



Title	悪性腫瘍進展過程におけるGATA6遺伝子の役割
Author(s)	高山, 峻
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87949
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

悪性腫瘍進展過程における *GATA6* 遺伝子の役割

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

高山 峻

目次

I . 緒言

II . 材料と方法

- i 細胞および培養方法
- ii 口腔癌細胞の過剰発現株およびノックダウン株の樹立
- iii RNA抽出と遺伝子発現の評価（RT-qPCR法）
- iv タンパク発現の評価（Western-Blot法）
- v 細胞増殖能の評価（Proliferation Assay）
- vi 細胞運動能の評価（Wound Healing Assay）
- vii RNA-seq解析・ChIP-atlasによるデータベース解析
- viii 口腔癌頸部リンパ節転移マウスモデルの作製
- ix 免疫細胞染色法
- x 統計分析

III . 結果

- i *GATA6* ノックダウンおよび *GATA6* 過剰発現 OSCC 細胞株の樹立
- ii OSCC 細胞における *GATA6* と EMT の関連
- iii OSCC 細胞のリンパ節転移に対する *GATA6* ノックダウンおよび過剰発現の影響
- iv OSCC 細胞における *GATA6* の標的遺伝子の同定

v	GATA6 ノックダウンおよび <i>GATA6</i> 過剰発現 OSCC 細胞 における <i>ANXA10</i> 発現
vi	<i>ANXA10</i> ノックダウン OSCC 細胞における EMT
vii	<i>ANXA10</i> 過剰発現 OSCC 細胞における EMT
IV .	考 察
V .	総 括
VI .	結 論
VII .	謝 辞
VIII .	脚 注
IX .	図 表
X .	参 考 文 献

I . 緒言

口腔がんは，全悪性腫瘍の 2% を占め，世界では全 36 部位中の 18 番目に多い悪性腫瘍である [1]。口腔領域においては，口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma：OSCC）が高頻度に認められる癌腫であり，国立がん研究センターが発表しているがん種別統計によると，2018 年に約 22,000 人以上が口腔・咽頭がん罹患している [2]。また，OSCC は，根治治療を行ったとしても，口腔機能を低下させ，Quality of Life（QOL）を著しく低下させる [3]。OSCC の早期診断と治療法の進歩があるにもかかわらず，生存率は過去 30 年間大きくは改善されておらず，5 年生存率は 40～50% 程度である [2, 4]。生存率が改善しない主な理由の一つに，頸部リンパ節転移巣の制御が困難であることが挙げられる。口腔癌における頸部リンパ節転移の発生率は 25～60% であり，OSCC 患者の再発リスクや生存率の低下と密接に関連しており，重要な予後因子である [2, 4-6]。リンパ節転移のない患者の 5 年生存率は約 50～70% であるのに対し，リンパ節転移のある患者では 30～50% と著しく低下している [5, 6]。したがって，リンパ節転移の制御率を向上させることにより，再発や遠隔臓器への転移を防ぎ，OSCC 患者の予後を改善できると考えられる。しかし，OSCC におけるリンパ節転移のメカニズムに関しては依然として不明な点が多く残されている。

一方，上皮系の特徴を有する細胞が，間葉系の特徴に形質を転

換させる上皮間葉転換 (epithelial to mesenchymal transition : EMT) は、細胞の運動性と浸潤能を獲得するプロセスであり、悪性腫瘍の転移能獲得の一翼を担っていることが報告されている [7]。また、転移とは腫瘍細胞と宿主の微小環境との相互作用の結果、他の臓器に転移し、そこで腫瘍が増殖する状態であり [8]、我々はこれまでに EMT 変化により、OSCC の VEGF-C 発現を誘導し、リンパ管新生を増加させることによってリンパ節転移を促進することを報告してきた [9]。

GATA6 は、内胚葉系統のマーカーであり、*GATA6* は、(A / T) *GATA* (A / G) 配列に結合して遺伝子発現を活性化または抑制する転写因子の *GATA* ファミリーに属している [10]。悪性腫瘍の発生・進展過程と *GATA6* との関連においては、背反する報告がなされている [11-14]。Whissell らは、*GATA6* は β -カテニン / TCF4 複合体と競合し、*BMP4* 遺伝子の遠位制御領域へ結合することで、結腸直腸癌の発癌を抑制することを報告している [14]。一方で、これとは対照的に、膵臓癌および胃癌において、*GATA6* 発現を抑制することにより、細胞周期を G2 から M 期で停止させ、癌細胞の増殖を阻害し、アポトーシスを誘導するとも報告されている [11,12]。

これら、*GATA6* 発現による発癌抑制と、*GATA6* の発現抑制による癌細胞の増殖抑制と相反するような報告は、*GATA6* の機能が複雑なものである可能性を示唆している。さらに、近年 *GATA6* と EMT との関連を示す報告がいくつかなされている [15,16]。

しかしながら、*GATA6* と OSCC における EMT やリンパ節転移との関連については不明である。

本研究では、*AnnexinA10* (*ANXA10*) が *GATA6* の標的遺伝子の 1 つであることを見出した。また、*GATA6* 発現のノックダウンは、OSCC 細胞における *ANXA10* 発現の抑制を介して EMT を誘導する可能性があり、*GATA6* の発現がマウスモデルのリンパ節転移と逆相関する傾向があることも示した。

II. 材料と方法

i 細胞および培養方法

実験には 10 種類の OSCC 由来の細胞株を使用した (表 1) [9,17-23]。各細胞を 37°C, 5% CO₂ 気相下において, 10% ウシ胎児血清 (FBS: Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX, USA) および 100 µg/ml カナマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium 培地 (D-MEM: 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) で培養し, 実験を行った。

ii OSCC 細胞の過剰発現株およびノックダウン株の樹立

OSCC 由来細胞を目的遺伝子の過剰発現やノックダウンを行うために PiggyBac transposon system を用いてトランスフェクションを行った [24]。このシステムには PiggyBac トランスポゾンベクターとトランスポザラーゼ酵素を一時的に発現するトランスポザラーゼベクターの 2 つのプラスミドが含まれている (表 2)。Lipofectamine3000 (Invitrogen, MA, USA) を用いて Ca9-22 細胞, V-SAS 細胞, V-SAS-LM8 細胞に遺伝子導入を行った。次に, ピューロマイシン 2 µg/ml (Invitrogen) により安定発現株を選別した。

過剰発現株樹立においては, *GATA6* および *ANXA10* 遺伝子を遺伝子導入し, RT-qPCR 法, Western-Blot 法によって過剰発現を確認した。また, ノックダウン株樹立においては *GATA6*, *ANXA10*, コントロールのいずれかを標的とする shRNA-pPB プラスミド

(VectorBuilder, IL, USA)を細胞に遺伝子導入し, RT-qPCR 法, Western-Blot 法によってノックダウンを確認した。

iii RNA 抽出と遺伝子発現の評価 (RT-qPCR 法)

全 RNA は, total RNA isolation system (Monarch Total RNA Miniprep Kit: New England Biolabs, MA, USA)を使用して OSCC 細胞から抽出した。First-strand cDNAs は, ReverTraAce® qPCR RT Master Mix (東洋紡株式会社, 大阪)を使用して合成した。定量的リアルタイム PCR (qPCR) 法は, SYBR Green PCR プロトコルと StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, NJ, USA)を使用して, 1 サンプルにつき n=3 として実施した。なお, 増幅に使用した SYBR Green プライマーを表 3 に示す。

iv タンパク発現の評価 (Western-Blot 法)

全タンパクを使用した Western-Blot 法は, 通法に準じて行った[23]。要約すると, 6cm ディッシュで細胞を培養し, 細胞の増殖密度が 80~90% に達したものをインキュベーターから取り出し, 培養液を除去, 4℃のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: phosphate-buffered saline) で 2 回洗浄し, 全細胞溶解用のバッファー (Ez RIPA Lysis kit: アトー株式会社, 東京)を使用しタンパクを抽出した。核タンパク質の抽出には, Ez Subcell Extract (アトー株式会社)の試薬を使用した。15 分氷上で放置後, 減

菌ヘラで細胞を潰すように回収し，遠心分離機で 10 分間遠心分離（4℃，14000rpm）を行った。サンプルを 50μl 取り，50μl の SDS サンプルバッファー（Ez Apply：アトー株式会社）を加えて混合し，95℃で 5 分間加熱した。上清をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分離し，ポリフッ化ビニリデン膜に転写し，一次抗体でイムノブロットし，Super Signal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate（Thermo Fisher Scientific，MA，USA）を使用して西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスまたは抗ウサギ IgG 抗体を可視化した。Gene Gnome（SynGene，Cambridge，UK）を使用し，画像を撮影した。使用した抗体を表 4 に示す。

v 細胞増殖能の評価（Proliferation Assay）

OSCC 細胞に 0.25%トリプシン EDTA 溶液（富士フイルム和光純薬株式会社）を加え，細胞培養液で回収。細胞懸濁液を遠心分離機で遠心後，細胞数を 1000 個/well に合わせ，96well プレートに細胞懸濁液を各 100μl（ 1×10^4 個/ml）播種した。37℃で 24 時間インキュベートし，Cell Counting Kit-8（同仁化学研究所，熊本）を使用して 24 時間ごとに細胞増殖を測定した。測定時に各 well に Cell Counting Kit-8 を 10μl 追加し，37℃で 1 時間インキュベートさせた。100μl ずつ取り測定用に準備した 96well に移し，マイクロプレートリーダー（iMark：Bio-Rad Laboratories Inc.，CA，USA）を用いて 450nm の吸光度で測定した。なお，

各アッセイは 6 回行った。

vi 細胞運動能の評価 (Wound Healing Assay)

24well プレートにカルチャーインサート (ibidi GmbH, Bayern, Germany) をセットし, 細胞培養液で細胞懸濁液を作製し, 各 well に入れ 24 時間 CO₂ 存在下, 37°C でインキュベートした。完全な単層が形成されたことを確認した後, カルチャーインサートを除去する 1 時間前に, シトシン b-D-アラビノフラノシド塩酸塩 (10 μM: Sigma-Aldrich, MO, USA) を使用し細胞増殖を停止させ, カルチャーインサートを除去した (細胞間に 500 μm ± 100 μm の間隙を作製)。細胞の移動量は, 24 時間後に位相差顕微鏡で観察し, その距離を測定した。なお, 各アッセイは 3 回行った。

vii RNA-seq 解析・ChIP-atlas によるデータベース解析

ライブラリー調整は TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina, CA, USA) を使用して行った。シーケンスは 75 ベースのシングルエンドモードで Illumina HiSeq2500 プラットフォームを使用した。Illumina Casava1.8.2 ソフトウェアをベースコールに使用し, シーケンスされたリードを, TopHat バージョン 2.0.13 と Bowtie2 バージョン 2.2.3 および SAMtools バージョン 0.1.19 を組み合わせて使用し, ヒトリファレンスゲノムシーケンス (hg19) にマッピングした。Cuffnorm バージョン 2.2.1

