriptional factor SLUG is phosphorylated by the Hippo pathway kinases, large tumor suppressor 1 and 2 (LATS1/2), and depletion of SLUG promoted the invasive activity of SAS- δ . Our results suggest that LATS1/2 and SLUG regulate the transition of SAS cells to the advanced stage via repeated switching between the EMT and MET.

Keywords: EMT; MET; Hippo pathway; LATS; SLUG; oral cancer

Introduction

The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is an essential cellular program that converts epithelial cells to a mesenchymal-like phenotype by altering expression of transmembrane proteins, such as E-cadherin, and reorganizing cytoskeletal actin fibers (Tam and Weinberg, 2013; Lamouille et al., 2014; Nieto et al., 2016). The EMT is induced by multiple extracellular ligands, including members of the transforming growth factor- β (TGF- β) family. Following the EMT, epithelial cells such as carcinomas lose cell polarity and acquire motility and invasiveness. The apparent reverse of this process, the mesenchymal-to-epithelial transition (MET), is associated with re-epithelialization, which is involved in stem cell reprogramming and secondary (metastatic) tumor formation in distant sites (Kim et al., 2016). Notably, however, the MET is defined as an independent process, and is intrinsically different from a reverse EMT. Therefore, the cellular machinery switching or linking between the EMT and MET is important not only for early embryonic development and organ fibrosis, but also for tumor progression and metastasis. However, the molecular details of the EMT–MET correlation remain unclear.

The EMT is stringently regulated by the EMT transcription factors (EMT-TFs), including SNAIL (*SNAIL*), SLUG (*SNAIL2*), ZEB1/2, and TWIST, through coordination between repression of epithelial genes such as E-cadherin and induction of mesenchymal genes such as vimentin (Lamouille et al., 2014; Nieto et al., 2016). The transcriptional and post-translational regulations of the EMT-TFs are dependent on cell type and cellular context. For example, the SNAIL protein is exported from the nucleus following glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)- or protein kinase D1 (PKD1)-mediated phosphorylation, and then subsequently destabilized in the cytoplasm (Zhou et al., 2004; Du et al., 2010).

Meanwhile, destabilization of SLUG protein is promoted not only by GSK3 β -mediated phosphorylation but also by ubiquitin ligase MDM2-mediated ubiquitination or CDK2/cyclin E-mediated phosphorylation (Wang et al., 2009; Kim et al., 2012; Wang et al., 2015). Consequently, the destabilization of the EMT-TFs contributes to the suppression of the EMT and cell invasion. However, the functions of SLUG in the EMT and MET are poorly understood, whereas the role of SNAIL is comparably well characterized in the context of the EMT.

The Hippo pathway is a pivotal phosphorylation cascade that regulates tissue homeostasis and tumorigenesis by controlling cell proliferation and death in response to a diverse range of stimuli, including cell–cell contact, cell polarity, and mechanical features (Pan, 2010; Yu et al., 2015). Upon exposure of mammalian cells to such stimuli, the two core kinases, LATS1 and LATS2, are phosphorylated and activated by the two upstream kinases MST1 and MST2. This in turn promotes the phosphorylation of two transcriptional co-factors, YAP and TAZ (WWTR1), inhibiting their nuclear localization and stabilization and preventing their activation as oncogenes. The Hippo pathway is dysregulated in many human cancers, including liver, lung, colon, breast, kidney, and oral cancers; in these tumors, MST1/2 and/or LATS1/2 are inactivated, whereas YAP and/or TAZ are activated (Zhang et al., 2011; Hiemer et al., 2015; Plouffe et al., 2015; Zanconato et al., 2016). Recent reports also showed that the Hippo pathway is involved in cancer progression, especially the EMT and metastasis (Janse van Rensburg and Yang, 2016). For instance, the expression and/or nuclear localization of YAP and TAZ are elevated in secondary tumors at metastatic sites, in comparison to primary tumors (Bartucci et al., 2015; Yang et al., 2015). In a mouse xenograft model using OSCC cells, single knockdown of YAP or double knockdown of YAP and TAZ by shRNAs causes a

decrease in orthotopic tumorigenesis and metastasis (Hiemer et al., 2015). Consistent with this, downregulation of LATS in gastric cancer cells or MST in cervical cancer cells promotes metastasis *in vivo* (Qin et al., 2012; Zhang et al., 2016). Moreover, YAP and TAZ influence the expression patterns of EMT markers, such as E-cadherin and vimentin, as well as changes in cell morphology (Overholtzer et al., 2006; Lei et al., 2008). However, the molecular mechanism of EMT/MET regulation by LATS1 and LATS2 remains poorly understood, although it is clear that LATS2 directly phosphorylates SNAIL (Zhang et al., 2012) and interacts with SnoN, a proto-oncoprotein, to stabilize TAZ during the EMT (Zhu et al., 2016).

Human oral cancer constitutes approximately 40% of head and neck cancers, and the majority (approximately 90%) of these cancers are OSCC, a common malignant epithelial tumor (Lingen et al., 2008; Rivera, 2015). OSCC is frequently associated with local invasion, neck lymph node metastasis, and recurrence, and consequently has a poor prognosis. Therefore, elucidation of the molecular mechanisms underlying EMT/MET and metastasis in OSCC is important for the development of diagnostics and therapeutics. In this study, using an OSCC cell line SAS, we established a novel advanced cancer cell line, SAS- δ , by stepwise selection of cells with high motility in the presence of TGF- β 1 (hereafter, continuous induction of EMT) and by subsequent concentration of abnormal cells in the absence of TGF- β 1 (hereafter, induction of MET). We found that SAS- δ cells exhibited abnormal cell growth and aggressive malignancy, even though the cells exhibited some epithelial properties in the absence of TGF- β 1. Moreover, regulation of the Hippo pathway was perturbed in SAS- δ , and LATS1/2 phosphorylated SLUG, promoting the invasive potential of SAS- δ as advanced cancer cells, which we refer to as advanced epithelial (aE) cancer cells.

Results

Establishment of Delta-SAS, an OSCC cell line with higher motility in response to TGF- β 1

In OSCC, including SAS, TGF- β 1 is a potential inducer of the EMT, which promotes motility and invasiveness in these cell lines (Takayama et al., 2009). To establish a SAS-derived cell line with higher motility, we grew parental SAS cells to a confluent monolayer in a standard culture dish in the presence of 10 ng/ml TGF- β 1 (Figure 1A-i, -ii), and then removed the cells in the inner circle (~80% of the area) using a cell scraper (Figure 1A-iii). Next, after letting a portion of the cells in the peripheral region move into the open space (Figure 1A-iv), we scraped off the residual peripheral cells (Figure 1A-v). The cells in the interior were then allowed to grow to a confluent monolayer in media containing TGF- β 1; these cells, selected based on their motility, were named Alpha-SAS (Figure 1A-vi). By repeating this selection two, three, or four times, we established SAS-derived cell lines with higher motility, named Beta-SAS, Gamma-SAS, and Delta-SAS, respectively (Figure 1A-vii–ix). Wound healing assays in the presence of TGF- β 1 revealed that Delta-SAS and Gamma-SAS migrated toward the gap faster than parental SAS, Alpha-SAS, and Beta-SAS cells 4–6 hours after confluent monolayers were scratched, indicating that Delta-SAS had acquired higher motility than the parental line in response to TGF- β 1 (Figure 1B and 1C).

Delta-SAS cells are competent to induce the EMT upon treatment with TGF- β 1

To confirm that the EMT was induced by TGF- β 1 in Delta-SAS, we examined the expression levels of epithelial markers such as occludin (a tight junction protein), as well

as mesenchymal markers such as N-cadherin (a calcium-dependent transmembrane adhesion protein) and vimentin (an intermediate filament protein). To this end, we performed western blots in parental SAS cells and a series of SAS derivatives, including Alpha-, Beta-, Gamma-, and Delta-SAS, in the presence of TGF- β 1 (Figure 2A). In the presence of TGF- β 1, occludin levels were markedly reduced in Beta-, Gamma-, and Delta-SAS in comparison with the levels in parental SAS cells (Figure 2A, lanes 2, 4–6), whereas N-cadherin and vimentin levels were dramatically elevated in Gamma- and Delta-SAS (Figure 2A, lanes 5 and 6). Taken together, these results suggest that Delta-SAS and Gamma-SAS are competent to induce the EMT upon TGF- β 1.

Expression of representative EMT markers and cell motility are reversibly altered in Delta-SAS and its revertant, SAS- δ

Although EMT is a potentially reversible program, the molecular mechanism of MET is not thought to represent the strict reversal of the EMT (Kim et al., 2016). To characterize the differences in molecular mechanisms between the EMT and MET, we investigated whether the EMT induced in Delta-SAS could be reversed by depletion of TGF- β 1. To this end, we cultured and passaged Delta-SAS twice in the absence of TGF- β 1, yielding a revertant that we named SAS- δ (Figure 1A-x). We then compared the expression levels of representative EMT markers between SAS- δ (without TGF- β 1) and Delta-SAS (with TGF- β 1). SAS- δ exhibited a remarkable restoration of occludin expression and sharp decreases in N-cadherin and vimentin levels (Figure 2A, lanes 6 and 7). Moreover, when SAS- δ cells were again treated with TGF- β 1, the expression level of occludin decreased, and the levels of N-cadherin increased to the levels observed in parental SAS treated with TGF- β 1 (Figure 2A, lanes 2 and 8). Notably, the level of vimentin was higher in TGF-

β 1-treated SAS- δ than in TGF- β 1-treated parental SAS. These results suggest that the changes in expression of the EMT markers in Delta-SAS and SAS- δ are partially, but not completely, reversible in response to TGF- β 1. Furthermore, wound healing assays revealed that the motility of SAS- δ was promoted by the addition of TGF- β 1 (Figure 2B, right panels; Figure 2C, purple bars), similar to the behavior of parental SAS and Delta-SAS in the presence of TGF- β 1 (Figure 2B, second and third panels from left; Figure 2C, light green and light blue bars); however, a small fraction of Delta-SAS cells moved irregularly and distributed into the gap 6 hours after the monolayer was scratched (Figure 2B, third panel from top). These results suggest that the motility of SAS- δ is reversible depending on TGF- β 1, suggesting that SAS- δ partly recovered the epithelial properties of the parental line in the absence of TGF- β 1.

SAS- δ exhibit suppression of invasion and migration in the absence of TGF- β 1

To examine the invasive activity of SAS- δ in the absence of TGF- β 1, we performed cell invasion assays using Matrigel BioCoat invasion chambers (Figure 3A, top and second panels from top) and cell migration assays using BioCoat control inserts (Figure 3A, third panels from top and bottom panels). The invasion assays revealed that the number of invasive SAS- δ cells was reduced in comparison to parental SAS (Figures 3B and 3C), suggesting that the invasive activity of SAS- δ was lower than that of parental SAS. Moreover, the migration assays revealed that the number of migrating cells was markedly smaller in SAS- δ than in parental SAS (Figures 3B and 3D). These results suggest that invasion and migration activities were impaired in SAS- δ in the absence of TGF- β 1.

SAS- δ cells pile up and overgrow without cell–cell contact inhibition

To characterize cell growth control in SAS- δ , we cultured parental SAS and SAS- δ in media with or without TGF- β 1, and then acquired micrographs every 2 days for 13 days (Figure 4A). Interestingly, in the absence of TGF- β 1, SAS- δ continued to grow faster and pile up without spreading in the horizontal direction (Figures 4A, third panels from top, day 5; and 4C). By contrast, parental SAS grew constantly until reaching confluence (Figures 4A, top panels, day 5; and 4B), and subsequently exhibited growth delay and focus-forming activity (top panels, day 9). Indeed, the growth curves of these cell lines revealed that SAS- δ cell number increased markedly, without growth arrest, whereas the parental SAS cells grew slowly for 8 days and accelerated slightly thereafter (Figure 4D). These results suggest that SAS- δ lost the ability to grow in a spreading manner in the horizontal direction on the bottom surface of standard culture dishes and became unable to induce growth arrest mediated by cell–cell contact. On the other hand, in the presence of TGF- β 1, SAS- δ grew widely, spreading until reaching the confluent state (on day 3 or 5), as efficiently as the parental SAS cells, and then forming apparent foci after day 5 (Figure 4A, fourth panels from top). Consistent with this, the number of Delta-SAS cells continued to increase, similarly to SAS- δ , in the presence of TGF- β 1 (Figures 4A, bottom panels; and 4D).

