

口腔扁平上皮癌細胞の高度浸潤能獲得における
Cyr61 の役割

学位申請者

田中 扶美

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科
顎口腔頸部医科学講座 口腔外科学教室
(主指導教員：鎌田伸之教授)

2011 年

目次

I. 緒言	1
II. 実験材料および実験方法	3
1. 培養細胞	
2. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	
3. 蛋白質抽出	
4. プラスミド	
1) Cyr61 プロモーター領域を含むルシフェラーゼレポータープラスミドの作製	
2) Cyr61 発現ベクター作製	
5. Cyr61 安定発現細胞の樹立	
6. レポーターアッセイ	
7. 細胞増殖能	
8. 細胞遊走能	
9. 細胞染色	
10. Matrigel invasion assay	
11. 活性型 small G Protein の検出	
12. 三次元培養	
III. 結果	12
1. 扁平上皮癌細胞株における Cyr61 の発現	
2. Snail による Cyr61 転写亢進機構の解析	
3. Cyr61 遺伝子安定導入による機能解析	
4. 分泌型 Cyr61 による癌細胞浸潤への影響	
5. Cyr61 による癌細胞運動制御機構の解析	

6. Cyr61 による癌浸潤像形成

IV. 考察	17
V. 結論	21
VI. 謝辞	23
VII. 参考文献	24
VIII. 付図説明	33
IX. 表および図	39

I. 緒言

世界保健機関(WHO)によれば、2005年の世界の死亡者数のうち、悪性腫瘍による死亡率は約13%を占める¹⁾。臓器別にみて最多のものは肺癌であり、胃癌、肝癌、大腸癌、乳癌が続く。口腔癌の発症率は1~5%と決して高くはないが、口腔は咀嚼、嚥下、会話などを司る重要な器官であり、口唇、舌、頬粘膜、口腔底およびそれらを支える顎骨や筋肉といった複雑な解剖学的形態を特徴とするため、視診・触診が容易で癌の早期発見が可能であるにも関わらず、癌の初期浸潤からの進行を許してしまうとその予後は不良となる。またそれに伴い手術による切除範囲や放射線治療における照射範囲が広くなり、治療後の広範囲な機能低下とそれによる大きなQOLの低下が現れる例も少なくない。このように初期浸潤を含む癌の進展の制御が口腔癌の治療と予後を向上するために重要である。

近年癌の進展において上皮間葉移行(Epithelial Mesenchymal Transition; EMT)の重要性が注目されている²⁾⁻⁵⁾。EMTは上皮細胞が間葉様細胞に転換する現象を指す。個体発生における原腸陥入や口蓋形成を含む多くの器官・組織の形成に必須であり⁶⁾⁻⁹⁾、また、上皮の創傷治癒過程でも部分的にEMTが生じている¹⁰⁾。またEMTが誘導された癌細胞は遊走能、浸潤能および転移能が亢進し高悪性を示す^{2)-5),12)}。

口腔扁平上皮癌は口腔癌の大部分を占める。口腔扁平上皮癌原発巣の浸潤様式分類である山本・小浜分類(以後Y-K分類と略記する)において4D型口腔扁平上皮癌はびまん性浸潤像を示し、その予後は他の型に比べて有意に不良である^{13),14)}。

Y-K4D型口腔扁平上皮癌検体から樹立された癌細胞株は*in vitro*においてもびまん性な高度浸潤像を示し、線維芽細胞様形態、Vimentinの高発現、E-cadherinの発現消失といったEMT遺伝子プロファイルを示す¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。これらの細胞に共通してzinc-finger型転写因子Snailが高発現している¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。Snailは細胞間接着因子