を使用して，マップされたフラグメント（FPKM）100 万あたりのエクソンのキロベースあたりのフラグメントを計算した[25]。さらなる遺伝子発現分析のために，増強した遺伝子（2.0 倍以上）や減少した遺伝子（0.5 倍未満）を同定した。全ての遺伝子の平均 MACS2 スコアは，ChIP-Atlas（<https://doi.org/10.15252/embr.201846255>）の「TargetGenes」ツールを使用して，「Antigens」を *GATA6*，「Distance from TSS」パラメーターには $\pm 10\text{k}$ として取得された。遺伝子名を用いて ChIP-seq データを上記で作成した RNA-seq データに統合した。

viii 口腔癌頸部リンパ節転移マウスモデルの作製

全ての動物実験は事前に大阪大学大学院歯学研究科内動物実験委員会の審査を受け，承認を得た。

5～6 週齢の雄性免疫不全 BALB/c nu/nu マウス（日本 SLC，静岡）に，メデトミジン（0.3 mg/kg 体重，Domitor®：日本全薬工業株式会社，東京），ミダゾラム（4.0 mg/kg 体重，Dormicum®：アステラス製薬株式会社，東京），ブトルファノール（5.0 mg/kg 体重，Vetorphale®：Meiji Seika ファルマ株式会社）の 3 種混合麻酔を行った。

Venus 遺伝子を安定発現させたヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株（V-SAS 細胞の *GATA6* ノックダウン株，V-SAS-LM8 細胞の *GATA6* 過剰発現株： $1 \times 10^6/100\mu\text{l}$ ）を細胞培養液で懸濁し， $100\mu\text{l}$ を舌に接種した[26]。腫瘍形成ならびに頸部リンパ節転移の確

認は，LED-EXTA/GFP（オプトコード株式会社，東京）で蛍光観察を行った。マウスの頸部に皮膚切開を加え，顎下および頸部のリンパ節を剖出，観察し，蛍光が確認されたものを転移ありと評価した。

ix 免疫細胞染色法

細胞をスライドガラス上で 18～20 時間培養し，4% パラホルムアルデヒドで固定した。PBS で洗浄し，1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で 1 時間ブロッキングした後，スライドを抗体とインキュベートした（表 4）。PBS で洗浄し，Alexa Fluor555 標識抗ウサギまたは抗ヤギ IgG 抗体（Invitrogen, Carlsbad, CA; 1：500）を室温で 1 時間インキュベートした。最後にスライドを DAPI Fluoromount-G 封入剤（SouthernBiotech, AL, USA）で封入した。

x 統計分析

すべての実験結果データは平均 $\pm$ SD として提示した。独立した 2 群の比較は Student's t 検定を使用して，2 $\times$ 2 分割表の検定は Fisher's exact probability 検定を使用して，統計学的に解析した。 p 値は 0.05 未満を統計学的有意差ありとした。

Ⅲ． 結 果

i *GATA6* ノックダウンおよび *GATA6* 過剰発現 OSCC 細胞株の樹立

10 種類の OSCC 細胞における *GATA6* の発現について RT-qPCR 法で評価した結果，全ての口腔癌細胞株で *GATA6* の発現を認めた（図 1）。

GATA6 の発現と EMT との関係を解明するために，「材料と方法」で示したように，shRNA を遺伝子導入し，*GATA6* をノックダウンした OSCC 細胞株（V-SAS/shG6-1・-2，Ca9-22/shG6-1・-2）を樹立した。次にコントロール shRNA を遺伝子導入した V-SAS 細胞（V-SAS/shCtrl）と *GATA6* をノックダウンした V-SAS 細胞（V-SAS/shG6-1・-2）で *GATA6* の発現を確認した。*GATA6* の発現は，V-SAS/shCtrl と比較して，shRNA（V-SAS/shG6-1・-2）を遺伝子導入した V-SAS 細胞では，mRNA レベル（図 2A）およびタンパク質レベル（図 2B）の双方において有意に減少した。同様に，Ca9-22 細胞においても *GATA6* の発現は，Ca9-22/shCtrl と比較して，shRNA（Ca9-22/shG6-1・-2）を遺伝子導入した Ca9-22 細胞では mRNA レベル（図 2A）およびタンパク質レベル（図 2B）の双方において有意に減少した。免疫細胞染色では，コントロールと比較して，V-SAS/shG6（-1・-2）および Ca9-22/shG6（-1・-2）の *GATA6* 発現低下が確認された（図 2C）。同様に，*GATA6* 過剰発現細胞株（V-SAS-LM8/G6）を樹立した。コントロール株である V-SAS-LM8/ctrl と比較して，*GATA6*

遺伝子を遺伝子導入した V-SAS-LM8/G6 細胞で *GATA6* の発現は mRNA レベル (図 2D) とタンパク質レベル (図 2E) において有意に増加していることを確認した。さらに、免疫細胞染色は、コントロール細胞と比較して、V-SAS-LM8/G6 における *GATA6* の発現増加が確認された (図 2F)。また、Proliferation Assay および Wound Healing Assay においては、増殖能、運動能ともにコントロールと比較して、ノックダウン細胞株や過剰発現細胞株で有意な変化は認めなかった (図 3)。

ii OSCC 細胞における *GATA6* と EMT の関連

樹立した *GATA6* ノックダウンおよび過剰発現細胞株を用いて OSCC 細胞における EMT マーカーの発現の変化を検討した。まず、上皮系から間葉系への細胞形態の変化は EMT の代表的な指標であることから [27], コントロール細胞と *GATA6* ノックダウン細胞や過剰発現細胞との形態変化を評価した。その結果、V-SAS/shG6 (-1・-2) や Ca9-22/shG6 (-1・-2) 細胞は、コントロール細胞と比較してやや紡錘形の形態を示していた。この変化は、細胞間接着の喪失により細胞間が分離したことが示唆される (図 4)。対照的に、V-SAS-LM8/G6 細胞は、コントロール細胞と比較して、敷石状の細胞間接着を示した。これらの結果は、*GATA6* の発現が EMT を阻害する可能性を示唆している。*GATA6* 発現と EMT との関連をさらに検討するために、E-cadherin と vimentin の発現に関して検討した。E-cadherin の発現減少と

vimentin の発現増加は EMT の特徴として広く知られている [7]。免疫細胞染色において，コントロール細胞と比較して，V-SAS および Ca9-22 の *GATA6* ノックダウン細胞は E-cadherin の発現減少と vimentin の発現増加が認められた（図 5A）。さらに，上皮系マーカーと間葉系マーカーの mRNA 発現を RT-qPCR 法にて検討した結果，上皮系マーカーとしての E-cadherin の mRNA 発現は抑制され，N-cadherin, vimentin などの間葉系マーカーや，EMT の転写因子として知られる *TWIST*, *ZEB1*, *SLUG* の発現が上昇していることが明らかとなった（図 5B,C）。また，*GATA6* 過剰発現株では，免疫細胞染色において，コントロール細胞と比較して，V-SAS-LM8 の *GATA6* 過剰発現細胞は E-cadherin の発現上昇と vimentin の発現減少が認められた（図 5D）。上皮マーカーである E-cadherin の mRNA 発現が上昇し，間葉系マーカーである N-cadherin, vimentin の発現が抑制されたが（図 5E），EMT の転写因子として知られる *TWIST*, *ZEB1*, *SLUG* の発現に変化は認められなかった（図 5F）。これらの結果は OSCC 細胞においては *GATA6* の発現抑制は EMT 誘導を促進し，*GATA6* の過剰発現は EMT 誘導を抑制するが，*GATA6* の過剰発現は EMT 関連の転写因子の発現には影響しないことを示している。

iii OSCC 細胞のリンパ節転移に対する *GATA6* ノックダウン および過剰発現の影響

in vivo でのリンパ節転移における *GATA6* の役割を解明するた

めに、V-SAS 細胞や V-SAS-LM8 細胞をヌードマウスの舌に接種し、リンパ節転移を検討した。*GATA6* ノックダウン株である V-SAS/shG6-1 を接種した担癌マウスのリンパ節転移は、コントロール担癌マウスと比較して増加傾向を示したが、有意差は認めなかった(図 6A)。また、*GATA6* 過剰発現株である V-SAS-LM8/G6 を接種した担癌マウスのリンパ節転移は、コントロール担癌マウスと比較して減少傾向を示したが、これも有意差は認めなかった(図 6B)。

iv OSCC 細胞における *GATA6* の標的遺伝子の同定

GATA6 により遺伝子発現が活性化される標的遺伝子を同定するために、樹立した 2 種類の *GATA6* ノックダウン OSCC 細胞株を用いて RNA-seq 解析とデータベース解析 (ChIP-Atlas) を行った。まず、RNA-seq を使用して、*GATA6* ノックダウンにより発現が減弱した遺伝子を網羅的に検索した。図 7 のヒートマップに見られるように、V-SAS 細胞と Ca9-22 細胞の *GATA6* ノックダウンによって、2 種類の細胞株で同様に発現が減弱した遺伝子はわずかしき認められなかった。図 8 に示すようにコントロールと比較してノックダウン株で発現量が半分以下に減少した遺伝子が V-SAS 細胞では 336 個、Ca9-22 細胞には 395 個認められ、これらのうち、36 個の遺伝子が両方の細胞で重複して同定された(表 5)。次に、これら 36 個の遺伝子の中から ChIP-Atlas を用いて *GATA6* のターゲット遺伝子を検索した結果、9 個

の遺伝子を同定した(表 6)。これら 9 個の遺伝子のうち、コントロール細胞と比較して、Ca9-22 の *GATA6* ノックダウン細胞で最も発現が減少していた、*ANXA10* に着目した。

v *GATA6* ノックダウンおよび *GATA6* 過剰発現 OSCC 細胞における *ANXA10* 発現

続いて、V-SAS/shG6 細胞と Ca9-22/shG6 細胞における *ANXA10* の mRNA およびタンパクレベルでの発現を RT-qPCR 法(図 9A)、Western-Blot 法(図 9B)で確認したところ、どちらの細胞株でも発現が抑制されていることが確認され、これは RNA-seq の結果と一致するものであった。一方、コントロール細胞と比較して *GATA6* 過剰発現株である V-SAS-LM8/G6 細胞で *ANXA10* の mRNA およびタンパクレベルでの発現は、有意に上昇していた(図 9C,D)。

vi *ANXA10* ノックダウン OSCC 細胞における EMT

ANXA10 の発現と EMT との関連を検討するために、shRNA (shAX10-1・shAX10-2) の遺伝子導入を行い、*ANXA10* をノックダウンした OSCC 細胞株 (V-SAS/shAX10-1・-2, Ca9-22/shAX10-1・-2) を樹立した。コントロール shRNA を遺伝子導入した V-SAS 細胞 (V-SAS/shCtrl) と *ANXA10* shRNA を遺伝子導入した V-SAS 細胞 (V-SAS/shAX10-1・-2) で *ANXA10* の発現を確認した。*ANXA10* の発現は、mRNA レベルにおいて、V-

SAS/shCtrl と比較して、V-SAS/shAX10-1・-2 細胞で有意に減少していた(図 10A)。また、Ca9-22 細胞でもこれと同様に、*ANXA10* の発現は、mRNA レベルにおいて、shRNA を遺伝子導入した Ca9-22 細胞(Ca9-22/shAX10-1・-2)で有意に減少していた(図 10A)。さらに、これら *ANXA10* のノックダウン細胞で E-cadherin と N-cadherin の mRNA 発現は shAX10-1・-2 で安定した変化が認められなかったが、vimentin はその発現が有意に上昇していた(図 10B)。

vii *ANXA10* 過剰発現 OSCC 細胞における EMT の発現

最後に *ANXA10* を遺伝子導入し、*ANXA10* 過剰発現 OSCC 細胞(V-SAS-LM8/AX10)を樹立し、EMT 関連マーカーの発現を検討した。V-SAS-LM8/ctrl と比較して mRNA レベルにおいて、*ANXA10* を遺伝子導入した V-SAS-LM8/AX10 細胞では *ANXA10* の有意な発現増加を確認した(図 11A)。次に、EMT 関連マーカーの発現を検討した結果、E-cadherin と N-cadherin の mRNA 発現は変化しなかったが、vimentin は *ANXA10* の過剰発現細胞でコントロール細胞と比較して、その発現が抑制されていた(図 11B)。これは、*ANXA10* が *GATA6* の EMT 制御メカニズムにおける vimentin の発現調節に関与している可能性を示唆するものである。