To elucidate the mechanism of abnormal cell growth in SAS- δ , we first examined how the cells spread or piled up in the culture dish, as well as the extent to which they were piled up. To this end, we grew parental SAS and SAS- δ cells until they piled up (at day 14), stained their nuclei with Hoechst 33258, and acquired images by confocal microscopy (Figure 4E). We then quantified staining intensity per unit area in 2D images reconstructed from 3D stacks using image analysis software (Figures 4E and 4F). The signal intensity of piled-up SAS- δ was higher than that of parental SAS cells,

which was spread continuously throughout the area (Figure 4E, gray). Indeed, the three-dimensional and cross-sectional images of these cells also exhibited the continuously spreading feature of piled-up SAS- δ (Figure 4G). Next, to examine the correlation between cell motility and continuously spreading overgrowth in SAS- δ , we co-immunostained parental SAS and SAS- δ with phalloidin (a high-affinity F-actin probe) and vimentin (Figure 4H). Interestingly, SAS- δ cells were more strongly stained by phalloidin and vimentin than parental SAS, indicating that formation of F-actin and expression of vimentin were significantly augmented in SAS- δ . These results suggest that SAS- δ acquired the ability to form excessive actin fibers and mesenchymal-specific intermediate filaments, which might contribute to their biological features, including piled-up overgrowth without contact inhibition.

The Hippo pathway is dysregulated in SAS- δ

The canonical Hippo pathway plays a pivotal role in contact-mediated inhibition in normal cells. Specifically, LATS1 and LATS2 prevent cell overgrowth by phosphorylating and inhibiting YAP and TAZ in this pathway (Pan, 2010). To characterize the overgrowth phenotype of SAS- δ , we first examined the impact of cell density on the levels of the Hippo pathway proteins in two cancer cell lines, parental SAS and SAS- δ , in the absence of TGF- β 1 (Figures 5A, 5B, and Supplementary Figure S1). In parental SAS, not only LATS1 and LATS2 but also YAP and TAZ were gradually upregulated and activated in response to a higher cell density; however, TAZ levels decreased starting at 8 days after passage (the time of highest cell density; Figure 5B, lane 4) to a level nearly equal to that on day 2 (the time of lowest cell density; Figure 5B, lanes 1). Interestingly, the protein level and activity (T1079-phosphorylation level) of LATS1

were not elevated in SAS- δ even at a higher cell density, whereas the intrinsically high protein levels of LATS2, YAP, and TAZ and the high activity of LATS2 (T1041-phosphorylation level) gradually decreased as a function of cell density (Figure 5B, lanes 5–8), eventually reaching levels comparable to those in parental SAS at the lowest cell density (Figure 5B, lanes 1 and 8). These results suggest that the cell density-dependent Hippo pathway can be partially activated in parental SAS, whereas the pathway is severely impaired in SAS- δ .

Next, we investigated whether the levels of LATS1 and LATS2 and their activated states (pT1079 and pT1041, respectively) in parental SAS were altered by the presence of TGF- β 1. The levels of LATS1 and LATS2, as well as the levels of pT1079 and pT1041, were increased by treatment with TGF- β 1 (Figure 5C, lane 2), consistent with previous data on other cell lines such as MCF10A (Zhang et al., 2012). Moreover, we examined the protein and phosphorylation levels of LATS1 and LATS2 in a series of SAS derivatives, including Alpha-SAS, Beta-SAS, Gamma-SAS, Delta-SAS, and SAS- δ (Figure 5C, lanes 3–7). The protein and phosphorylation levels of LATS1 and LATS2 were also elevated in Gamma- and Delta-SAS in the presence of TGF- β 1 (Figure 5C, lanes 5 and 6). Notably, the level of LATS1 pT1079 and LATS2 protein in SAS- δ were elevated even in the absence of TGF- β 1 in comparison to the corresponding levels in TGF- β 1-treated parental SAS and/or Delta-SAS (Figures 5C, lane 7; 5D; and Supplementary Figure S2B), whereas the level of LATS2 pT1041 was reduced in SAS- δ (Figure 5C, lane 7; and 5E). Interestingly, elevation in LATS1 pT1079 was reversible in response to TGF- β 1, whereas the reduction in LATS2 pT1041 was irreversible (Figures 5C, lanes 6–8; 5D; and 5E). These results suggest that SAS- δ exhibits aberrant accumulation of LATS2 protein and an inverse correlation in the phosphoregulation of

LATS1 and LATS2, which might be involved in the canonical Hippo pathway and/or other LATS1/2-mediated signaling pathways in SAS- δ .

In the canonical Hippo pathway, phosphorylation of T1079 on LATS1 and T1041 on LATS2 are regulated by the upstream kinases MST1 and/or MST2 and the scaffold protein Salvador/SAV1 (Meng *et al.*, 2016). Therefore, we examined the expression levels of MST2 and SAV1 in SAS- δ and a series of SAS derivatives. Although the amount of MST2 protein did not change significantly in parental SAS upon addition of TGF- β 1 (Figure 5C, fifth panel from top, lane 2), it increased in SAS- δ even in the absence of TGF- β 1 (Figure 5C, lane 7; and Supplementary Figure S2C). However, activation of MST2 (corresponding to phosphorylation of MST2 on T180) increased somewhat in SAS- δ : specifically, the level of pT180 in SAS- δ was higher than in parental SAS, but lower than that in Gamma- and Delta-SAS, which did not respond to TGF- β 1 (Figures 5C, sixth panel from top; and 5F). The level of SAV1 protein also increased in SAS- δ , as well as in Delta-SAS (Figure 5C, seventh panel from top; and Supplementary Figure S2D). These results suggest that the TGF- β 1-responsive activation of MST2 toward LATS1/2 is impaired in SAS- δ .

Because dysregulation of MST2–LATS1/2 axis could influence the functions of YAP and TAZ, we examined the levels and phosphorylation of these proteins in SAS- δ . As expected, the level of TAZ protein was markedly elevated in SAS- δ in comparison to its level in parental SAS and other SAS derivatives, in which it decreased upon addition of TGF- β 1 (Figure 5C, eighth panel from top, lanes 7 and 8; and Supplementary Figure S2E). Conversely, the inhibitory phosphorylation level of TAZ (pS89) normalized with TAZ protein was reduced in SAS- δ relative to other SAS cell lines, and decreased further upon addition of TGF- β 1 (Figure 2G). Considering that the activating phosphorylation of

the upstream kinase LATS2 (pT1041) was disturbed in SAS- δ (Figures 5C, third panel from top, lane 7; and 5E), these results suggest that, in the context of the Hippo pathway, the inhibitory phosphorylation of TAZ by LATS2 is disturbed in SAS- δ , leading to overexpression or aberrant stabilization of TAZ protein. On the other hand, the protein and inhibitory phosphorylation (pS127) levels of YAP were markedly elevated in SAS- δ but decreased to the levels in Delta-SAS upon addition of TGF- β 1 (Figures 5C, tenth and eleventh panels from top, lanes 7 and 8; 5H; and Supplementary Figure S2F), consistent with the behavior of LATS1-pT1079 in SAS- δ in a Hippo pathway-dependent manner (Figures 5C, top panel; and 5D). These results suggest that, in SAS- δ , the LATS2-TAZ axis becomes inactive regardless of the presence of TGF- β 1, whereas the LATS1-YAP axis can respond to TGF- β 1.

LATS1 and LATS2 phosphorylate SLUG on T209 *in vitro* and *in vivo*

SNAIL (*SNAI1*) and SLUG (*SNAI2*), zinc-finger transcription factors, are pivotal regulators of EMT (Nieto, 2002). LATS2 interacts with and directly phosphorylates SNAIL on Thr203 (T203) to promote EMT activity (Zhang et al., 2012). To determine whether LATS1 and/or LATS2 phosphorylate SLUG as well as SNAIL, we searched for the LATS phosphorylation consensus motif (H-x-R-x-x-pS/pT) in the primary structure of mammalian SLUG protein. We found two consensus sequences (T183, HIRHTH¹⁸³; T209, HIRHTH²⁰⁹) in the zinc-finger motifs of mouse Slug (Figure 6A). Both threonine residues were conserved as T182 and T208 in human SLUG. *In vitro* kinase assays with LATS1 or LATS2 revealed that LATS2 phosphorylated Slug primarily at T209 (Figure 6B): LATS2 phosphorylated the non-phosphorylatable T183A mutant of Slug more strongly than other non-phosphorylatable mutants such as T209A and the all-A (all of

seven alanine and two threonine residues in the LATS consensus-like motif, R-x-x-S/T and K-x-x-S/T, were substituted by alanine) mutants (Figure 6B, top panel, lane 11), despite the lower activity of LATS2 itself (Figure 6B, second panel from top, lane 11). Accordingly, we focused on T209 phosphorylation by LATS2. To confirm that LATS2 directly phosphorylates T209 of Slug, we performed *in vitro* LATS1/2 kinase assays and western blotting with an antibody against phosphorylated T209 (Figures 6C and 6D). Because it can also recognize pT208 in human SLUG, hereafter this antibody will be referred to as pT208 antibody. Indeed, the pT208 antibody specifically recognized the T209 phosphorylation of Slug by LATS2, although the band intensity was weak due to low kinase activity of LATS1 under this condition (Figure 6D). Moreover, the band recognized by the pT208 antibody was diminished by knockdown of human SLUG in SAS cells (Figure 6E). Together, these results suggest that LATS2 and LATS1 phosphorylate SLUG on T208 *in vitro* and *in vivo*.

Because the levels of SNAIL and SLUG proteins increase in response to TGF- β 1 (Nieto, 2002), we examined the levels of SLUG protein in parental SAS and a series of SAS derivatives in the presence or absence of TGF- β 1. The level of SLUG, as well as SNAIL, increased progressively from parental SAS to Gamma- and Delta-SAS cells in the presence of TGF- β 1 (Figure 6F). Moreover, the phosphorylation levels of T208 on SLUG and T203 on SNAIL were also elevated in Gamma- and Delta-SAS. Notably, the protein levels of SLUG and SNAIL were decreased by depletion of TGF- β 1 in SAS- δ , and restored to a level nearly equal to that in Beta-SAS, upon re-addition of TGF- β 1. However, the phosphorylation levels of these proteins were also decreased by depletion of TGF- β 1 but not restored by re-addition of TGF- β 1 (Figure 6F, lanes 7 and 8). Importantly, even in the absence of TGF- β 1, the protein and phosphorylation levels of

SLUG in SAS- δ increased relative to those in parental SAS (Figure 6F, lanes 1 and 7). Moreover, siRNA-mediated knockdown of LATS2 decreased the level and stability of nuclear SLUG protein in parental SAS (Figure 6G, lanes 13–16).

Loss of SLUG promotes invasiveness of SAS- δ

To determine whether SLUG or TAZ is involved in cell invasion of parental SAS or SAS- δ , we knocked down SLUG or TAZ with siRNA and performed migration/invasion assays in the absence of TGF- β 1 (Figures 6H–J). The invasion of parental SAS was slightly elevated upon depletion of TAZ (approximately 2-fold greater than siControl) and elevated to a greater extent upon depletion of SLUG (approximately 2-fold greater than siControl). Interestingly, the invasion of SAS- δ was remarkably increased by depletion of SLUG (approximately 11-fold greater than siControl), but only slightly increased by the depletion of TAZ (approximately 3-fold greater than siControl). In addition, because epithelial-like SAS- δ exhibited abnormal cell proliferation, such as piled-up growth without contact-mediated inhibition (Figure 4), it is possible that the epithelial state of SAS- δ was independent of and distinct from that of parental SAS, i.e., SAS- δ represents a more advanced type of epithelial cancer cell. Therefore, SLUG might be required for the maintenance of epithelial-like phenotypes, especially in the advanced stage.