E-cadherin のプロモーター領域に存在する E-box 配列に結合して転写を抑制し、EMT を誘導する直接的な転写因子と考えられている^{11),12)}。実際 Snail の強制発現により EMT は誘導が可能であるため¹⁵⁾、Y-K4D 型口腔扁平上皮癌における EMT のマスター遺伝子である可能性が示唆される¹⁷⁾。しかし臨床的にはこのような EMT 型癌細胞が主体となった 4D 型の高度悪性症例は少なく、原発巣を形成する主たる癌細胞は上皮形質を維持している症例 (Y-K 分類 1~4C 型) が大多数である。

本研究では、少数の EMT を獲得した癌細胞が上皮形質を保った他の癌細胞に液性因子を介して浸潤を促すことが、初期胞巣状浸潤像形成を制御するのではないかと仮説を立て、これまでに同定された Snail 標的遺伝子群¹⁸⁾から癌細胞遊走能を制御する候補として分泌蛋白質 Cystein rich protein 61 (Cyr61) に着目し、Cyr61 の口腔扁平上皮癌の初期浸潤像形成に与える影響を検討した。

II. 実験材料および実験方法

1. 培養細胞

外陰部扁平上皮癌由来細胞 A431, 舌扁平上皮癌由来細胞 OM-1、HOC719 細胞, 口底扁平上皮癌由来細胞 HOC313 細胞, 歯肉扁平上皮癌由来細胞 TSU 細胞, 歯肉由来不死化線維芽細胞 GT-1 細胞^{19),20)}を使用した. HOC719 細胞は, E-cadherin を不均一に発現しており, これより E-cadherin の発現を示す HOC719-PE と E-cadherin の発現を示さない HOC719-NE 細胞が分離樹立された²¹⁾. ヒト正常腎上皮由来細胞 HEK293 は invitrogen 社 (Carlsbad, CA, USA) より購入した. Snail 安定発現細胞株 (A431-SNA および OM-1-SNA) とコントロール細胞株 (A431pcD1 および OM-1pcD1) は, A431 または OM-1 細胞に Snail 発現ベクター-pcDNA3-Snail¹¹⁾ (Dr. A. G. De Herreros より供与)あるいは pcDNA3 (Invitrogen) を導入し, G418 耐性クローンを単離維持された細胞株を使用した^{15), 17)}. 細胞培養は 10%牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum: 以下 FBS と略記する; Bio West, FL, USA), 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン (SIGMA ARDRICH, MO, USA) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: 以下 DMEM と略記; SIGMA ARDRICH) を用い, 5%CO₂ の存在下, 37°C 加湿下で培養した. また, A431-SNA および OM-1-SNA は, 100µg/ml の G418 (SIGMA ARDRICH) を添加した培地で培養した.

全ての細胞の継代培養はカルチャープレート (Greiner Bio one, Duesseldorf, Germany) に播種した細胞を 0.05%トリプシン-EDTA (Invitrogen) で処理し細胞を浮遊・回収して行った.

2. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

テンプレート RNA は RNeasy® Mini kit (QIAGEN Sciences, Germany) を用いて細胞

から抽出した. 10cm カルチャープレート(Greiner Bio one) 上で培養している細胞より培地を吸引除去後, 直ちに溶解バッファー (RLT Buffer) を添加し, ゲノム DNA を 21 ゲージ注射針で数十回通過させることにより剪断した. 細胞溶解液を RNA 結合スピナカラムに移し 13,000rpm で 30 秒遠心後, カラムに結合したトータル RNA を洗浄バッファー (RW Buffer) を添加後遠心し洗浄した. 最後に溶出バッファー (RPE Buffer) を 500 μ l 添加後遠心し, トータル RNA を回収した. 回収液中の RNA 濃度をナノドロップ (Thermo Fisher Scientific, DE, USA) により測定した. トータル RNA 1 μ g をテンプレートとし, 逆転写酵素 ReverTra Ace 100U, 2.5nM Random primer, 10mM dNTP, 40U Ribonuclease Inhibitor を含む ReverTra Ace 反応バッファー (すべて TOYOBO, 大阪) を用い, 逆転写反応を行った. 反応は 30 $^{\circ}$ C 10 分, 42 $^{\circ}$ C 20 分, 99 $^{\circ}$ C 5 分を Master cycler egradient (Eppendorf 社, Germany) を使用して実施し 1st strand cDNA 溶液 20 μ l を RT-PCR のテンプレートとして得た. RT-PCR は cDNA 溶液 1 μ l, DNA ポリメラーゼ Blend Taq-Plus 2.5U, それぞれの遺伝子特異的なセンスおよびアンチセンスプライマー 2mM を用い 2mM dNTP 存在下で Blend Taq-Plus 反応バッファー (以上 TOYOBO) を用いて実施した. PCR 産物は 100ng/ml ethidium bromide (Invitrogen) を含む 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い, Printgraph ゲルイメージングシステム (ATTO, 東京) により記録した. real-time RT-PCR には標準遺伝子として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (以下, G3PDH と略記する) を使用し, 上記 RT-PCR に用いたテンプレート 1 μ l および遺伝子特異的プライマー 3mM, SYBER Green Master Mix (SYBER Green[®], dNTP, DNA ポリメラーゼ, rTaq, Mg²⁺) (タカラバイオ, 滋賀) を用いた. 反応は 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 15 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒で行った. 検出には Bio Flux Line Gene Fluorescent Quantitative Detection System (Bio Flux, 東京) を用いた. 使用したプライマー (北海道システムサイエンス, 札幌) の塩基配列, アニーリング温度および PCR 条件は表 1 に別記する.

3. 蛋白質抽出

10cm カルチャープレート上で培養している細胞を氷上に移しスクレーパーにて剥離浮遊後 1.5ml チューブに回収した。4℃, 500xg にて遠心回収した細胞塊に氷冷 PBS を加え洗浄し, 再遠心による回収後上清を除いた。ペレットはプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche, IN, USA) を添加した 1ml の氷冷 lysis buffer (25mM Tris-HCL pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40) で可溶化し, 4℃, 16,000xg で 15 分遠心し上清をサンプルとして回収した。また、分泌蛋白質の検出は細胞をサブコンフルエントに達するまで増殖培地で培養後, 血清を除去した培地に置換し 24 時間後の培養上清をサンプルとした。サンプルに等量の 2×sample buffer (2M Tris-HCl pH6.8, 40% SDS, 2-メルカプトエタノール, ブロモフェノールブルー) を加えた後, 90℃で 5 分加熱し, 直ちに 7.5~15% XV PANTERA GEL (DRC, 東京) を用いて電気泳動を行った。Sure Blot F1 system (藤沢薬品工業, 大阪) を用いて, Immobilon™ PVDF メンブレン (Millipore corporate Headquarters, MA, USA) に転写後 5% スキムミルク含有 TBS-T (0.05% Tween20/Tris-buffered saline(TBS; 1M Tris-HCl, NaCl)) により室温で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体の反応は Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で希釈し 4℃で一晩反応を行い, TBS-T でメンブレンを洗浄後, Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で 1 万倍に希釈した HRP 標識二次抗体 (Amersham, UK) と室温で 1 時間反応させた。二次抗体反応後 TBS-T でメンブレンを洗浄し, ECL™ Plus Western blotting system (GE Healthcare, UK) を発光基質として添加し LUMINESCENT IMAGE ANALYZER (LAS-4000 mini PR, FUJIFILM, 東京) を用い発光シグナルを検出した。ウエスタンブロッティングに用いた抗体と希釈を以下に示す。