IV. 考察

頸部リンパ節転移は、OSCC患者の生存率低下と有意に相関し、OSCC患者の重要な予後因子として知られている[5,6]。リンパ節転移の根底にある分子メカニズムをよりよく理解することは、OSCCの効果的な治療法と早期診断の開発にとって重要であり、それがQOLと生存率の向上につながるにもかかわらず、リンパ節転移のメカニズムは依然として不明な点が多く残されている。

本研究では、*GATA6*をノックダウンした2つのOSCC細胞株と*GATA6*を過剰発現させたOSCC細胞株を用いて、OSCCにおける*GATA6*とEMTやリンパ節転移との関連について、その分子メカニズムの解明を試みた。

*GATA6*をノックダウンしたOSCC細胞は、コントロールのOSCC細胞と比較して、EMTが促進されることが明らかとなった。一方、*GATA6*を過剰発現させたOSCC細胞は、EMTが抑制された。さらに、転写因子である*GATA6*の標的遺伝子として*ANXA10*を同定した。*ANXA10*は、*GATA6*によるOSCCでのEMT誘導阻害機構において、*vimentin*の発現抑制に関与している可能性があることが示された。

現在まで、*GATA6*と口腔癌との関連についての報告はほとんどなされていない。ある研究では*GATA6*タンパク質発現が隣接する正常組織と比較して口腔癌組織で増加したと報告している[28]。また、他のグループの報告では、口腔癌細胞株において*GATA6*の発現が確認されるものの、*GATA6*の口腔癌発癌・進展

過程における関与についてはさらに研究が必要であると結論付けられている[29]。本研究においても複数の口腔癌細胞株で確認したところ、*GATA6*発現は認めるものの、発現量は細胞株によって様々であった。

*GATA6*は一部の癌ではEMTを促進するが、別の癌ではEMTを抑制することが報告されている。Songらは、乳癌での*GATA6*の過剰発現がEMTを増加させ、分化度が高い乳癌細胞において*GATA6*の発現を抑制するとEMTが阻害されることを報告した[30]。彼らは*GATA6*が*SLUG*の転写を活性化することでEMT誘導を促進し、さらに*SLUG*のノックダウンは*GATA6*によるEMT誘導を抑制することを発見した。また、Dengらは、*GATA6*の過剰発現が胆管癌の浸潤と転移を促進し[31,32]、*GATA6*が胆管癌の*MUC1*/ β -カテニン経路を介してEMTを促進することを示した[16]。また、Tangらは、miR-944が*GATA6*発現を抑制することにより、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して結腸直腸癌細胞のEGF誘発性EMTを抑制することを発見した[33]。これらの報告のように*GATA6*発現がEMTを誘導するという報告がある一方で*GATA6*発現がEMT誘導を抑制するとの報告もある。Martinelliらは、ヒト膵管腺癌細胞において、*GATA6*は*FOXA1/2*などの転写因子の調節を含むメカニズムを通じて、直接的（上皮系および間葉系の発現遺伝子の調節）または間接的（上皮系および間葉系の転写因子の調節）に細胞の脱分化とEMTを阻害することや、*GATA6*発現低下が膵管腺癌の分化度の

変化や患者の全生存期間の短縮に有意に関連していることを報告した[15]。彼らは *GATA6* が EMT を抑制する機能を有し，上皮系の遺伝子活性とそれに伴う間葉系の遺伝子抑制の両方を含む独自のメカニズムを持っており，その機能は直接的または間接的な二重の作用であることから，*GATA6* がそのような特性を備えた最初の EMT レギュレーターであると述べている[15]。

本研究の結果では，膵管腺癌と同様に，OSCC において *GATA6* の発現を抑制することによって EMT は誘導され，逆に *GATA6* を過剰発現させることによって阻害された。しかしながら，*GATA6* の発現を抑制することで変化した *TWIST* などの EMT 関連転写因子の発現変化は，*GATA6* の過剰発現においてはその変化を認めなかった。つまり，これらの結果は，口腔癌における *GATA6* による EMT 阻害メカニズムにも直接のおよび間接的な作用があることを示唆しており，*GATA6* の間接作用による EMT 関連転写因子の発現抑制は，*GATA6* 単独の効果ではなく，他の因子と関連した効果であることを示している可能性がある。その一方で，我々は以前，高リンパ節転移細胞株である V-SAS-LM8 は，親株である V-SAS と比較して EMT が誘導されていることを報告したが[9]，これらの細胞株では *GATA6* の発現量に有意な変化は見られないため，V-SAS-LM8 の EMT 誘導には *GATA6* 以外の因子が関与していると考えられる。これは癌の EMT 制御機構の複雑さを示唆している。

また，*GATA6* の標的遺伝子として同定された *ANXA10* は，

Annexin A ファミリーの一つである。Annexin A は Annexin のサブクラスとして知られており、真核細胞における Ca^{2+} 調節リン脂質結合タンパク質であり、細胞の分化と増殖の調節や小胞輸送、エキソサイトーシス、エンドサイトーシス、カルシウムチャンネル形成などのさまざまな細胞学的、生理学的プロセスで重要な役割を果たしている [34, 35]。また、*ANXA10* の過剰発現や発現低下が肺癌、漿液性上皮性卵巣癌、膀胱癌、食道扁平上皮癌、胆管癌、膵臓癌を含む様々な癌に関係しているが、その役割は癌によって異なる [36–40]。*ANXA10* が MAPK シグナル伝達経路を阻害することにより、OSCC 細胞の増殖を阻害するとの報告 [41]があることは特筆すべきことではあるが、その他の研究では、*ANXA10* は発癌において重要な役割を果たすという報告と、腫瘍抑制に重要な役割を果たすとの両方の報告がなされており、腫瘍形成と腫瘍増殖における *ANXA10* の役割についてはまだまだ議論の余地があると言える。例えば、*ANXA10* の過剰発現は、前立腺癌細胞の増殖、遊走、および浸潤を阻害することが示された [42]が、*ANXA10* は正常な膵臓、慢性膵炎、良性の管内粘液性腺腫と比較して、膵臓腺癌で高度に発現するという矛盾した報告もなされている [40]。また、*ANXA10* が腸型腺癌と比較してびまん性型腺癌でより発現されるとの報告もあり、同じ悪性腫瘍内においても、異なる発現パターンを有する可能性がある [43]。さらに、Sun らは、*ANXA10* は胆管癌の独立した予後因子であり、*PLA2G4A/PGE2/STAT3* 経路を介して EMT を促

進することにより，胆管癌の進行を促進し，転移を促進することを報告した[38]。本研究では，Sunらの報告とは逆の結果ではあるが，*ANXA10*の発現抑制により *vimentin*の発現は促進され，EMTの一部に関与していた。

VI. 総括

- 1) OSCC 細胞の *GATA6* ノックダウン株および *GATA6* 過剰発現株を樹立した。
- 2) *GATA6* ノックダウン株では EMT 誘導が促進された。
- 3) *GATA6* 過剰発現株では EMT 誘導が抑制されたが EMT 関連転写因子の発現変化は認めなかった。
- 4) 頸部リンパ節転移マウスモデルにおいて、*GATA6* ノックダウン株ではリンパ節転移が促進される傾向を認め、*GATA6* 過剰発現株では減少傾向を認めた。
- 5) OSCC における *GATA6* の標的遺伝子として *ANXA10* を同定した。
- 6) OSCC 細胞の *ANXA10* ノックダウン株と *ANXA10* 過剰発現株を樹立した。
- 7) *ANXA10* ノックダウン株では E-cadherin, N-cadherin の安定した発現変化は認めなかったが、vimentin の発現は有意に上昇した。
- 8) *ANXA10* 過剰発現株では E-cadherin, N-cadherin の発現に差は認められなかったが、vimentin の発現が有意に抑制された。

VII. 結論

本研究では、*GATA6* が OSCC における EMT レギュレーターであることを確認し、*GATA6* 発現は EMT 誘導を抑制することにより、OSCC のリンパ節転移を抑制する可能性があることを示した。さらに、本研究結果は *GATA6* の標的遺伝子として同定された *ANXA10* が、*GATA6* による OSCC の EMT 誘導阻害機構における vimentin の発現抑制に関与している可能性を示唆している。*GATA6/ANXA10* カスケードは、EMT 誘導を阻害し、リンパ節転移を抑制する可能性があり、OSCC 患者のリンパ節転移に対する治療の潜在的な分子ターゲットとなる可能性がある。

VII. 謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂き，終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第二教室)鶴澤成一教授に深甚なる謝意を表します。また，本研究の遂行にあたり，多大な御援助，御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第二教室)今井智章講師，森田祥弘助教に深く感謝致します。最後に，この研究に対して多大なる御協力と御助言を頂いた顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第二教室)の皆様 に厚くお礼申し上げます。

IX. 脚注

本論文の要旨の一部は，第 65 回 日本口腔外科学会総会・学術大会（2021 年，東京）において発表した。

X . 図 表

表 1

細胞の種類	樹立年	樹立者	詳細
Ca9-22	1979	Horikoshi et al.	ヒト歯肉癌由来細胞株。EGF-R高発現細胞。
Sa3	1993	Harada et al.	上顎歯肉由来扁平上皮癌。
T3M-1 Clone2	1978	Okabe et al.	口腔扁平上皮癌でG-CSF産生する。
HO-1-u-1	1985	Sugiyama et al.	ヒト扁平上皮癌由来細胞株。
SCCKN	1992	Urade et al.	ブレオマイシン高感受性舌癌細胞株。
HSC-2	1989	Momose et al.	ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株。
HSC-3	1989	Momose et al.	ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株。
HSC-4	1989	Momose et al.	ヒト舌癌由来細胞株。
V-SAS	2012	Morita et al.	ヒト舌癌由来細胞株。Venus遺伝子を導入。
V-SAS-LM8	2015	Morita et al.	ヒト舌癌由来細胞株。リンパ節高転移株。

表 1 本研究で使用した細胞株のリスト。V-SAS, V-SAS-LM8 以外は全て理化学研究所から提供された。

表 2

Piggy Bac vector	Vector ID
pRP[Exp]-CAG>hyPBase	VB900088-2874gzt
pPB[shRNA]-Puro-U6>Scramble[shRNA#1]	VB010000-0039sus
pPB[shRNA]-Puro-U6>hGATA6[shRNA#1]	VB900095-1765jrh
pPB[shRNA]-Puro-U6>hGATA6[shRNA#2]	VB900096-2981tjy
pPB[Exp]-Puro-CAG>Stuffer300	VB010000-9294rpr
pPB[Exp]-Puro-CAG>hGATA6	VB900002-0288wtr
pPB[shRNA]-Puro-U6>hANXA10[shRNA#1]	VB900085-1356vtw
pPB[shRNA]-Puro-U6>hANXA10[shRNA#3]	VB900085-1367zqy