SAS- δ exhibit higher invasive tumor growth *in vivo*

To determine whether the lower *in vitro* invasiveness of SAS- δ is reflected in *in vivo* invasive tumor growth, we injected parental SAS or SAS- δ into the tongues of BALB/c nude mice (Figure 7A). Mice injected with SAS- δ apparently generated larger tumors on their tongues, and the survival of these mice was reduced relative to mice injected with

parental SAS (Figure 7B). Notably, all tumor xenograft samples (day 8, n=4) containing SAS- δ exhibited an indistinct boundary between invasion front and normal tongue tissue (transplant site), whereas all samples (day 8, n=3) of parental SAS had a distinct boundary (Figure 7C). These results suggest that SAS- δ exhibits higher invasive tumor growth *in vivo*, even though it is less invasive than parental SAS in the absence of TGF- β 1 *in vitro*, suggesting that SAS- δ can drive aggressive malignancy more strongly than parental SAS, and that SAS- δ can generate invasive tumors *in vivo* in response to various growth factors, including TGF- β 1, in tongue tissue.

Discussion

In this study, we established an EMT-competent (TGF- β 1-susceptible) cell line, Delta-SAS, by stepwise selection of OSCC cells with high motility in the presence of TGF- β 1. Subsequently, we established SAS- δ by depletion of TGF- β 1 for two passages. Unlike Delta-SAS and parental SAS, SAS- δ acquired abnormal biological properties, including piled-up overgrowth without contact inhibition (Figure 4), and high tumorigenicity with invasiveness in mouse tongue (Figure 7). These results suggest that SAS- δ represent more advanced cancer cells than Delta-SAS and parental SAS. Previously, another group established two SAS cell lines with low invasive potential (SAS-L1) and high invasive potential (SAS-H1) by selection based on invasive capacity, a method distinct from the one used in this study (Okumura et al., 1996). In addition to greater invasiveness, SAS-H1 exhibited high migration and motility, whereas SAS-L1 exhibited lower migration and motility, suggesting a positive correlation between invasion, migration, and motility in cancer cells. Nevertheless, SAS- δ exhibited low activity in migration and invasion *in vitro* in the absence of TGF- β 1 (Figure 3). Moreover, the abnormal biological properties observed in SAS- δ were not present in SAS-H1 and SAS-L1. Thus, it is likely that SAS- δ is dissimilar to SAS-H1 or SAS-L1, and unique in regard to its capacity of abnormal growth and level of cancer malignancy. Indeed, on the basis of the expression levels of representative EMT markers (Figure 2A), SAS- δ partly recovered epithelial properties in the absence of TGF- β 1, consistent with the low migration and invasion activity of this cell line. Therefore, it is most likely that SAS- δ are epithelial-like, rather than mesenchymal-like or metastable (i.e., the intermediate stage of the EMT); however, the epithelial state of SAS- δ is apparently different from that of parental SAS. These results support a recent model that the MET is not the reverse of the EMT (Kim et al., 2016).

On the basis of these results, we propose a new model for the evolution of cancer cells (Supplementary Figure S3). Namely, cancer cells changed to a more advanced stage by progressively repeating the EMT and the MET, without metastasis to distant sites, through the following steps: (1) epithelial cancer cells (corresponding to parental SAS in this study) turn into mesenchymal-like cancer cells (corresponding to Delta-SAS in this study) via induction of the EMT (e.g., addition of TGF- β 1); (2) mesenchymal-like cancer cells turn into advanced epithelial (aE) cancer cells (corresponding to SAS- δ in this study) via induction of the MET (e.g., depletion of TGF- β 1); and (3) aE cancer cells turn into advanced mesenchymal-like (aM) cancer cells via induction of the secondary EMT. The grade of malignancy may increase as these steps are repeated. Therefore, aM cancer cells might acquire more aggressive malignant properties than mesenchymal-like cancer cells.

What is the key factor in the molecular machinery involved in switching between the EMT and MET in this model of cancer progression? We demonstrated that the Hippo pathway (MST1/2–LATS1/2–YAP/TAZ axis) is dysregulated in aE cells (SAS- δ), and that knockdown of SLUG promotes invasiveness of aE cells even in the absence of TGF- β 1 (Figures 5 and 6). These results suggest that dysregulation of the Hippo pathway in aE cells induces the abnormal cell growth, such as piled-up overgrowth, and that SLUG is required for induction of the secondary MET (MET in aM cells) or the maintenance of the epithelial state, which prevents the secondary EMT (Supplementary Figure S3). Thus, it is possible that LATS1/2 play key roles both in the Hippo pathway and in regulation of SLUG during the EMT–MET process.

On the other hand, in OSCC cell lines such as Cal27 and HN4, knockdown of TAZ inhibits cell motility, migration, invasion, and the expression of vimentin, a mesenchymal marker, whereas conversely the enforced expression of TAZ promotes

these aspects, indicating that TAZ confers EMT-like changes on the cells. TAZ seems to be involved in TGF- β -mediated EMT (Li et al., 2015). Moreover, the promoters of *LATS1/2* genes are methylated in OSCC patients at a comparatively early stage or well-differentiated stage (Ladiz et al., 2016). Taken together with the data that *LATS1/2* directly regulate two EMT-related transcriptional factors, including SLUG during the MET or subsequent epithelial stage (Figure 6) and SNAIL during the EMT (Zhang et al., 2012), it is possible that when the Hippo pathway-mediated growth inhibitory system is disrupted by genetic mutation or oncogenic stress, the core components of this pathway, such as MST1/2, *LATS1/2*, and YAP/TAZ, become independent of one another and might play distinct and independent roles in EMT and cancer progression via interactions with new partners (Shao et al., 2014). Indeed, YAP and/or TAZ have the ability to interact with SNAIL, SLUG, and/or ZEB1 during development or cancer progression (Tang et al., 2016; Lehmann et al., 2016), whereas *LATS1/2* also regulate chromosomal instability (Aylon et al., 2006; Yabuta et al., 2013).

We also showed that *LATS1/2* phosphorylate SLUG on T208 (Figure 6D), and that the protein and phosphorylation levels of SLUG were elevated in advanced cancer cells such as SAS- δ (Figure 6F). Therefore, anti-SLUG-pT208 antibody will be valuable as a novel marker of malignant tumor cells, and could be used for prognostic purposes. Further studies are needed to determine whether the pT208 antibody could contribute to the diagnosis or therapy of various aggressive cancers.

Materials and Methods

Cell culture

SAS, a human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell line derived from a tongue tumor, was provided by the Human Science Resource Cell Bank (Osaka, Japan). SAS cells were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, and incubated at 37 °C and 5% CO₂. To induce the EMT, cells were treated with 10 ng/ml recombinant human TGF-β1 (PEPROTECH, Rocky Hill, NJ, USA). To determine the effects on contact inhibition, SAS and SAS-δ cells were seeded in 60 mm dishes (2.0×10^6 cells/dish) and cultured overnight at 37 °C and 5% CO₂. The day after seeding was defined as day 0. The cells were photographed and collected on day 2, 4, 6, and 8, and then subjected to western blotting.

Wound healing assay

The cells were maintained at confluence. After washing with PBS(-), the cell surface was uniformly scratched with a blue pipette tip. Floating cells were removed by washing with PBS(-), and then adherent cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂ for the indicated times. Cell motility was assessed by measuring the width (distance between both edges of the wound) at the indicated times. Five points of the wound were selected and measured.

Western blot analysis

Cell extracts were incubated at 4 °C for 30 min in modified TNE250 lysis buffer (10 mM

Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.25% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 2 mM benzamidine) supplemented with 100 µg/mL PMSF, 1 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin A, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β-glycerophosphate, and 100 nM okadaic acid (OA) (Mukai et al., 2015). After centrifugation, cleared lysates were denatured in SDS-sample buffer. The proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes, blocked, and subjected to western blotting with the indicated primary antibodies in TBST (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) with 5% or 0.5% nonfat milk. The membranes were probed with HRP-conjugated secondary antibodies, washed in TBST, and visualized using Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Antibody

Anti-SLUG-pT208 polyclonal antibody was raised against phosphorylated T208 of human SLUG (IRTH{pT}GEKPFS; this sequence is identical to T209 of mouse Slug). The SNAIL-pT203 polyclonal antibody was raised against phosphorylated T203 (GHVRTH{pT}GEKPFS) of human SNAIL, using a previous report as a reference (Zhang et al., 2012). Briefly, rabbits were injected with the KLH-conjugated phosphopeptides, and antisera were affinity-purified using a phospho-antigen peptide column. To eliminate reaction of non-specific antibodies with unphosphorylated antigen peptide, the antibody preparation was passed through a column containing non-phosphorylated peptide (SLUG-T208, IRTHTGEKPFS; or SNAIL-T203, GHVRTHTGEKPFS). Generation and purification of these antibodies were supported by GenScript (Piscataway, NJ, USA). The commercial antibodies are listed in Supplementary Table 1.

Transfection and siRNA

The siRNA duplexes were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Sequences of siRNA duplexes were as follows: siTAZ, 5'-AGAGGUACUCCUCAAUCAdTdT; and siSLUG, 5'-CCCAUUCUGAUGUAAAGAAAUACdCdA. Scrambled siRNA (siControl) or siRNA against firefly luciferase (GL2) was used as a negative control.

Cell invasion and migration assays

Cell invasion assays were performed using a two-layer structure Transwell chamber (Corning BioCoat Matrigel invasion chamber, 8.0 μ m pore size) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Briefly, the cells were seeded in the upper chamber at a density of 5.0×10^5 cells/mL in 2 mL of DMEM without serum, and DMEM with 10% FBS was added to the lower chamber. After incubation at 37 °C with 5% CO₂ for 72 h, cells on the upper chamber were removed by scrubbing with a cotton-tipped swab. The cells on the lower surface of the membrane were stained using the Diff-Quik kit (Sysmex, Kobe, Japan). Migration assays were performed using a two-layer Transwell chamber (Falcon cell culture inserts; Thermo Fisher Scientific). The number of invading or migrating cells on the membrane was counted by photographing the membrane under the microscope. The numbers of invading or migrating cells were represented as the average number of cells per microscopic field over ten or five fields, respectively.

Cell growth assays

Cells were seeded at a density of 0.5×10^5 /well in 6-well plates, and cultured at 37 °C

and 5% CO₂. Cells in separate wells for each time point were trypsinized and were counted on a Countess automated cell counter (Invitrogen) every 2 days for 2 weeks. We defined the day after seeding as day 0.

Indirect immunofluorescence staining

Cells were cultured on coverslips immersed in a culture dish (35 mm) and sequentially fixed at room temperature in 4% formaldehyde in PBS(-), 0.1% Triton X-100 in PBS(-), and 0.05% Tween-20 in PBS(-) for 10 min each. After removal of the final fixation solution, the fixed cells were blocked for 1 h at room temperature with 2 ml of TBST buffer supplemented with 5% FBS. Subsequently, the cells were incubated with the indicated primary antibodies, followed by incubation with Alexa Fluor 488- and 594-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) in TBST containing 5% FBS. The stained cells were observed on a confocal laser scanning microscope FV10i (Olympus, Tokyo, Japan).