抗 Cyr61 抗体 (rabbit, #E1410; Santa Cruz, CA, USA) 1:200 倍希釈

抗 MMP-2 抗体 (rabbit, #4022; CST ジャパン株式会社, 東京) 1:200 倍希釈

抗 E-cadherin 抗体 (mouse, #6704; Santa Cruz) 1:1000 倍希釈

抗 Rho 抗体 (mouse, #89854; Thermo Fisher Scientific) 1:1000 倍希釈

抗 Rac1 抗体 (mouse, #89856; Thermo Fisher Scientific) 1:1000 倍希釈

4. プラスミド

1) Cyr61 プロモーター領域を含むルシフェラーゼレポータープラスミドの作製

ヒト正常末梢血リンパ球から採取したゲノム DNA, センスおよびアンチセンスプライマー各 2mM, 10mMdNTP, LATAq polymerase 2.5U (以上タカラバイオ) を含む LATAq 添付バッファー液で PCR 反応を行い, Cyr61 の転写開始点の下流 42bp からそれぞれ上流 928, 794, 53, 28bp までのプロモーター領域の DNA を増幅した. ベクターにクローニングするためにセンスプライマーの 5' 末端に Kpn I, アンチセンスプライマーの 5' 末端に Xho I 認識配列を付与した. 用いたプライマー配列を以下に示す.

(-928) : 5'-AAGGTACCTCCCCGCGTTCGTTTCC-3'

(-794) : 5'-AAAGGTACCAGACGATGGGCAA-3'

(-53) : 5'-AAGGTACCGTCACTGCAACACGC-3'

(-28) : 5'-AAGGTACCAGACCGCGAGCGA-3'

(+42) : 5'-AACTCGAGGGAGAAGGCGCGGAGGG-3'

各 PCR 産物をエタノール沈殿して精製後し Kpn I および Xho I (New England Biolabs, England) で処理した DNA 断片を, Kpn I および Xho I で処理した pGL3-Basic ベクター DNA 断片と混合し等量の T4 ligase 溶液 (タカラバイオ) を用いライゲーション反応を 14°C で 8 時間行った. コンピテント大腸菌 (competent high; タカラバイオ) に transformation 後, アンピシリン選択 LB 寒天培地上で目的プラスミドを含む大腸菌コロニーを単離した. 目的プラスミドを含む大腸菌クローンは LB 液体

培地を用いて大量培養した。プラスミドマキシキット(QIAGEN Sciences)により大量増幅された目的プラスミドを回収し、収量をナノドロップ(Thermo Fisher Scientific)にて測定した。

2) Cyr61 発現ベクターの作製

RT-PCR に用いた 1st strand cDNA 溶液をテンプレートとし、以下に示すプライマーを用いて、1,062bp の Cyr61 cDNA を増幅した。pcDNA3.1/V5-His ベクター (Invitrogen) にクローニングするため、Forward プライマーの 5' 末端に Kpn I 認識配列およびコザック配列を付与し、Reverse プライマーには C 末端タギングのため終止コドン TAA を CCG に置換し、3' 末端には Xho I 認識配列を付与した。

(Forward, Cyr61) : 5'-AAAGGTACCATGAGCTCCCGCATCGCCA-3'

(Reverse, Cyr61) : 5'-TTTCTCGAGCGGGTCCCTAAATTTGTGAATGTC-3'

PCR 産物をエタノール沈殿して精製後 Kpn I および Xho I (New England Biolabs) で処理した DNA 断片を、Kpn I および Xho I で処理 pcDNA3.1/V5-His ベクター (Invitrogen) に前述のごとくライゲーションし Cyr61 発現ベクター (pcDNA3.1-Cyr61 ベクター) を作製した。

作製したプラスミドの塩基配列はベクター特異的あるいは遺伝子特異的プライマーを用いて、Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, CA, USA) を用いたサイクルシーケンス反応 (96°C10 秒, 50°C5 秒, 60°C3 分 x25 サイクル) を行った。反応産物を SigmaSpin™ Post reaction Purification Columns (SIGMA ARDRICH) を用いて精製した後、HiDi™ Formamide (Applied Biosystems) を加え、95°C で 2 分間 denature 後 ABI 3100 Datacollection ver.1.0 (Applied Biosystems) により各サンプルの塩基配列を検証した。

5. Cyr61 安定発現細胞の樹立

A431 および OM-1細胞に, FUGENE6 (Roche)を用いて, C 末端に V5-His タグが付与された Cyr61 発現ベクターを遺伝子導入し 400~800 μ g/ml G418 (SIGMA ARDRICH) 存在下で, 耐性クローンを分離し, Cyr61 安定導入細胞株を樹立した. 100 μ g/ml G418 を添加した増殖培地を継代培養に用いた.