表 2 本研究の遺伝子導入で使用した PiggyBac ベクターのリスト。これらのベクターは Vector Builder から購入した。ベクターに関する詳細な情報は vectorbuilder.com で取得可能。

表 3

Gene name		Sequence (5' → 3')
<i>GATA6</i>	Forward	CTCAGTTCCTACGCTTCGCAT
	Reverse	GTCGAGGTCAGTGAACAGCA
E-cadherin	Forward	CGAGAGCTACACGTTACGG
	Reverse	GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG
N-cadherin	Forward	AGCCAACCTTAACTGAGGAGT
	Reverse	GGCAAGTTGATTGGAGGGATG
vimentin	Forward	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC
	Reverse	CATTTACGCATCTGGCGTTC
<i>TWIST</i>	Forward	GTCCGCAGTCTTACGAGGAG
	Reverse	GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT
<i>ZEB1</i>	Forward	CAGCTTGATACCTGTGAATGGG
	Reverse	TATCTGTGGTCGTGTGGGACT
<i>SLUG</i>	Forward	CGAACTGGACACACATACAGTG
	Reverse	CTGAGGATCTCTGGTTGTGGT
<i>ANXA10</i>	Forward	GCTGGCCTCATGTACCCAC
	Reverse	CAAGCAGTAGGCTTCTCGC
β -actin	Forward	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
	Reverse	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

表 3 qPCR 法 で 使 用 し た SYBR Green プライマーの一覧。

表 4

Antibody	Dilution	Company
GATA6	ICC (10 μ g/ml) , WB (1 μ g/ml)	R&D
LaminB1	WB (1:5000)	Proteintech
E-cadherin	ICC (1:50)	Proteintech
vimentin	ICC (1:50)	Proteintech
ANXA10	WB (0.1 μ g/ml)	Novus
GAPDH	WB (1:20000)	Proteintech

表 4 本研究で免疫細胞染色，Western blot 法に使用した抗体の一覧。

表 5

<i>SNORA61</i>	<i>ALPP</i>	<i>RALGAPA1P</i>
<i>SNORA72</i>	<i>SLC16A5</i>	<i>AQP3</i>
<i>SNORA5C</i>	<i>C8orf37-AS1</i>	<i>LOC284080</i>
<i>SNORA76C</i>	<i>LINC00853</i>	<i>ANO2</i>
<i>RPS17</i>	<i>WISP2</i>	<i>GATA6</i>
<i>SNORA15</i>	<i>SSBP2</i>	<i>OTUD1</i>
<i>SNORA14B</i>	<i>NEBL-AS1</i>	<i>KLK11</i>
<i>SCARNA11</i>	<i>HIST1H2AB</i>	<i>KLK9</i>
<i>FAM25BP</i>	<i>C15orf65</i>	<i>RAD51L3-RFFL</i>
<i>ANXA10</i>	<i>SERF2-C15ORF63</i>	<i>CAPN3</i>
<i>LOC101929229</i>	<i>LCMT1-AS1</i>	<i>TGIF2-C20orf24</i>
<i>LOC101927571</i>	<i>CCL26</i>	<i>CH17-360D5.1</i>

表 5 RNA-seq の結果から *GATA6* 発現がノックダウンされたことで，発現が半分未満に減少した遺伝子の一覧。

表 6

Gene name	Ca9-22 (Fold change)	V-SAS (Fold change)
<i>ANXA10</i>	-7.907	-2.291
<i>ALPP</i>	-3.455	-2.047
<i>SLC16A5</i>	-3.236	-3.024
<i>SSBP2</i>	-2.824	-2.092
<i>C15orf65</i>	-2.536	-2.978
<i>CCL26</i>	-2.393	-2.235
<i>AQP3</i>	-2.323	-2.071
<i>GATA6</i>	-2.258	-4.392
<i>CAPN3</i>	-2.034	-2.854

表 6 ChIP-Atlas による分析を RNA-seq の結果と統合し，*GATA6* の標的遺伝子候補として特定された 9 つの遺伝子のリストとそれらの発現変化。

図 1

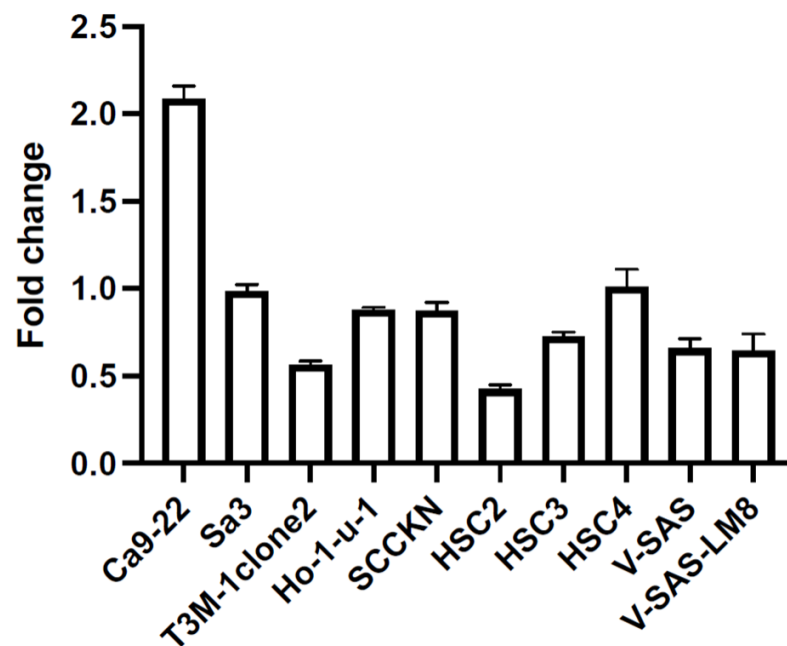


図 1 10 種類の OSCC 細胞株における *GATA6* の発現

10 種類の OSCC 細胞における *GATA6* の mRNA 発現について RT-qPCR 法で評価した結果、全ての口腔癌細胞株で *GATA6* の発現を認めた。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正した。値は平均値および標準偏差を示す。

図 2

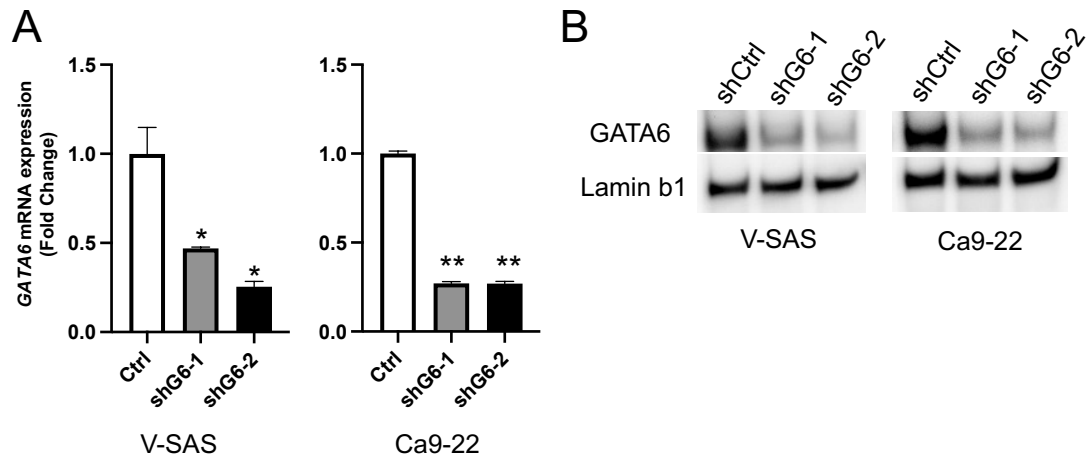


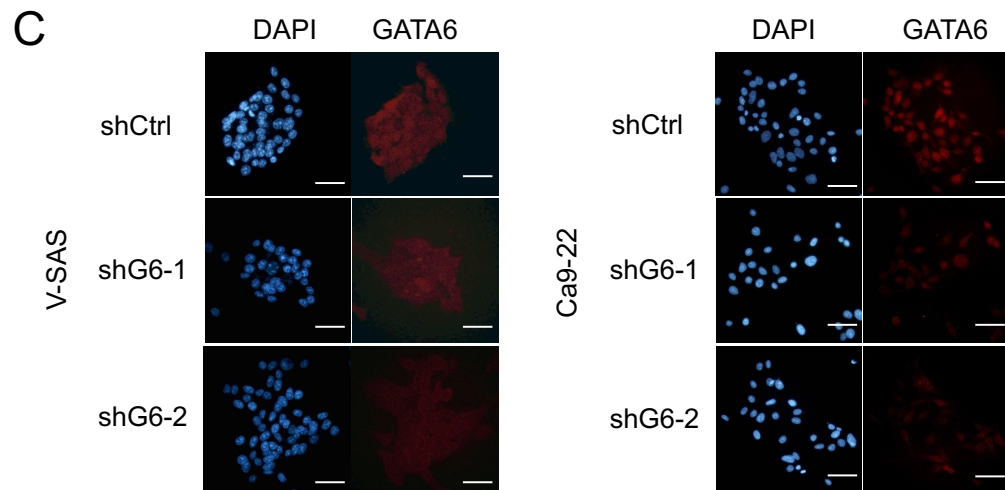
図 2 OSCC 細胞における *GATA6* ノックダウンと過剰発現の効果

(A) *GATA6* の mRNA 発現量を示す。V-SAS/shCtrl と比較して、shRNA (V-SAS/shG6-1・-2) を遺伝子導入した V-SAS 細胞では有意に減少した。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。

値は平均値および標準偏差を示す。* : $p < 0.01$, ** : $p < 0.001$ 。

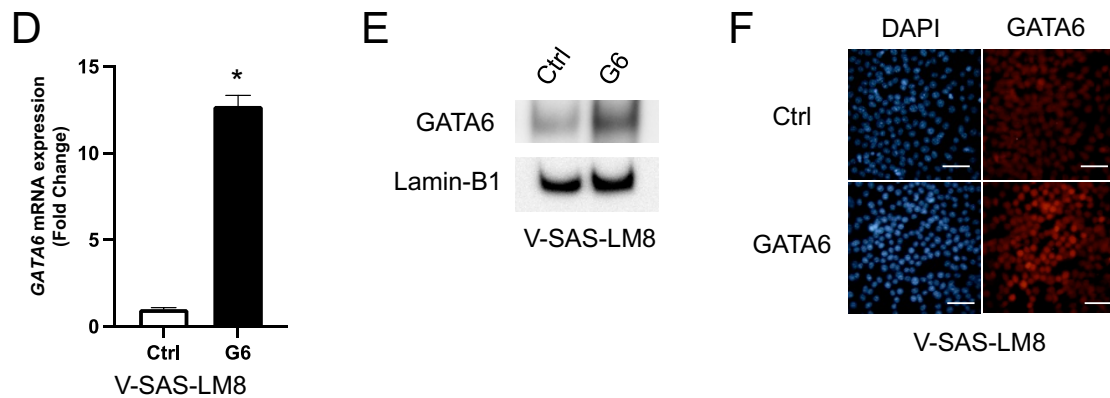
(B) *GATA6* のタンパク発現量を示す。V-SAS/shCtrl と比較して、shRNA (V-SAS/shG6-1・-2) を遺伝子導入した V-SAS 細胞では有意に減少した。抗 *GATA6* 抗体 (上) と、内部コントロールとして抗 LaminB1 (下) を用いた。