***In vitro* kinase assay**

Recombinant human LATS1 or LATS2 kinase (Carna Biosciences, Hyogo, Japan) was incubated at 30°C for 30 min with GST-fused mouse Slug-WT, -T183A, -T209A, and all-A (S101A, S139A, S161A, T183A, S196A, T209A, S215A, S248A, and S252A) mutants in LATS1/2-kinase buffer (20 mM PIPES [pH 6.8], 4 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) containing 20 μM ATP and 10 μCi [γ -³²P] ATP. Reactions were resolved by SDS-PAGE followed by autoradiography and staining of minigels using SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Tongue tumor model of mice

SAS and SAS- δ cells (2×10^6 cells in 50 μ l of serum-free DMEM) were injected into the tongues of 5-week-old female nude mice (BALB/c-nu/nu; Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) using a syringe with a 26 G needle. After injection, survival rate and body weight were measured. For pathological examination, four mice were sacrificed and their tongue tumors were excised 8 days after tumor implantation. The sections (3 μ m thick slices) of pathological samples were prepared by The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University [BIKEN] after fixation with 10% formalin neutral buffer solution (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). For hematoxylin and eosin (H&E) staining, the sections of mouse tongue tumor specimens were stained using an automated slide stainer, Tissue-Tek-Prism (Sakura Fine Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan). In brief, after deparaffinization and rehydration, the samples were soaked in hematoxylin solution (Sakura Fine Japan) for 5 min. After washing with water, the samples were soaked in eosin Y solution (WALDECK GmbH & Co. KG, Münster, Germany) for 5 min.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed in Microsoft Excel. Error bars for data on cell growth and invasion/migration assays represent standard deviations from the mean. *P*-values were calculated using Student's *t*-test. Survival analysis *in vivo* was performed with Kaplan–Meier curves, and the comparisons were evaluated by generalized Wilcoxon test and log-rank test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.

Ethical permission

All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the

Fujibayashi and Yabuta *et al.*

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan (#Biken-AP-H24-17-0). The methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

Acknowledgments

We thank Dr. Patrick Hughes and Dr. Christopher K. Patil (Bioedit, Ltd.) for critically reading the manuscript. We are obliged to Dr. Satoshi Nojima for experimental support and discussion in immunohistochemistry. We also thank The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University [BIKEN] for preparation of sections of mouse tongue samples and immunostaining. This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research to N.Y. and H.N. (JSPS KAKENHI Grant Number JP26430112 and JP23370086); a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) to S.M. from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (Grant Number JP15K18408); Kanzawa Medical Research Foundation (to N.Y.); and the Takeda Science Foundation (to N.Y.).

Author Contributions

N.Y. and H.N. conceived the experimental design and wrote the manuscript. E.F., S.M., K.T., Y.A., and T.U. performed the experiments. E.F., T.U., S.T., and M.K. performed pathological examinations. E.F., N.Y., and H.N. analyzed the data and discussed the findings.

References

Aylon, Y., Michael, D., Shmueli, A., Yabuta, N., Nojima, H., Oren, M. (2006). A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes Dev.* 20, 2687-2700.

Bartucci, M., Dattilo, R., Moriconi, C., Pagliuca, A., Mottolese, M., Federici, G., Benedetto, A.D., Todaro, M., Stassi, G., Sperati, F., et al. (2015). TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene* 34, 681-690.

Du, C., Zhang, C., Hassan, S., Biswas, M.H., Balaji, KC. (2010). Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. *Cancer Res.* 70, 7810-7819.

Hiemer, S.E., Zhang, L., Kartha, V.K., Packer, T.S., Almershed, M., Noonan, V., Kukuruzinska, M., Bais, M.V., Monti, S., Varelas, X. (2015). A YAP/TAZ-Regulated Molecular Signature Is Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 13, 957-968.

Janse van Rensburg, H.J., Yang, X. (2016). The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis. *Cell Signal* 28, 1761-1772.

Kim, J.Y., Kim, Y.M., Yang, C.H., Cho, S.K., Lee, J.W., Cho, M. (2012). Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3 β -mediated phosphorylation. *FEBS J.*

279, 2929-2939.

Kim, H.Y., Jackson, T.R., Davidson, L.A. (2016). On the role of mechanics in driving mesenchymal-to-epithelial transitions. *Semin. Cell Dev. Biol.* S1084-9521, 30137-30139.

Ladiz, M.A., Najafi, M., Kordi-Tamandani, D.M. (2016). Contribution of LATS1 and LATS2 promoter methylation in OSCC development. *J. Cell Commun. Signal.* In press.

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178-196.

Lehmann, W., Mossmann, D., Kleemann, J., Mock, K., Meisinger, C., Brummer, T., Herr R, Brabletz, S., Stemmler, M.P., Brabletz, T. (2016). ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nat. Commun.* 7, 10498.

Lei, Q.Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.Y., Bai, F., Pei, X.H., Zhao, S., Xiong, Y., Guan, K.L. (2008). TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol. Cell Biol.* 28, 2426-2436.

Li, Z., Wang, Y., Zhu, Y., Yuan, C., Wang, D., Zhang, W., Qi, B., Qiu, J., Song, X., Ye, J., et al. (2015). The Hippo transducer TAZ promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell maintenance in oral cancer. *Mol. Oncol.* 9, 1091-1105.

Lingen, M.W., Kalmar, J.R., Karrison, T., Speight, P.M. (2008). Critical evaluation of

diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol.* 44, 10-22.

Meng, Z., Moroishi, T., Guan, K.L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 30, 1-17.

Mukai, S., Yabuta, N., Yoshida, K., Okamoto, A., Miura, D., Furuta, Y., Abe, T., Nojima, H. (2015). Lats1 suppresses centrosome overduplication by modulating the stability of Cdc25B. *Sci. Rep.* 5, 16173.

Nieto, M.A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 155-166.

Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A., Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell.* 166, 21-45.

Okumura, K., Konishi, A., Tanaka, M., Kanazawa, M., Kogawa, K., Niitsu, Y. (1996). Establishment of high- and low-invasion clones derived for a human tongue squamous-cell carcinoma cell line SAS. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122, 243-248.

Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G.A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D.C., Deng, C.X., Brugge, J.S., Haber, D.A. (2006). Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 12405-12410.

Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* 19,

491-505.

Plouffe, S.W., Hong, A.W., Guan, K.L. (2015). Disease implications of the Hippo/YAP pathway. *Trends Mol. Med.* 21, 212-222.

Qin, W., Dong, P., Ma, C., Mitchelson, K., Deng, T., Zhang, L., Sun, Y., Feng, X., Ding, Y., Lu, X., et al. (2012). MicroRNA-133b is a key promoter of cervical carcinoma development through the activation of the ERK and AKT1 pathways. *Oncogene* 31, 4067-4075.

Rivera, C. (2015). Essentials of oral cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 11884-11894.

Shao, D.D., Xue, W., Krall, E.B., Bhutkar, A., Piccioni, F., Wang, X., Schinzel, A.C., Sood, S., Rosenbluh, J., Kim, J.W., et al. (2014). KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival. *Cell* 158, 171-184.

Takayama, S., Hatori, M., Kurihara, Y., Kinugasa, Y., Shirota, T., Shintani, S. (2009). Inhibition of TGF-beta1 suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases. *Oncol. Rep.* 21, 205-210.

Tam, W.L., Weinberg, R.A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* 19, 1438-1449.

Tang, Y., Feinberg, T., Keller, E.T., Li, X.Y., Weiss, S.J. (2016). Snail/Slug binding interactions with YAP/TAZ control skeletal stem cell self-renewal and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 18, 917-929.

Wang, S.P., Wang, W.L., Chang, Y.L., Wu, C.T., Chao, Y.C., Kao, S.H., Yuan, A., Lin, C.W., Yang, S.C., Chan, W.K. et al. (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat. Cell Biol.* 11, 694-704.

Wang, W.L., Huang, H.C., Kao, S.H., Hsu, Y.C., Wang, Y.T., Li, K.C., Chen, Y.J., Yu, S.L., Wang, S.P., Hsiao, T.H., et al. (2015). Slug is temporally regulated by cyclin E in cell cycle and controls genome stability. *Oncogene* 34, 1116-1125.

Yabuta, N., Mukai, S., Okamoto, A., Okuzaki, D., Suzuki, H., Torigata, K., Yoshida, K., Okada, N., Miura, D., Ito, A., et al. (2013). N-terminal truncation of Lats1 causes abnormal cell growth control and chromosomal instability. *J. Cell Sci.* 126, 508-520.

Yang, S., Zhang, L., Purohit, V., Shukla, S.K., Chen, X., Yu, F., Fu, K., Chen, Y., Solheim, J., Singh, P.K., et al. (2015). Active YAP promotes pancreatic cancer cell motility, invasion and tumorigenesis in a mitotic phosphorylation-dependent manner through LPAR3. *Oncotarget* 6, 36019-36031.

Yu, F.X., Zhao, B., Guan, K.L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 163, 811-828.

Zanconato, F., Cordenonsi, M., Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* 29, 783-803.

Zhang, L., Ye, D.X., Pan, H.Y., Wei, K.J., Wang, L.Z., Wang, X.D., Shen, G.F., Zhang, Z.Y. (2011). Yes-associated protein promotes cell proliferation by activating Fos Related Activator-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 47, 693-7.

Zhang, K., Rodriguez-Aznar, E., Yabuta, N., Owen, R.J., Mingot, J.M., Nojima, H., Nieto, M.A., Longmore, G.D. (2012). Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *EMBO J.* 31, 29-43.

Zhang, J., Wang, G., Chu, S.J., Zhu, J.S., Zhang, R., Lu, W.W., Xia, L.Q., Lu, Y.M., Da, W., Sun, Q. (2016). Loss of large tumor suppressor 1 promotes growth and metastasis of gastric cancer cells through upregulation of the YAP signaling. *Oncotarget* 7, 16180-16193.

Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., Hung, M.C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6, 931-940.

Zhu, Q., Le, Scolan, E., Jahchan, N., Ji, X., Xu, A., Luo, K. (2016). SnoN Antagonizes the Hippo Kinase Complex to Promote TAZ Signaling during Breast Carcinogenesis. *Dev. Cell* 37, 399-412.

Figure Legends

Figure 1. Establishment of Delta-SAS and SAS- δ cell lines

(A) Schematic drawings of the motility selection technique for isolation of Alpha-SAS, Beta-SAS, Gamma-SAS, Delta-SAS, and SAS- δ cell lines. All cell lines except for SAS- δ were isolated from parental SAS cells by repeating the selection step the indicated number of times (A-iii, removal of interior cells using a cell scraper; A-iv, allowing the outer cells to move into the interior space; A-v, removal of the outer cells using a cell scraper; and A-vi, propagation of residual cells) in the presence of TGF- β 1 (10 ng/ml). SAS- δ was isolated by subjecting Delta-SAS to two passages in the absence of TGF- β 1 (A-x).

(B) Wound healing assays of the series of SAS-derivative cell lines in the presence of TGF- β 1 (10 ng/ml). Images were acquired 0, 0.5, 1, 2, 4, and 6 h after wounding. Wound healing by parental SAS was assayed in the absence of TGF- β 1. Scale bars, 500 μ m.

(C) Quantification of the wound healing assay was performed by measuring the distance across the wound.

Figure 2. The EMT in Delta-SAS cells is highly sensitive to TGF- β 1 and reversible.

(A) Western blotting of parental SAS and a series of SAS derivatives with the indicated antibodies against EMT-marker proteins and α -tubulin (as a loading control). Alpha-SAS, Beta-SAS, Gamma-SAS, and Delta-SAS cell lines were constantly maintained in growth media containing TGF- β 1 (10 ng/ml). SAS- δ and parental SAS were treated with (+) or without (–) TGF- β 1 for 48 h.

(B) Wound healing assays of parental SAS, Delta-SAS, and SAS- δ in the presence (+) or

absence (–) of TGF- β 1 (10 ng/ml). Images were acquired 0, 3, 6, and 12 h after wounding.

Scale bars, 500 μ m.

(C) Quantification of the wound healing assay was performed by measuring the distance across the wound.

Figure 3. SAS- δ exhibits suppression of invasion and migration in the absence of TGF- β 1

(A) Invasion assays and migration assays of parental SAS and SAS- δ were performed in the absence of TGF- β 1 using the Matrigel BioCoat invasion chamber and the BioCoat control insert, respectively. Invading or migrating cells on the lower surface of the membrane were stained with the Diff-Quik kit, and then the membranes were photographed using a digital camera.

(B) High-power fields of invading or migrating cells on the lower surface of the membrane were taken using a microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany). Scale bars, 200 μ m.