図 2



(C) 免疫細胞染色における GATA6 発現の評価。コントロールと比較して、V-SAS/shG6(-1・-2)および Ca9-22/shG6(-1・-2)の GATA6 発現低下が確認された。赤：GATA6，青色：DAPI。スケールバー：50 μ m。

図 2



(D) *GATA6* の mRNA 発現量を示す。V-SAS-LM8/ctrl と比較して、V-SAS-LM8/G6 細胞で *GATA6* の mRNA の発現は有意に増加していた。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。* : $p < 0.001$ 。

(E) *GATA6* のタンパク発現量を示す。V-SAS-LM8/ctrl と比較して、V-SAS-LM8/G6 細胞で *GATA6* の発現はタンパク質レベルにおいて有意に増加していた。

抗 *GATA6* 抗体(上)と内部コントロールとして抗 LaminB1(下)を用いた。

(F) 免疫細胞染色における *GATA6* 発現の評価。V-SAS-LM8/ctrl と比較して、V-SAS-LM8/G6 における *GATA6* の発現増加が確認された。赤 : *GATA6*, 青色 : DAPI。スケールバー : 50 μ m。

図 3

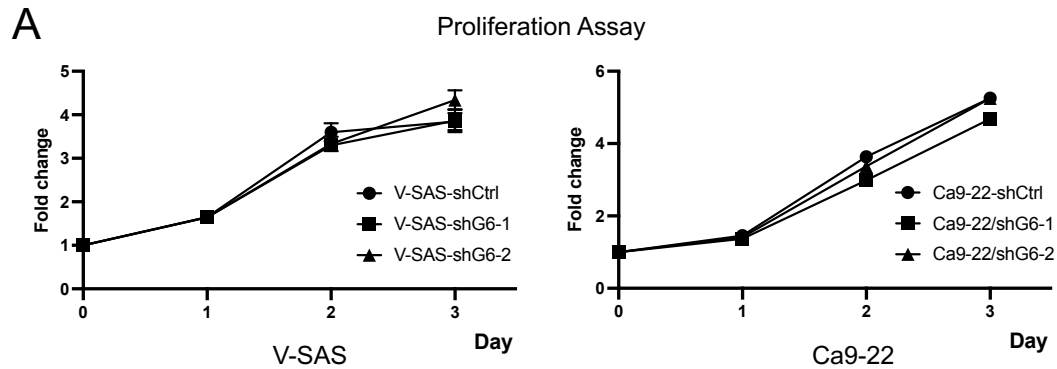
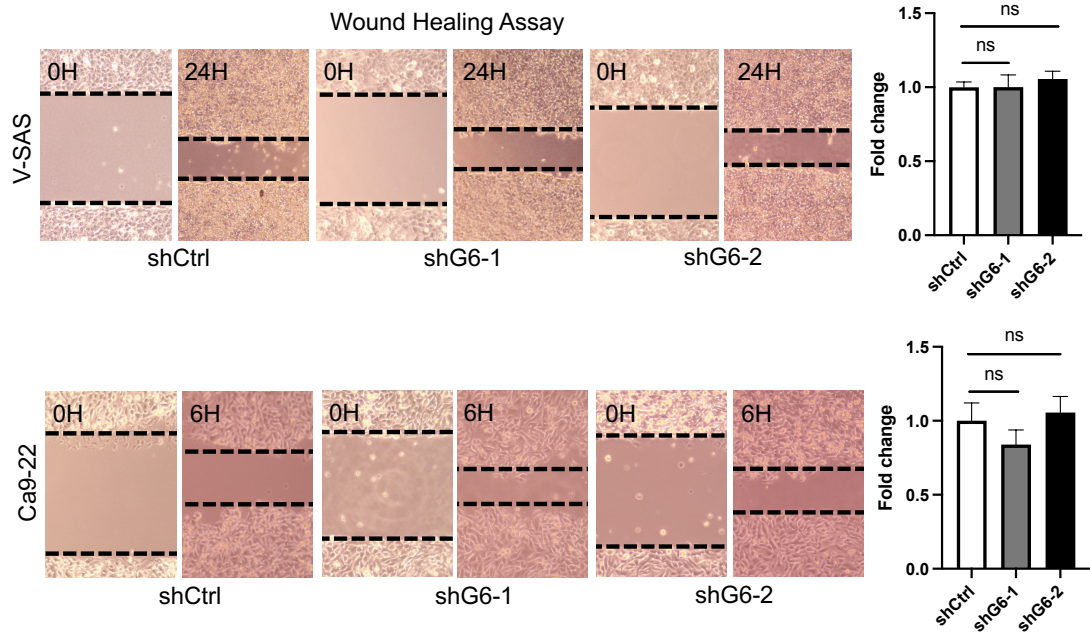


図 3 *GATA6* ノックダウンおよび過剰発現 OSCC 細胞の増殖能と遊走能の評価

(A) Proliferation Assay においては，V-SAS/shCtrl，Ca9-22/shCtrl と比較して，V-SAS/shG6-1・-2 および Ca9-22/shG6-1・-2 細胞で有意な変化は認めなかった。24 時間培養時点を Day0 とし，グラフは Day0 の測定値 O.D. (光学濃度，optical density) の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す (n=6)。

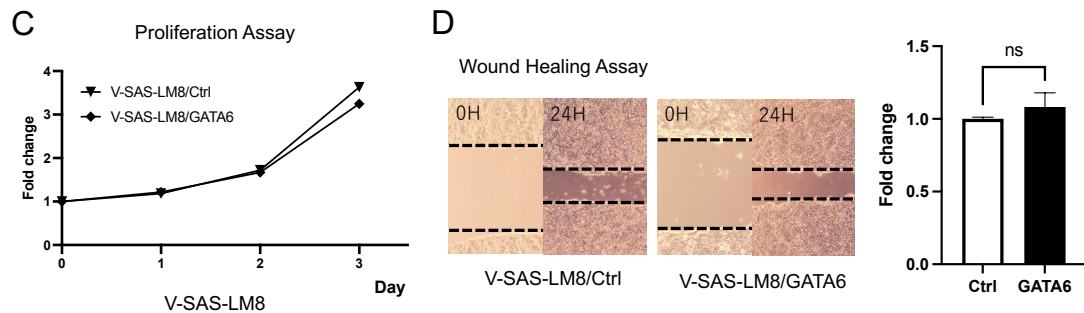
図 3

B



(B) Wound Healing Assay においては，コントロールと比較して，*GATA6* をノックダウン細胞株で有意な変化は認めなかった。グラフの値は〔測定開始時の幅〕－〔測定終了時の幅〕で求め，コントロール群の倍数で示し，平均値および標準偏差で示した（ $n=3$ ）。

図 3



(C) Proliferation Assay においては，V-SAS-LM8/Ctrl 細胞と比較して，V-SAS-LM8/G6 細胞で有意な変化は認めなかった。24 時間培養時点を Day0 とし，グラフは Day0 の測定値 O.D.(光学濃度，optical density)の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す (n=6)。

(D) Wound Healing Assay においては，V-SAS-LM8/Ctrl 細胞と比較して，V-SAS-LM8/G6 細胞で有意な変化は認めなかった。グラフの値は [測定開始時の幅] - [測定終了時の幅] で求め，コントロール群の倍数で示し，平均値および標準偏差で示した (n=3)。

図 4

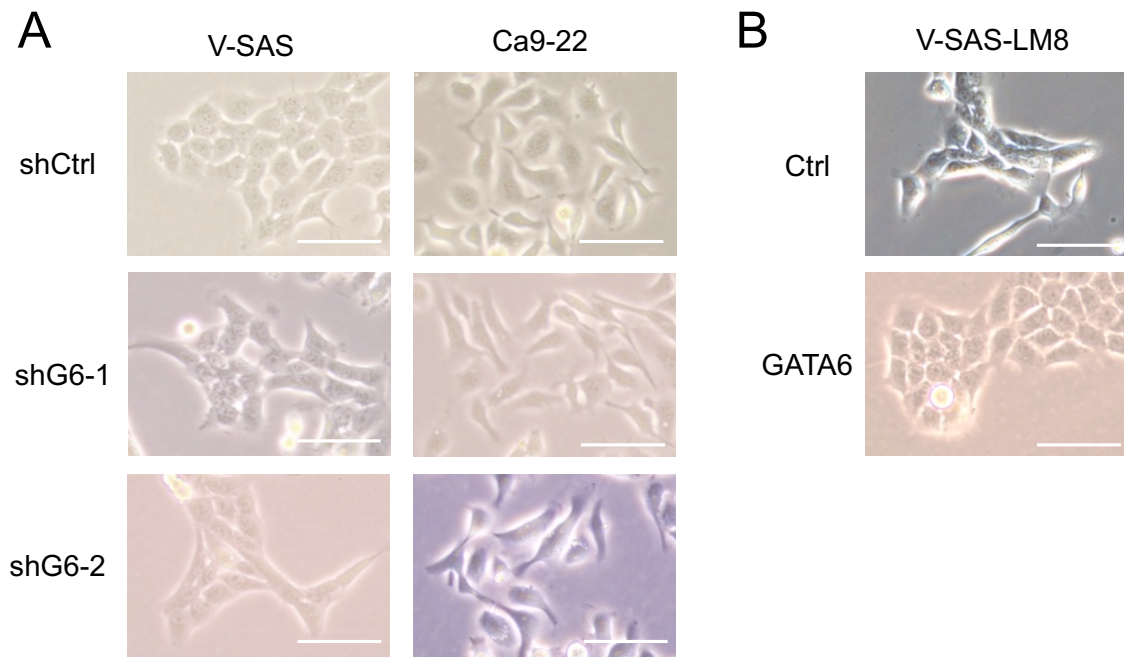


図 4 代表的な位相差顕微鏡画像

(A) V-SAS/shG6 (-1・-2) や Ca9-22/shG6 (-1・-2) 細胞は、コントロール細胞が敷石状の細胞間接着を示したのに対して、やや紡錘形の形態を示していた。スケールバー：100μm。