(C, D) Invading (C) or migrating (D) cells on the membrane were counted by photographing the membrane under the microscope. Bar graphs show the average number of cells per microscopic field over ten fields (invading cells) or five fields (migrating cells).

Figure 4. SAS- δ pile up and overgrow without cell–cell contact inhibition

(A) Parental SAS, SAS- δ , and Delta-SAS were treated with (+) or without (–) TGF- β 1 (10 ng/ml) for the indicated numbers of days. Images were captured using a microscope. Scale bar, 500 μ m.

(B) Enlarged image of parental SAS on day 5 in the absence of TGF- β 1. Scale bar, 500 μ m.

(C) Enlarged image of SAS- δ on day 5 in the absence of TGF- β 1. Scale bar, 500 μ m.

(D) Growth curves of parental SAS, SAS- δ , and Delta-SAS in the presence (+) or absence (–) of TGF- β 1. Cells were maintained as in A. Data represent the average of cells from three independent experiments.

(E) Visualization of the three-dimensional cell density of parental SAS and SAS- δ . Cells were grown in the absence of TGF- β 1 for 13 days, and nuclei (DNA) were stained with Hoechst 33258 after fixation with 4% formaldehyde. Z-series images of the stained nuclei (gray) were captured with a confocal laser scanning microscope (FV10i), and a two-dimensional image was reconstructed by superimposing the collected Z-series images using the Fluoview software. Insets show enlarged color images of nuclei (blue). Scale bars, 200 μ m.

(F) Bar graphs show the average intensity (left) and integrated intensity (right) of nuclear signals in the reconstructed images (as in E) of parental SAS and SAS- δ . The signal intensity was quantified using the ImageJ software. Data represent the mean and s.d. of the intensity in three independent areas.

(G) Three-dimensional images of nuclear signals in parental SAS and SAS- δ were reconstructed from Z-series images of the Hoechst 33258-stained nuclei (blue) using the Fluoview software. The cross-sectional images reveal that the piled-up SAS- δ continuously and horizontally propagated in the culture dish. The sites of cross-sections are shown as yellow lines.

(H) Immunofluorescence staining of parental SAS and SAS- δ with phalloidin (F-actin, red) and anti-vimentin antibody (green). Cells were counterstained with Hoechst 33258

(blue) for visualization of DNA. Scale bars, 10 μ m.

Figure 5. The Hippo pathway is dysregulated in SAS- δ

(A) Parental SAS and SAS- δ cells (2.0×10^6 cells/dish) were seeded in 60 mm dishes and grown in the absence of TGF- β 1 for the indicated number of days. Photographs show the appearance of growing cells. Both cell lines were fully confluent at Day 4, but SAS- δ were continuously grown and piled up after reaching confluence. Scale bars, 500 μ m.

(B) Western blotting of parental SAS and SAS- δ , which were grown in the absence of TGF- β 1 during the indicated days as in A. Hippo pathway-related proteins were detected using the indicated antibodies.

(C) Western blotting of parental SAS and a series of SAS derivatives was performed with the indicated antibodies against the Hippo pathway proteins and α -tubulin (as a loading control). Each cell line was maintained as shown in Figure 2A.

(D-H) Relative levels of the indicated phosphorylated forms, normalized against the corresponding band intensity of the indicated proteins.

Figure 6. LATS1 and LATS2 phosphorylate SLUG on Thr182 and Thr208 *in vitro*

(A) Schematic representation of SLUG protein. The light gray box, dark gray box, and five white boxes show the SNAG domain, SLUG domain, and zinc-finger motifs, respectively. The LATS1/2 consensus sequence and predicted phosphorylation sites (T183 and T209 in mouse; T182 and T208 in human) are indicated by underlining and large bold characters, respectively.

(B) *In vitro* LATS1/2-kinase assays with GST-fused mouse Slug-WT (wild-type), -all-A (S101A, S139A, S161A, T183A, S196A, T209A, S215A, S248A, and S252A), -T183A,

and -T209A as substrates in the presence of [γ -³² P] ATP. SimplyBlue staining was performed to visualize the amounts of loaded proteins.

(C) Dot blot assay with anti-SLUG-pT208 antibody. Antigen peptides containing phosphorylated T208 site or non-phosphorylated peptides were blotted at the indicated concentrations on a PVDF membrane.

(D) *In vitro* LATS1/2-kinase assays with GST-fused mouse Slug-WT, -all-A, -T183A, and -T209A in the absence of [γ -³² P] ATP, followed by western blotting with the indicated antibodies. Phosphorylated bands were detected with anti-SLUG-pT208 antibody.

(E) SAS cells were transfected with siRNA against SLUG and cultured in the absence of TGF- β 1, followed by western blotting with anti-SLUG and anti-SLUG-pT208 antibodies. α -tubulin was used as a loading control.

(F) Western blotting of parental SAS and a series of SAS derivatives was performed with antibodies against SLUG, SLUG-pT208, SNAIL, and SNAIL-pT203. Each cell line was maintained as shown in Figure 2A.

(G) SAS cells transfected with GL2 (a negative control) or LATS2 siRNA duplex were treated with cycloheximide (CHX) for the indicated periods, and then subjected to subcellular fractionation. Protein levels of SLUG and LATS2 were determined by western blotting. Lamin A/C and α -tubulin proteins were observed as nuclear and cytoplasmic fraction markers, respectively.

(H) Invasion assays and the migration assays of parental SAS and SAS- δ transfected with siRNAs against TAZ and SLUG were performed in the absence of TGF- β 1 using the Matrigel BioCoat invasion chamber and the BioCoat control insert, respectively. Invading cells on the lower surface of the membrane were stained with the Diff-Quik kit, and the

membranes were photographed using a digital camera. siControl indicates a negative control. Scale bars, 200 μ m.

(I) Bar graphs showing the index of invasion in H, calculated by dividing the percent of invasion (% invasion = the average number of invading cells / the average number of migrating cells \times 100) of parental SAS or SAS- δ cells transfected with the indicated siRNAs by the percent invasion of cells transfected with siControl.

(J) Western blotting of extracts from knockdown cells used in the invasion assays. α -tubulin was used as a loading control.

Figure 7. SAS- δ cells enhance *in vivo* tumorigenicity

(A) Schematic drawings of an orthotopic mouse xenograft model of tongue cancer. Parental SAS or SAS- δ cells (2×10^6 cells / 50 μ l) were injected into the tongue of 5 week-old female nude mice (n=12). These mice were used for survival analysis (n=8) and for pathological analysis of tongue tumors (n=4).

(B) Survival analysis of nude mice injected orthotopically with parental SAS and SAS- δ cells. Survival rates of eight nude mice were evaluated by Kaplan-Meier method and compared by generalized Wilcoxon test and log-rank test.

(C) Representative H&E-stained sections of primary tongue tumors from nude mice injected with parental SAS and SAS- δ cells. Arrowheads indicate the boundaries between tumors (T) and normal tissues (N). Scale bars, 1 mm (\times 4).

Supplementary Figure Legends

Figure S1. Band intensities of western blots in Figure 5B.

(A, C, E, F) Bar graphs showing the relative levels of the indicated proteins, normalized against the corresponding band intensity of α -tubulin.

(B, D) Relative levels of the indicated phosphorylated forms, normalized against the corresponding band intensity of the indicated proteins.

Figure S2. Band intensities of western blots in Figure 5C.

(A–F) Bar graphs showing relative levels of the indicated proteins, normalized against the intensity of α -tubulin.

Figure S3. A model for the evolution of cancer cells.

Cancer cells are converted to a more advanced stage by progressively repeating the EMT and MET. See the Discussion section for more detail.

Figure 1 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

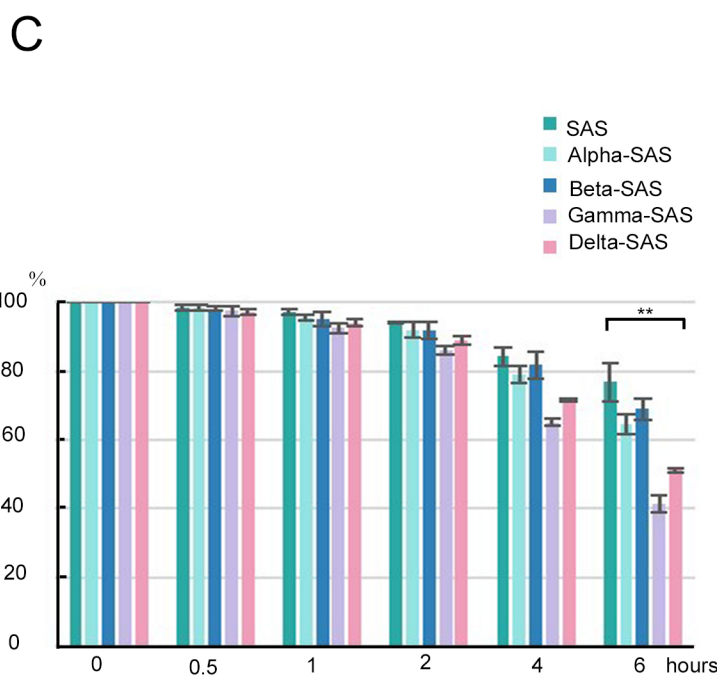
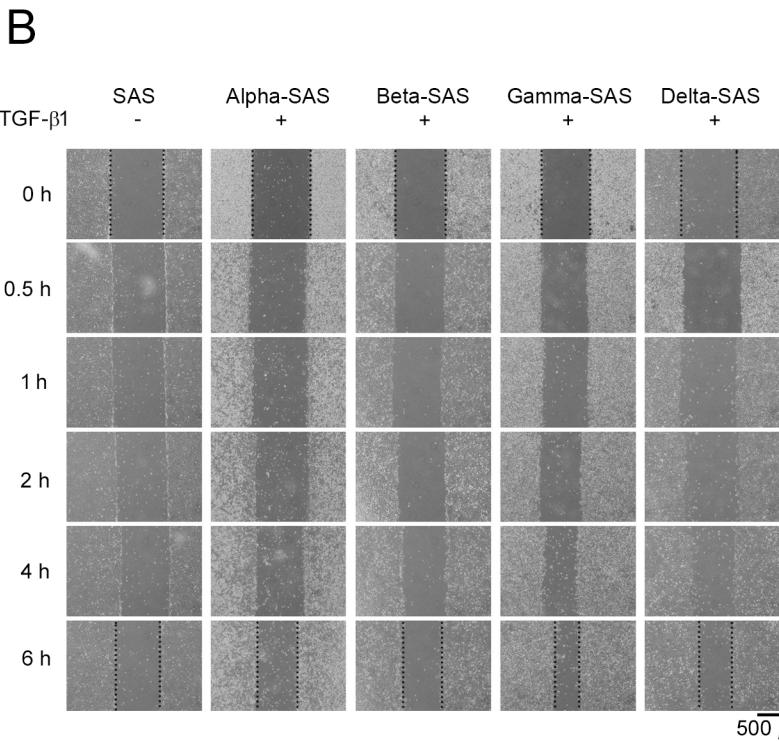
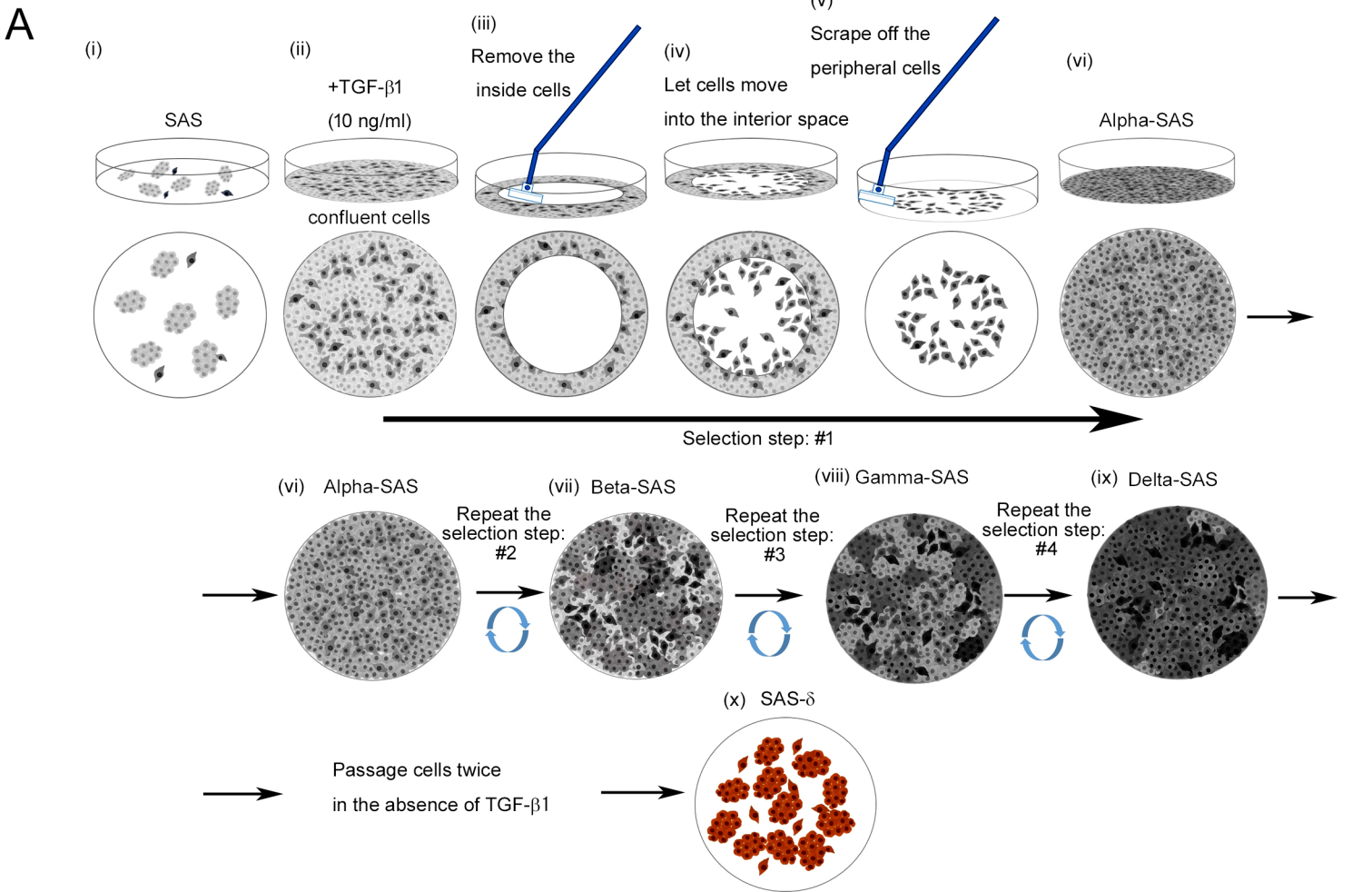
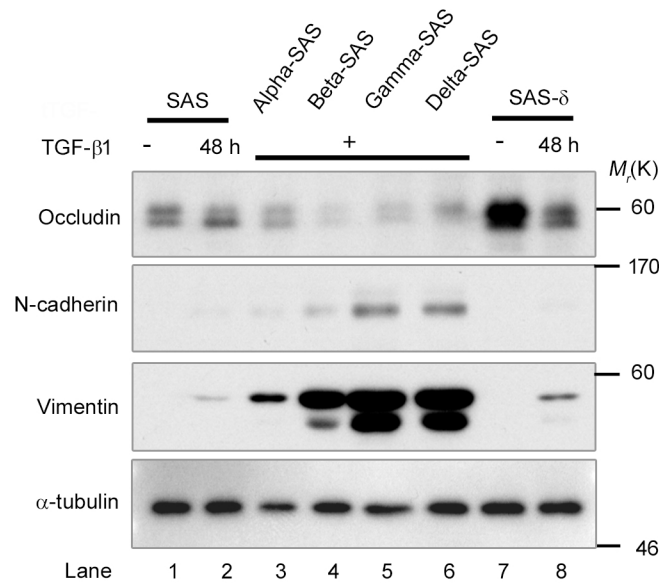
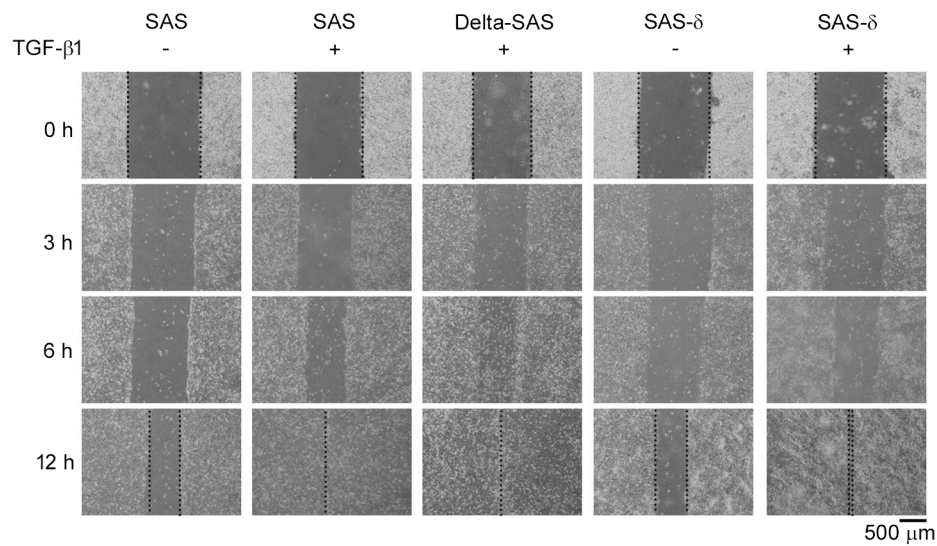