(B) V-SAS-LM8/G6 細胞は、コントロール細胞では紡錘形の形態を示しているのに対して、敷石状の細胞間接着を示した。スケールバー：100μm。

図 5

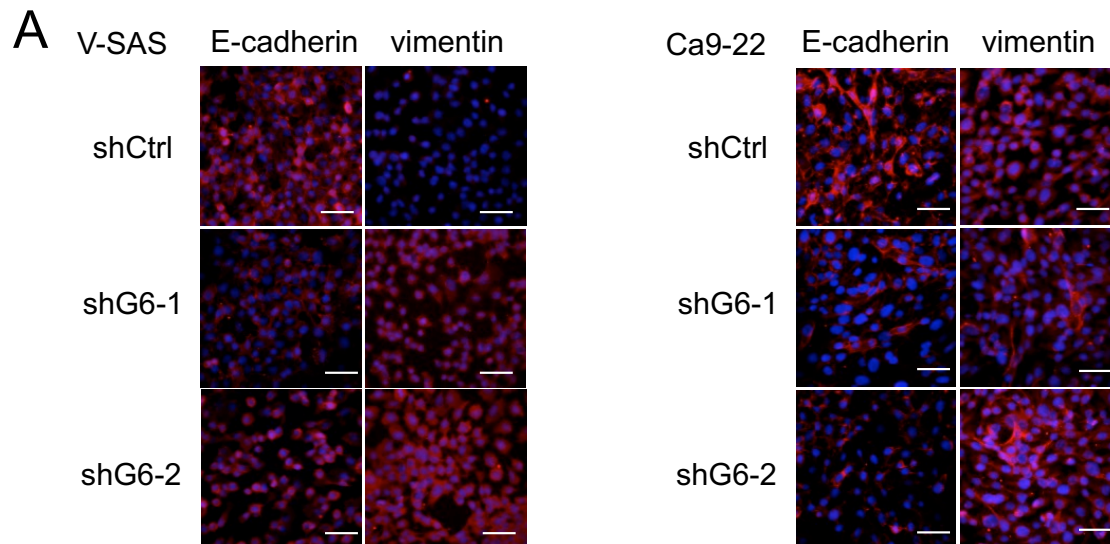
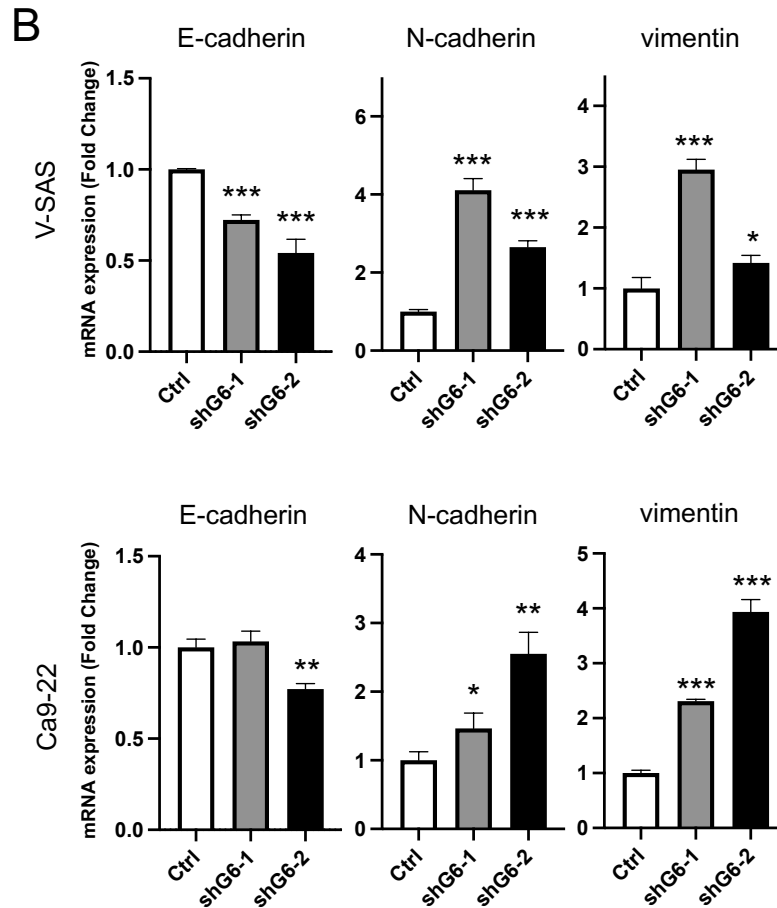


図 5 GATA6 ノックダウン，過剰発現 OSCC 細胞における上皮間葉転換（EMT）

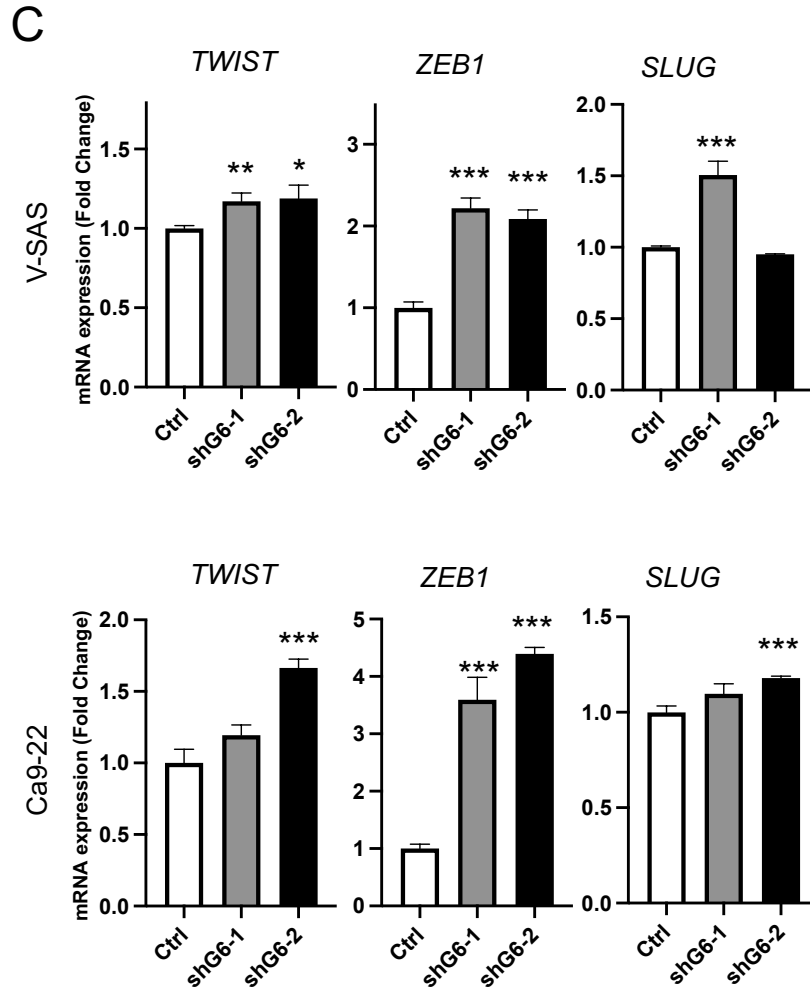
（A）免疫細胞染色における E-cadherin および vimentin タンパク発現の評価。コントロール細胞と比較して，V-SAS および Ca9-22 の GATA6 ノックダウン細胞は E-cadherin の発現減少と vimentin の発現増加が認められた。赤：E-cadherin・vimentin，青色：DAPI。スケールバー：50μm。

図 5



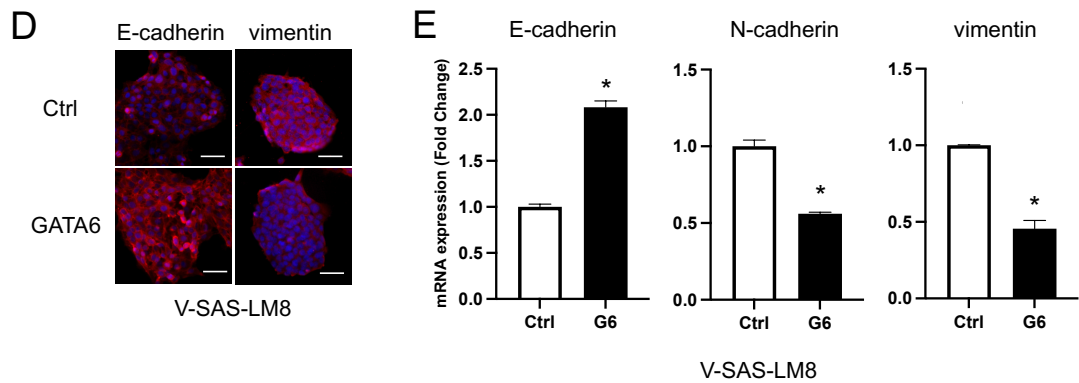
(B) EMT マーカの mRNA 発現量を示す。V-SAS 細胞, Ca9-22 細胞において, 上皮系マーカーである E-cadherin の mRNA 発現は抑制され, 間葉系マーカーである N-cadherin, vimentin の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し, コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。

図 5



(C) EMT 関連転写因子の mRNA 発現量を示す。V-SAS 細胞，Ca9-22 細胞において，*TWIST*，*ZEB1*，*SLUG* の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し，コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ ，***： $p < 0.001$ 。

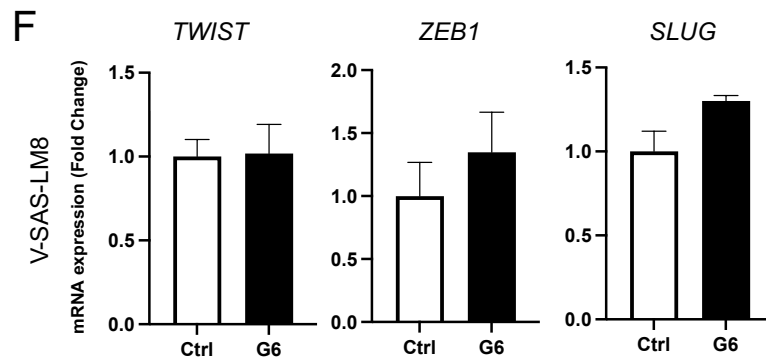
図 5



(D) 免疫細胞染色における E-cadherin および vimentin タンパク発現の評価。V-SAS-LM8 のコントロール細胞と比較して、GATA6 過剰発現細胞は E-cadherin の発現上昇と vimentin の発現減少が認められた。赤：E-cadherin および vimentin, 青：DAPI。スケールバー：50 μm。

(E) EMT マーカーの mRNA 発現量を示す。E-cadherin の mRNA 発現が上昇し、N-cadherin, vimentin の発現が有意に抑制された。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。*： $p < 0.001$ 。

図 5



(F) EMT 関連転写因子の mRNA 発現量を示す。V-SAS-LM8 細胞において *GATA 6* の過剰発現で *TWIST*, *ZEB1*, *SLUG* の mRNA 発現量に変化は認められなかった。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。

図 6

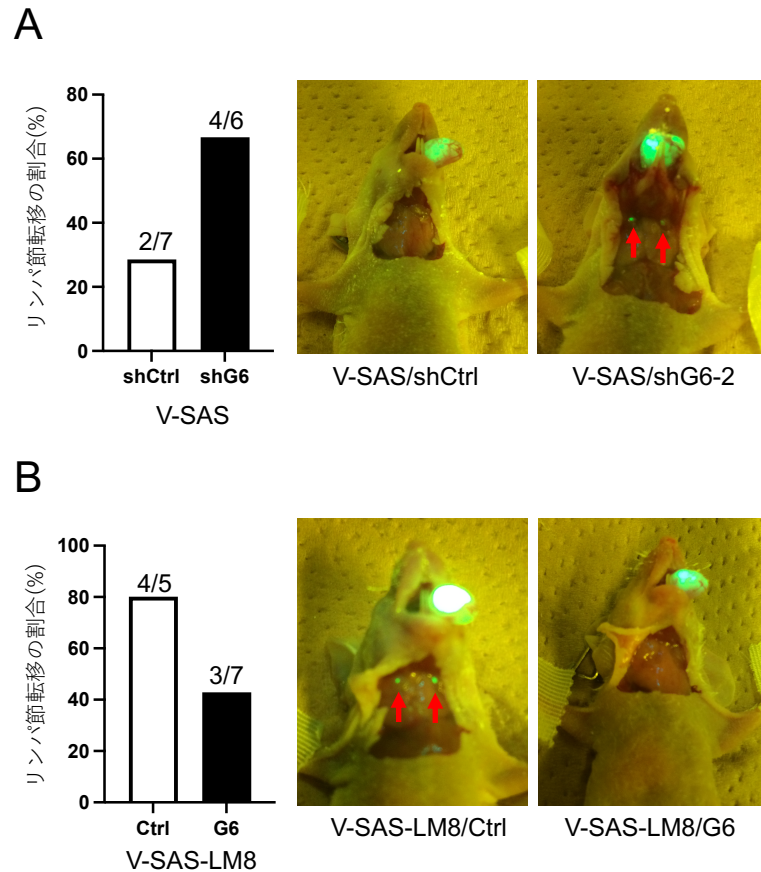


図 6 リンパ節転移に対する *GATA6* のノックダウン，過剰発現の影響

(A) V-SAS 細胞 (0.1ml 培地中: 1×10^6 個) を 5 週齢の雄 BALB/c スードマウスの舌に接種し，接種 14 日後にマウス頸部を評価した。グラフは V-SAS/shCtrl (n=7) および V-SAS/shG6-1 (n=6) 担癌マウスにおけるリンパ節転移個体数の割合を示す。*GATA6* のノックダウンで転移が促進される傾向を認めた。