Figure 2 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

A



B



C

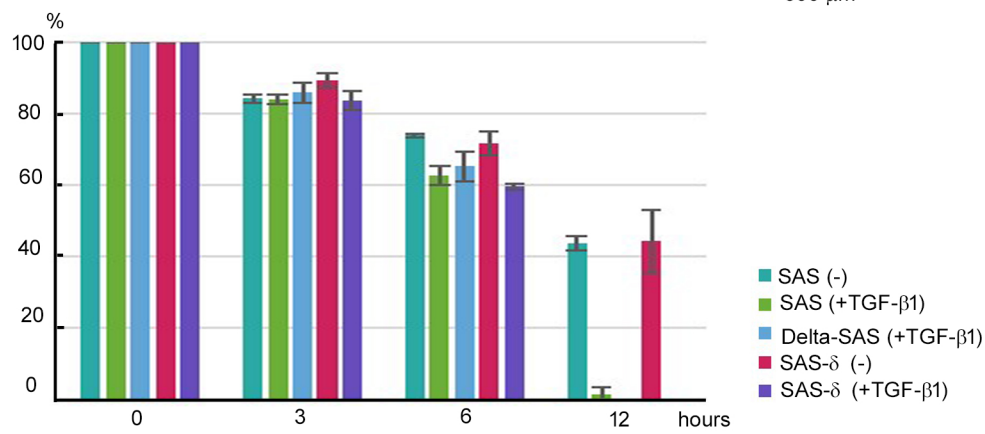


Figure 3 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

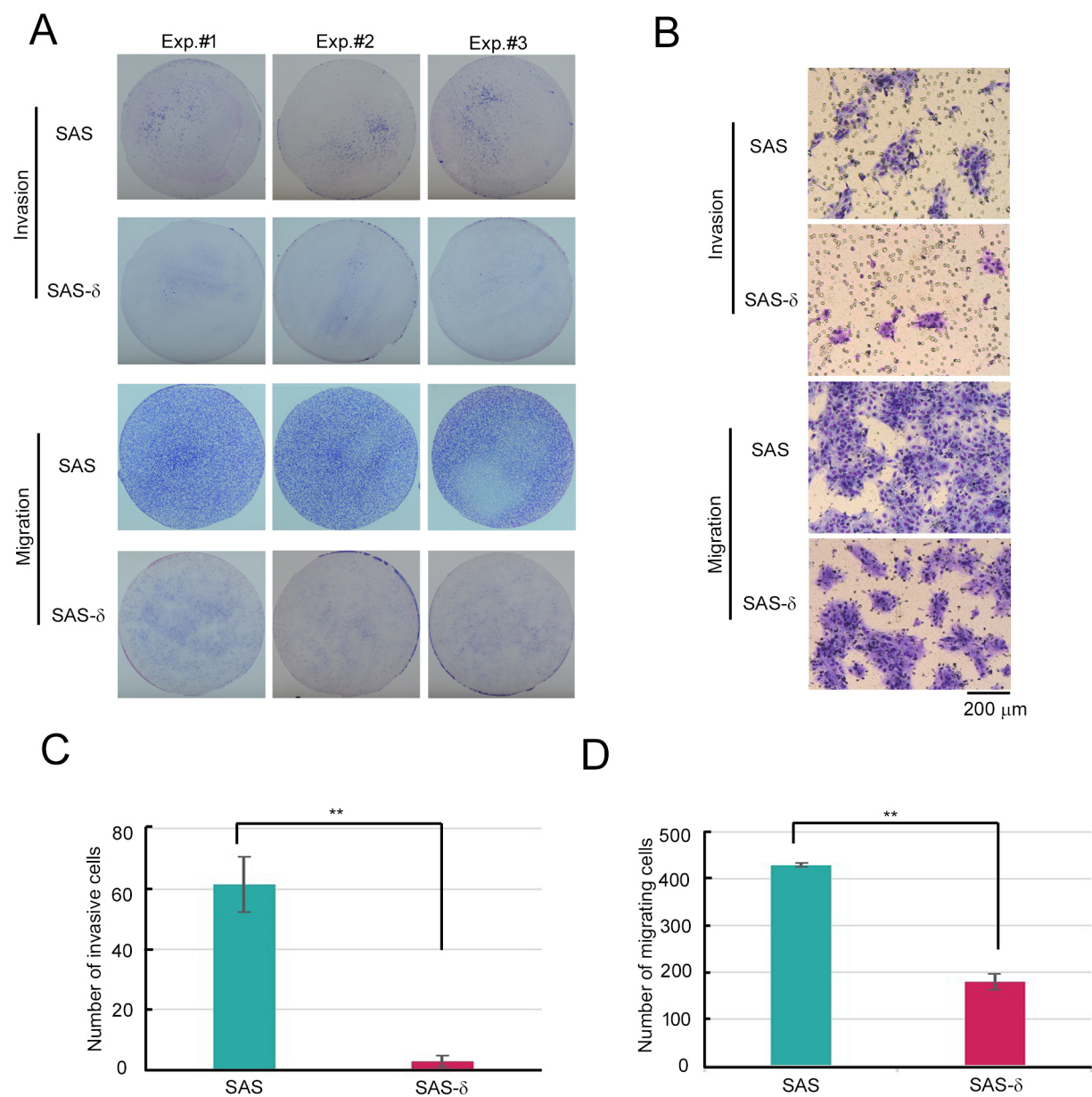


Figure 4 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

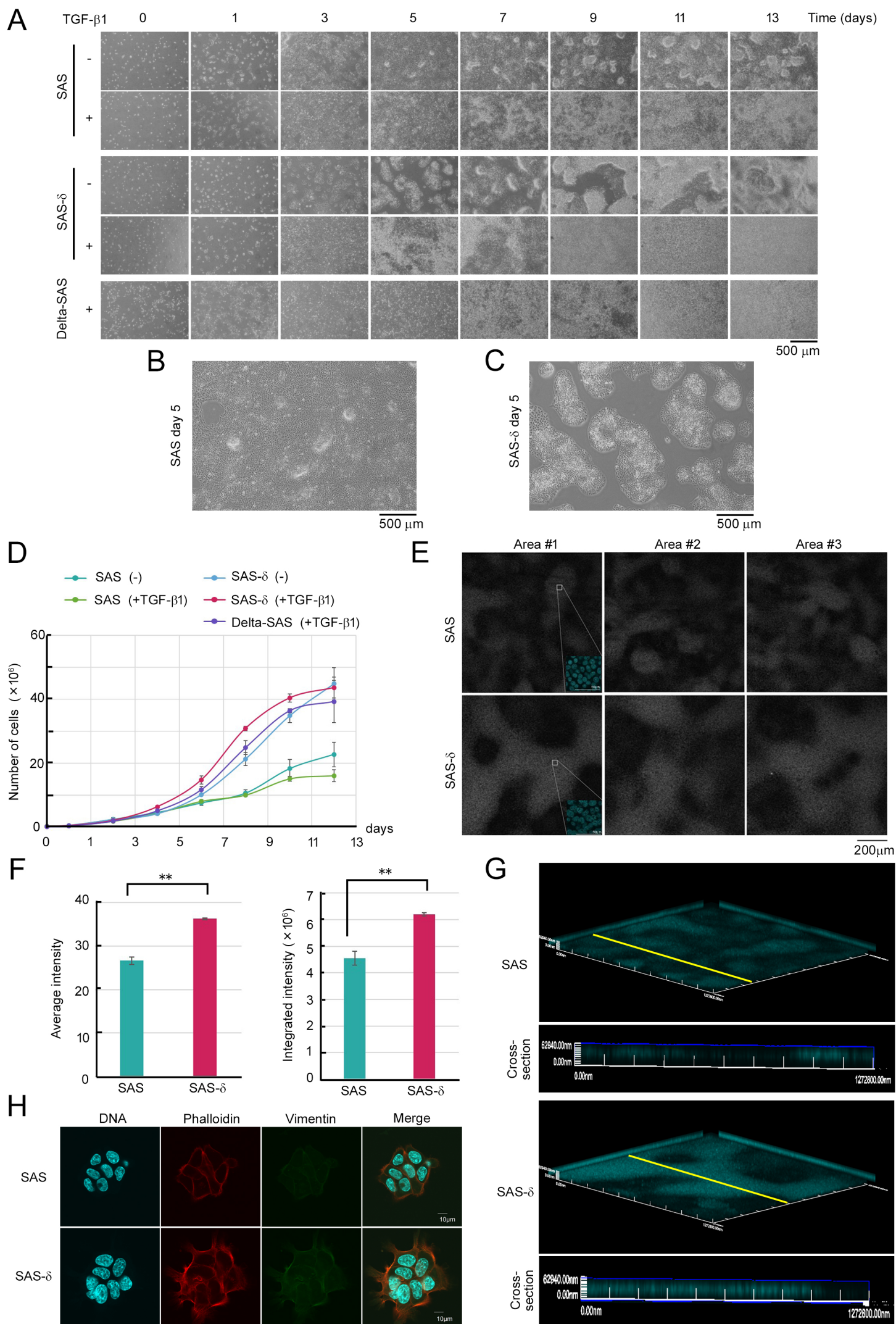


Figure 5 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

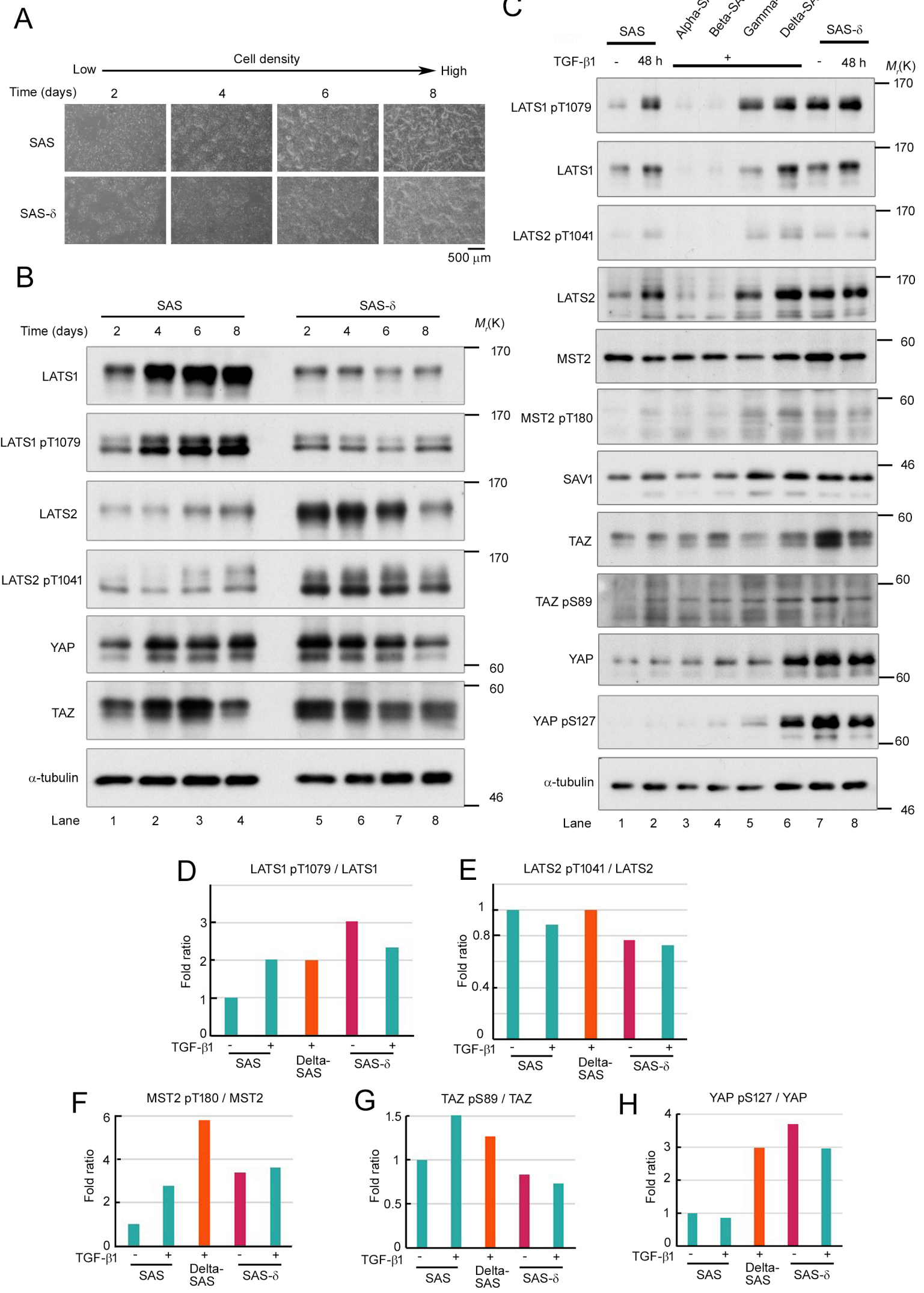


Figure 6 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

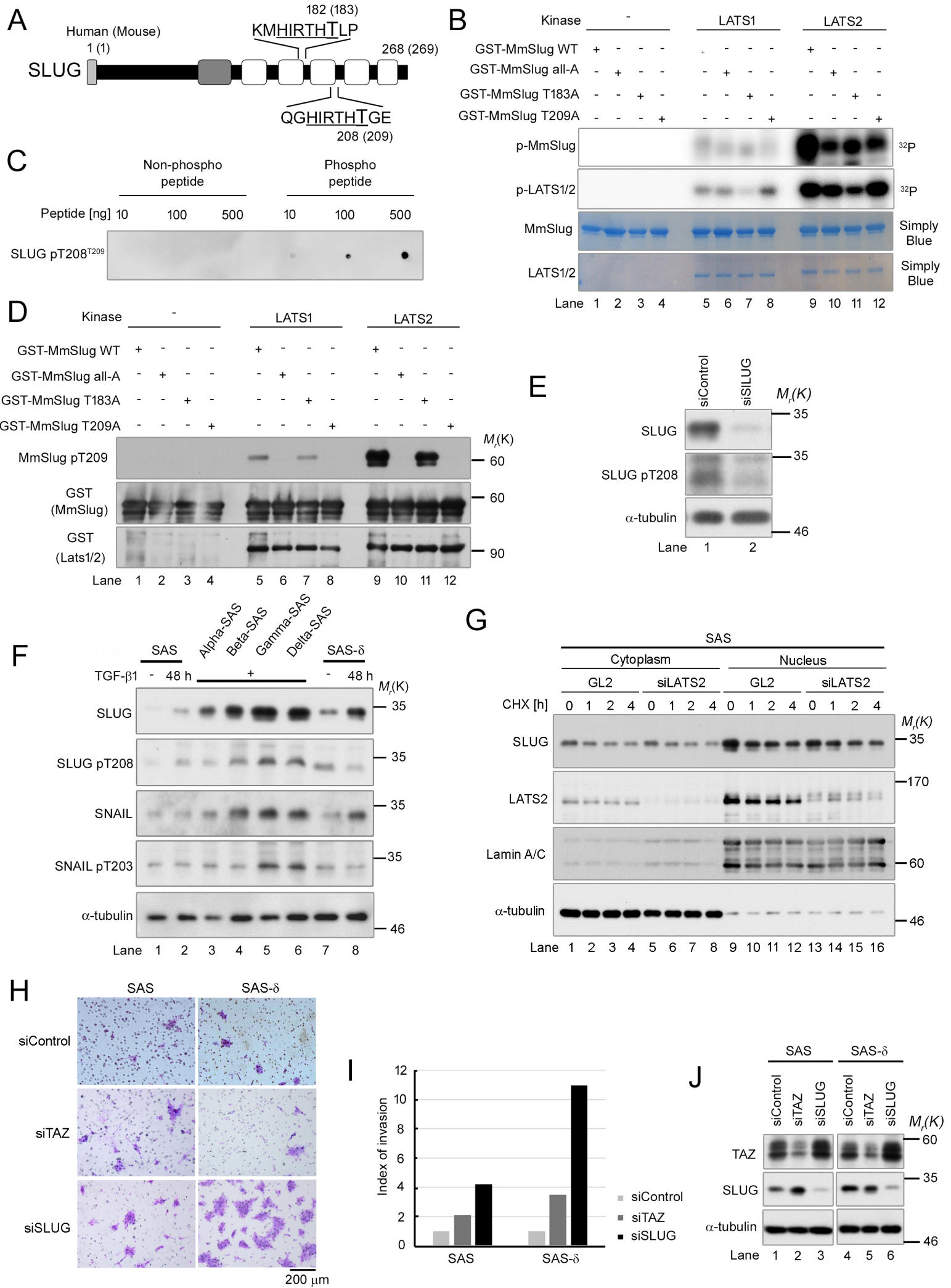
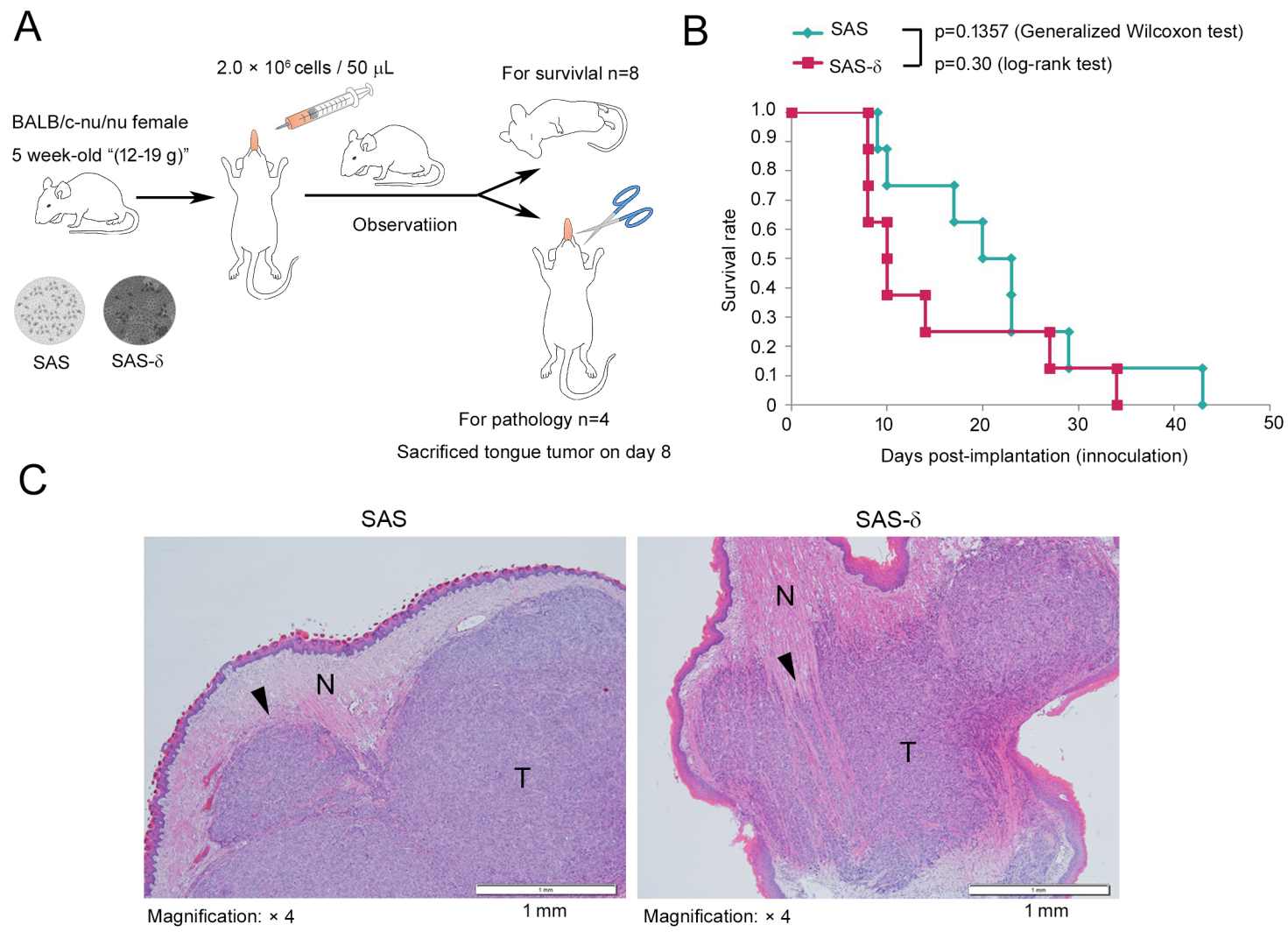


Figure 7 Fujibayashi and Yabuta *et al.*



Supplementary Table 1.

Antibody name	Distribution source	Catalog No.	Concentration	Figure No.
Occcludin (C-terminal) rabbit	SIGMA	SAB4200489	1:500 (WB)	2-A
N-cadherin rabbit	Cell Signaling	4061	1:250 (WB)	2-A
Vimentin (D21H3) XP® rabbit mAb	Cell Signaling	5741	1:500 (WB)	2-A
LATS1 (C66B5) rabbit mAb	Cell Signaling	3477	1:500 (WB)	5-B,C
LATS1-pT1079 (D53D3) rabbit mAb	Cell Signaling	8654	1:100 (WB)	5-B,C
LATS2 rabbit	BETHYL	A300-479A	1:500 (WB)	5-B/C ,6-G
LATS2-pT1041 rabbit	Zhang <i>et al.</i> , 2012		1:250 (WB)	5-B/C
YAP rabbit	Cell Signaling	4912	1:500 (WB)	5-B/C
YAP-pS127 rabbit	Cell Signaling	4911	1:500 (WB)	5-B/C
TAZ (WWTR1) rabbit	SIGMA	HPA007415	1:200 (WB)	5-B/C,6-J
TAZ-pS89 rabbit	SANTA CRUZ	sc-17610-R	1:50 (WB)	5-B/C
MST2 rabbit	Cell Signaling	3952	1:100 (WB)	5-C
MST1-pT183/MST2-pT180 rabbit	Cell Signaling	3681	1:20 (WB)	5-C
SAV1 (D6M6X) rabbit mAb	Cell Signaling	13301	1:500 (WB)	5-C
SLUG (C19G7) rabbit mAb	Cell Signaling	9585	1:500 (WB)	6-E/F/G/J
SLUG-pT208 rabbit	In this study		1:100 (WB)	6-C/D/E/F
SNAIL (L70G2) mouse mAb	Cell Signaling	3895	1:500 (WB)	6-F
SNAIL-pT203 rabbit	In this study		1:100 (WB)	6-F
α -tubulin mouse mAb	SIGMA	T5168	1:2000 (WB)	2-A,5-B/C,6-F/G/J
Lamin A/C (4C11) mouse mAb	Cell Signaling	4777	1:2000 (WB)	6-G
Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody	Cell Signaling	7074	1:1000 (WB)	2-A,5-B/C, 6-C,D,E,F,G,J
Anti-mouse IgG HRP-linked antibody	Cell Signaling	7076	1:2000 (WB)	2-A,5-B/C, 6-E,F,G,J
Phalloidin	SIGMA	P1951	1:800 (IF)	4-F
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H&L)	Invitrogen	A-11029	1:50 (IF)	4-F
Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG (H&L)	Invitrogen	A-11012	1:50 (IF)	4-F

Figure S1 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

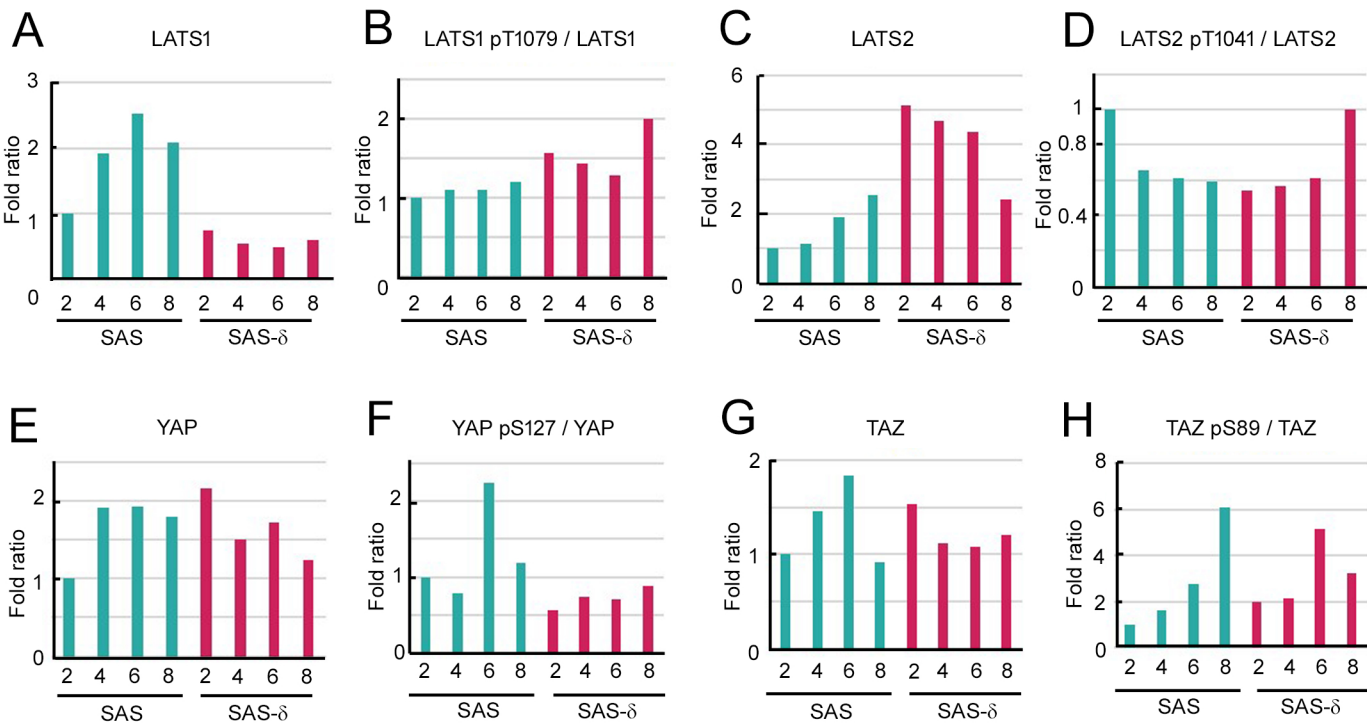


Figure S2 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

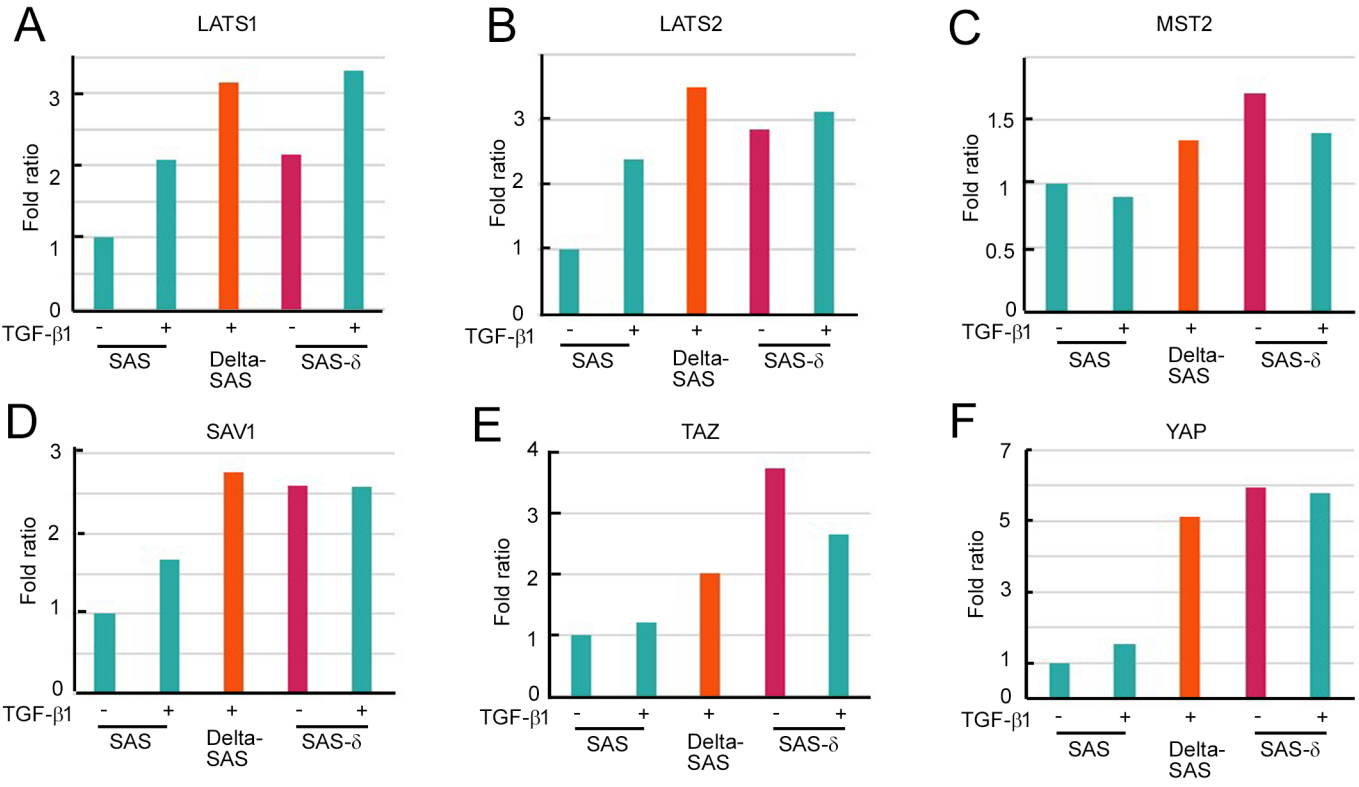


Figure S3 Fujibayashi and Yabuta *et al.*