(B) V-SAS-LM8 細胞 (0.1ml 培地中: 1×10^6 個) を 5 週齢の雄 BALB/c スードマウスの舌に接種し，接種 14 日後にマウス頸部を評価した。グラフは V-SAS-LM8/Ctrl (n=5) および V-SAS-LM8/G6 (n=7) 担癌マウスにおけるリンパ節転移個体数の割合を示す。*GATA6* の過剰発現で転移が抑制される傾向を認めた。

図 7

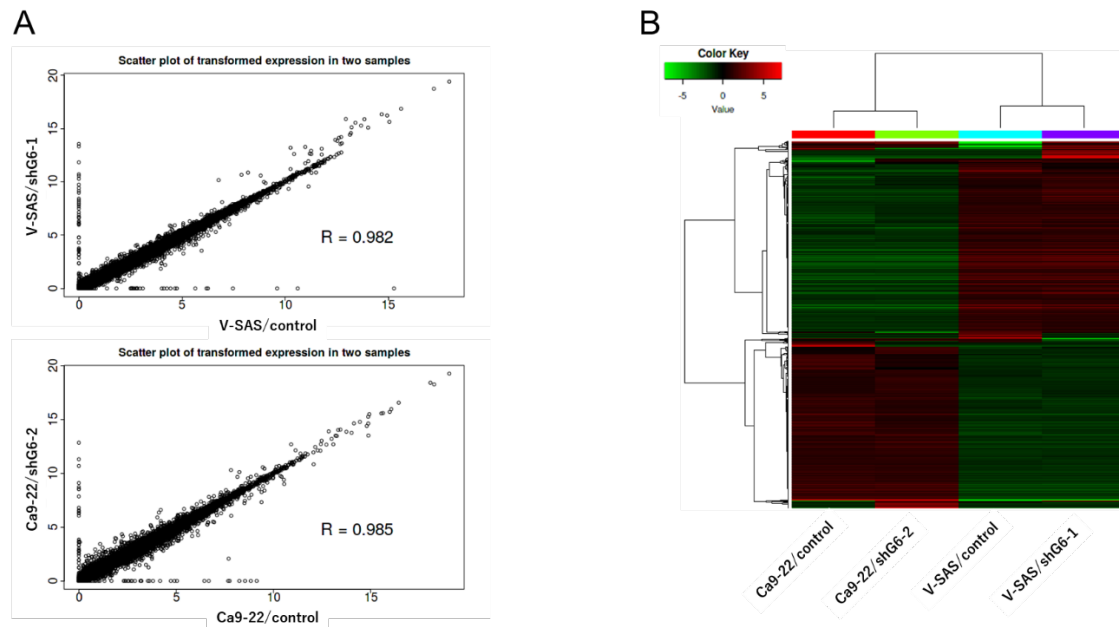


図 7 RNA-seq 発現解析の散布図とヒートマップ

(A) *GATA6* ノックダウン OSCC 細胞の RNA-seq 発現データの散布図を示す。FPKM が 1 以上の転写産物を解析対象とした。

(B) 転写産物量をサンプル間で比較したヒートマップを示す。赤は高発現の転写産物を表し、緑は低発現の転写産物を表す。

図 8

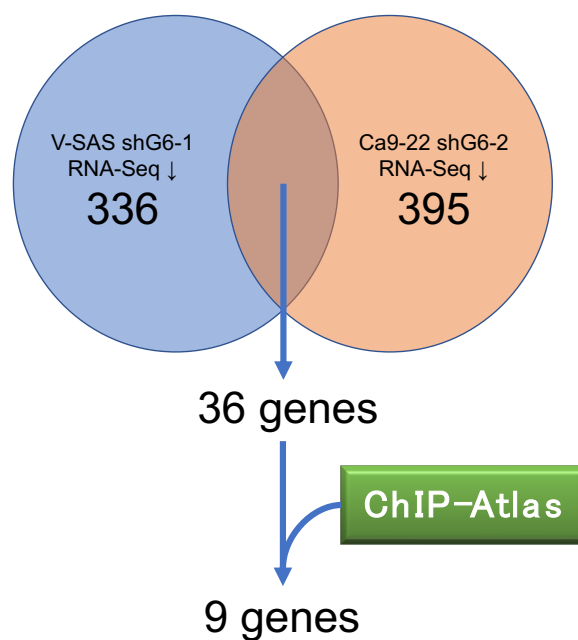


図 8 *GATA6* 転写標的遺伝子候補選択のフローチャート

コントロール細胞と比較して V-SAS/shG6-1 および Ca9-22/shG6-2 での発現量が半分未満の遺伝子の重なりを示す図と、ChIP-Atlas による遺伝子検索との統合を表すフローチャートを示す。

図 9

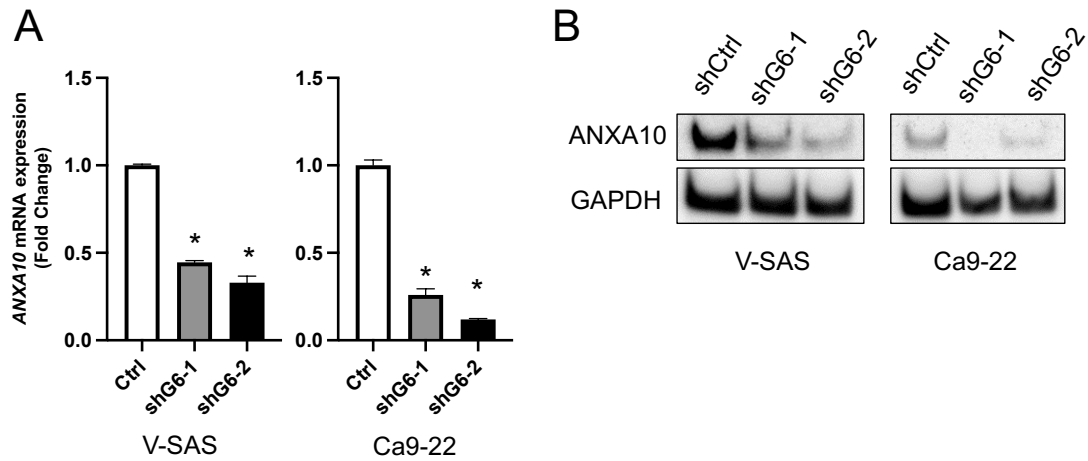
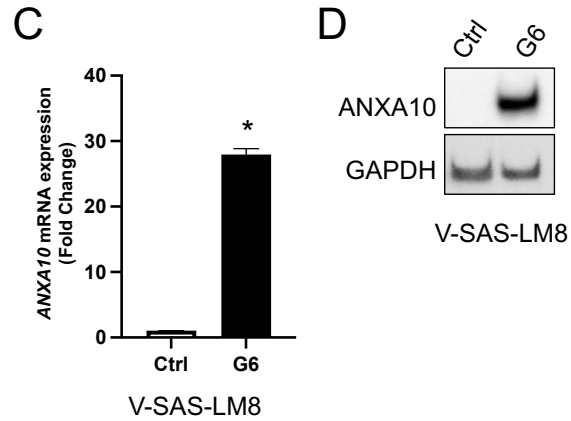


図 9 *GATA6* ノックダウン，過剰発現 OSCC 細胞における *ANXA10* の発現

(A) *ANXA10* の mRNA 発現量を示す。V-SAS/shG6 細胞と Ca9-22/shG6 細胞で *ANXA10* の発現が有意に抑制されていた。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し，コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。*： $p < 0.001$ 。

(B) *ANXA10* のタンパク発現量を示す。V-SAS/shG6 細胞と Ca9-22/shG6 細胞で *ANXA10* のタンパクレベルでの発現が抑制されていた。抗 *ANXA10* 抗体（上）および内部コントロールとして抗 GAPDH 抗体（下）を用いた。

図 9



(C) *ANXA10* の mRNA 発現量を示す。V-SAS-LM8/Ctrl 細胞と比較して V-SAS-LM8/G6 細胞では *ANXA10* の発現量が有意に上昇していた。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。* : $p < 0.001$ 。

(D) *ANXA10* のタンパク発現量を示す。V-SAS-LM8/Ctrl 細胞と比較して V-SAS-LM8/G6 細胞で *ANXA10* のタンパクレベルでの発現量は上昇していた。抗 ANXA10 抗体 (上) および内部コントロールとして抗 GAPDH 抗体 (下) を用いた。

図 10

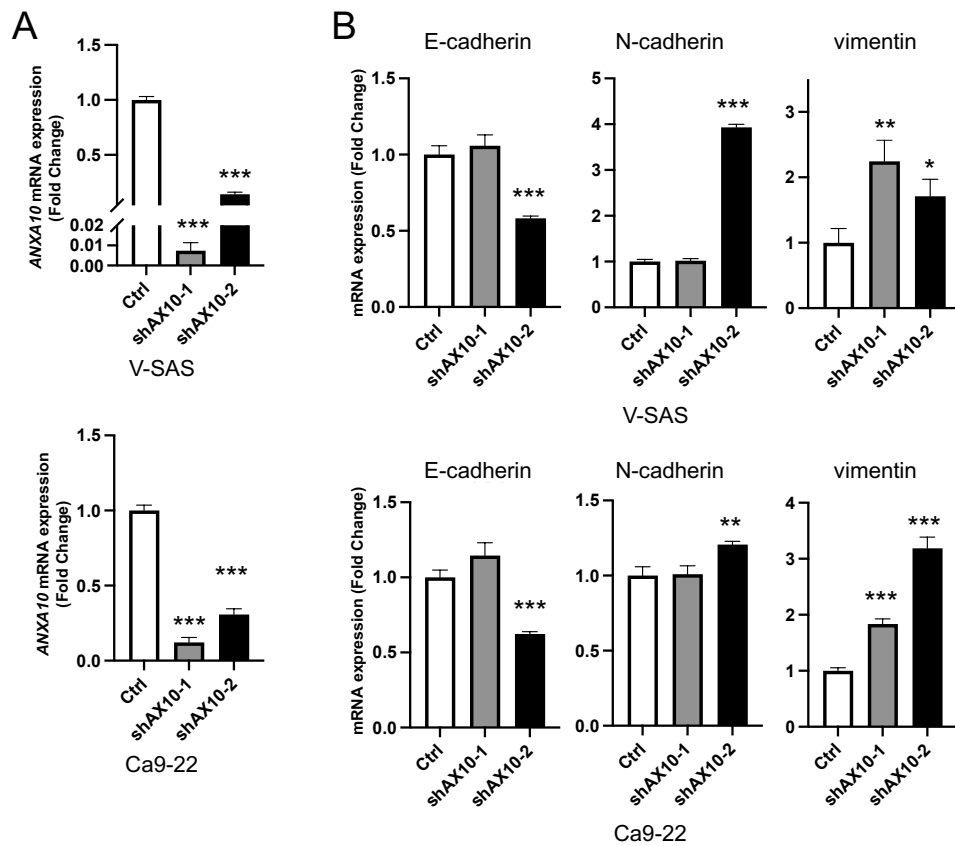


図 10 OSCC 細胞における *ANXA10* のノックダウンの効果

(A) *ANXA10* の mRNA 発現量を示す。V-SAS/shCtrl 細胞と比較して、V-SAS/shAX10-1・-2 細胞で *ANXA10* の発現量は有意に減少していた。また、Ca9-22/shCtrl 細胞での *ANXA10* の発現も、Ca9-22/shAX10-1・-2 細胞で有意に減少していた。

(B) EMT マーカーの mRNA 発現量を示す。*ANXA10* のノックダウン細胞で E-cadherin と N-cadherin の mRNA 発現は shAX10-1・-2 で安定した変化が認められなかったが、vimentin はその発現が有意に上昇していた。各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。

図 11

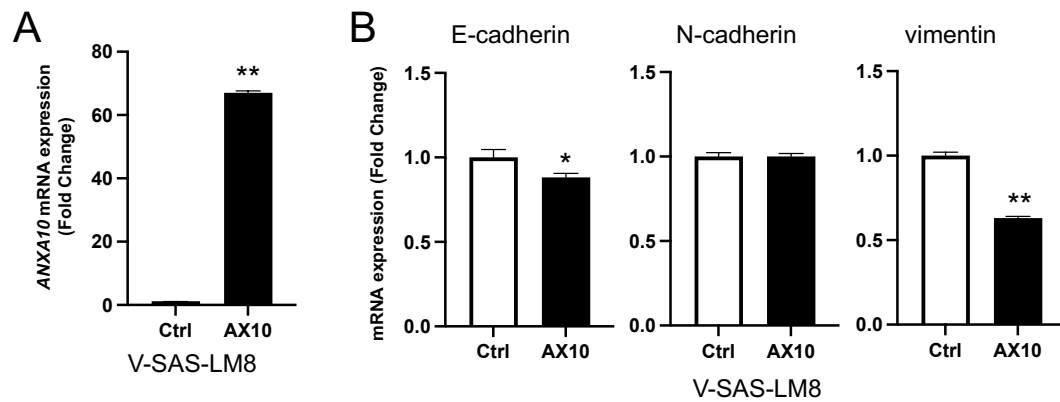


図 11 OSCC 細胞における *ANXA10* 過剰発現の効果

(A) *ANXA10* の mRNA 発現量を示す。V-SAS-LM8/ctrl と比較して V-SAS-LM8/AX10 細胞では *ANXA10* の発現量が有意に増加した。

(B) EMT マーカーの mRNA 発現量を示す。V-SAS-LM8/ctrl と比較して V-SAS-LM8/AX10 細胞では E-cadherin と N-cadherin の mRNA 発現は変化しなかったが、vimentin はその発現が有意に抑制されていた。

各遺伝子発現量は β -actin の発現量で補正し，コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.001$ 。

V. 参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2021;71:209–49.
- [2] CANCER STATISTICS IN JAPAN 2021 n.d.
- [3] Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. Nat Rev Cancer 2005;5:127–35.
- [4] Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. N Engl J Med 2001;345:1890–900.
- [5] Gil Z, Carlson DL, Boyle JO, Kraus DH, Shah JP, Shaha AR, et al. Lymph node density is a significant predictor of outcome in patients with oral cancer. Cancer 2009;115:5700–10.
- [6] Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. Am J Surg 1994;168:494–8.
- [7] Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. Pathology 2007;39:305–18.
- [8] Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer 2009;9:239–52.
- [9] Morita Y, Hata K, Nakanishi M, Omata T, Morita N, Yura Y, et al. Cellular fibronectin 1 promotes VEGF-C expression, lymphangiogenesis and lymph node metastasis associated

- with human oral squamous cell carcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis* 2015; 32:739–53.
- [10] Maeda M, Ohashi K, Ohashi-Kobayashi A. Further extension of mammalian GATA-6. *Development, Growth & Differentiation* 2005; 47:591–600.
- [11] Sulahian R, Casey F, Shen J, Qian ZR, Shin H, Ogino S, et al. An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer. *Oncogene* 2014;33:5637–48.
- [12] Chen WB, Huang FT, Zhuang YY, Tang J, Zhuang XH, Cheng WJ, et al. Silencing of GATA6 suppresses SW1990 pancreatic cancer cell growth in vitro and up-regulates reactive oxygen species. *Digestive Diseases and Sciences* 2013;58:2518–27.
- [13] Cai WS, Shen F, Li JL, Feng Z, Wang YC, Xiao HQ, et al. Activated protease receptor-2 induces GATA6 expression to promote survival in irradiated colon cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014;555–556:28–32.
- [14] Whissell G, Montagni E, Martinelli P, Hernando-Momblona X, Sevillano M, Jung P, et al. The transcription factor GATA6 enables self-renewal of colon adenoma stem cells by repressing BMP gene expression. *Nature Cell Biology* 2014;16:695–707.
- [15] Martinelli P, Carrillo-De Santa Pau E, Cox T, Sainz B, Duseti N, Greenhalf W, et al.

GATA6 regulates EMT and tumour dissemination, and is a marker of response to adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Gut* 2017;66:1665–76.

- [16] Deng X, Jiang P, Chen J, Li J, Li D, He Y, et al. GATA6 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through MUC1/ β -catenin pathway in cholangiocarcinoma. *Cell Death & Disease* 2020;11.
- [17] Momose F, Araida T, Negishi A, Ichijo H, Shioda S, Sasaki S. Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 1989;18:391–5.
- [18] Urade M, Ogura T, Mima T, Matsuya T. Establishment of human squamous carcinoma cell lines highly and minimally sensitive to bleomycin and analysis of factors involved in the sensitivity. *Cancer* 1992;69:2589–97.
- [19] Sugiyama A, Ishiguro M, Yasue T, Watanabe S, Sugishita N, Yokoyama H, et al. [An autopsy case of triple cancer associated with superior vena cava syndrome]. *Gan no rinsho Japan journal of cancer clinics* 1985;31:1347–52.
- [20] Okabe T, Sato N, Kondo Y, Asano S, Ohsawa N, Kosaka K, et al. Establishment and Charac-

- terization of a Human Cancer Cell Line That Produces Human Colony-stimulating Factor. *Cancer Research* 1978;38.
- [21] Horikoshi M, Kimura Y, Nagura H, Ono T, Ito H. [A new human cell line derived from human carcinoma of the gingiva. I. Its establishment and morphological studies]. *Nihon Koku Geka Gakkai Zasshi* 1974;20:100-6.
- [22] Harada M, Miyata K, Wada T, Ohmata T, Morita N, Sakamoto T. Establishment and characterization of a cell line (Sa3) from squamous cell carcinoma of the human gingiva. *Japanese Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 1993;39:965-71.
- [23] Morita Y, Hata K, Nakanishi M, Nishisho T, Yura Y, Yoneda T. Cyclooxygenase-2 promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2012;41:885-92.
- [24] Park MA, Jung HS, Slukvin I. Genetic Engineering of Human Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposon System. *Current Protocols in Stem Cell Biology* 2018;47.
- [25] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology* 2010;28:511-5.
- [26] Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, et al. Expression of

- cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol* 2002;38:235–43.
- [27] Scanlon CS, van Tubergen EA, Inglehart RC, D'Silva NJ. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Journal of Dental Research* 2013;92:114–21.
- [28] Deng L, Liu H. MicroRNA-506 suppresses growth and metastasis of oral squamous cell carcinoma via targeting GATA6. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015;8:1862.
- [29] Xu CL, Guan WQ, Wang XY. The expression of the GATA6 gene in oral carcinoma cell lines. *World Journal of Surgical Oncology* 2021;19.
- [30] Song Y, Tian T, Fu X, Wang W, Li S, Shi T, et al. GATA6 is overexpressed in breast cancer and promotes breast cancer cell epithelial-mesenchymal transition by upregulating slug expression. *Experimental and Molecular Pathology* 2015;99:617–27.
- [31] Tian F, Chen J, Zheng S, Li D, Zhao X, Jiang P, et al. miR-124 targets GATA6 to suppress cholangiocarcinoma cell invasion and metastasis. *BMC Cancer* 2017;17.
- [32] Tian F, Li D, Chen J, Liu W, Cai L, Li J, et al. Aberrant expression of GATA binding protein 6 correlates with poor prognosis and promotes metastasis in cholangiocarcinoma.

- European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990) 2013;49:1771–80.
- [33] Tang JT, Gao W, Liu G, Sheng WW, Zhou JP, Dong Q, et al. miR-944 Suppresses EGF-Induced EMT in Colorectal Cancer Cells by Directly Targeting GATA6. *Oncotargets and Therapy* 2021;14:2311–25.
- [34] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiological Reviews* 2002;82:331–71.
- [35] Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005;6:449–61.
- [36] Kodaira H, ichiro Koma Y, Hosono M, Higashino N, Suemune K, Nishio M, et al. ANXA10 induction by interaction with tumor-associated macrophages promotes the growth of esophageal squamous cell carcinoma. *Pathology International* 2019;69:135–47.
- [37] Munksgaard PP, Mansilla F, Brems Eskildsen AS, Fristrup N, Birkenkamp-Demtröder K, Uhløi BP, et al. Low ANXA10 expression is associated with disease aggressiveness in bladder cancer. *British Journal of Cancer* 2011;105:1379–87.
- [38] Sun R, Liu Z, Qiu B, Chen T, Li Z, Zhang X, et al. Annexin10 promotes extrahepatic cholangiocarcinoma metastasis by facilitating EMT via PLA2G4A/PGE2/STAT3 pathway. *EBioMedicine* 2019;47:142–55.
- [39] Wang J, Zhao S, Wang F, Wang J, Zhang Y.

Prognostic Significance of Increased Expression of Annexin A10 (ANXA10) in Serous Epithelial Ovarian Cancer. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research 2019;25: 5666–73.

- [40] Zhu J, Wu J, Pei X, Tan Z, Shi J, Lubman DM. Annexin A10 is a candidate marker associated with the progression of pancreatic precursor lesions to adenocarcinoma. PloS One 2017;12.
- [41] Shimizu T, Kasamatsu A, Yamamoto A, Koike K, Ishige S, Takatori H, et al. Annexin A10 in human oral cancer: biomarker for tumoral growth via G1/S transition by targeting MAPK signaling pathways. PloS One 2012;7.
- [42] Miyazawa Y, Sekine Y, Kato H, Furuya Y, Koike H, Suzuki K. Simvastatin Up-Regulates Annexin A10 That Can Inhibit the Proliferation, Migration, and Invasion in Androgen-Independent Human Prostate Cancer Cells; Simvastatin Up-Regulates Annexin A10 That Can Inhibit the Proliferation, Migration, and Invasion in Androgen-Independent Human Prostate Cancer Cells. Prostate 2017;77:337–49.
- [43] Lu S-H, Yuan R-H, Chen Y-L, Hsu H-C, Jeng Y-M et al. Annexin A10 is an immunohistochemical marker for adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract and pancreatobiliary system 2013.