6. レポーターアッセイ

ルシフェラーゼ発光は GLOMAX 20/20 Luminometer (Promega Corporation, WI, USA)を用いて測定した. 6-well 組織培養プレート (Greiner Bio one) 上でコンフルエントに達した HEK293 にFuGENE6を用いて, 1ng レポータープラスミド, 1ng pRL-CMV に加え 10ng のpcDNA3-SnailあるいはpcDNA3を同時に遺伝子導入した. 48時間後 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega)を用いてプロモーター転写活性の測定を行った. 培地吸引後 Passive lysis buffer を100 μ l ウェルに添加し細胞溶解液を調整し, 16, 000xg で1分遠心後, 上清 20ul をサンプルとして基質と反応させた. ルシフェラーゼレポータープラスミド由来ホタルルシフェラーゼ活性は Luciferase assay buffer 100ul を基質としてサンプルに添加することで発光させ測定した. 続けて Stop&Glo buffer 100ul を添加しレポータープラスミド由来ルシフェラーゼの発光を終息させ pRL-CMV 由来のウミシイタケルシフェラーゼを発光させ測定した. 各サンプルにおける遺伝子導入効率を pRL-CMV 由来のウミシイタケルシフェラーゼ発光強度で補正した相対的ホタルルシフェラーゼ発光強度をグラフ化した. TNF- α の応答性は, レポータープラスミドを遺伝子導入した 12時間後に 10ng TNF- α を添加し, さらに 12時間後転写活性を測定した.

7. 細胞増殖能

細胞数は Cell counting kit (同仁化学研究所, 熊本) を用いて決定した. 96-well 組織培養プレート (Greiner Bio one) に 2×10^3 個の細胞を播種し, 培養 0, 1, 2, 3, 4 日目ごとに 4well ずつ WST-8 試薬を 10 μ l 添加した. 得られた呈色反応をマイクロプレートリーダー (BIO-RAD) で 450nm の吸光度を測定し各測定日 4well の値の平均値をグラフ化した.

8. 細胞遊走能

細胞遊走能の検討は wound healing assay を用いて行った. 6-well 組織培養プレートに細胞がコンフルエントになるよう播種し, デッシュの中心部に QSP 200 μ l ピペットチップ (BM 機器, 東京) を用いて wound を形成した. Wound の付与から 12 時間後, PBS にて洗浄し, 位相差顕微鏡 (Olympus, 東京) にて観察, 撮影した.

9. 細胞染色

SUPERFROST[®] PLL コート付 Micro slide glass (松浪硝子工業, 大阪) に細胞を播種しサブコンフルエントまで培養後 4% パラホルムアルデヒドで固定した. 0.2% TritonX-100 を用いて膜透過処理を行った後 1% BSA 溶液を用いてブロッキングし, PBS にて 40 倍希釈した ALEXA Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen) を遮光下にて 4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた. PBS で洗浄後カバーガラスを用いて VECTOR SHIELD (Vector laboratories, CA, USA) に封入した. ALEXA Fluor 488 蛍光シグナル観察および画像の取得は, 蛍光顕微鏡 DM14000B と DHF350FX カメラ (Leica Microsystems, 東京) を用いて行った.

10. Matrigel invasion assay

BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) を用いた。上部ウェルのマトリゲルコートメンブレン上に 2.5×10^4 cells の細胞を播種し 12~48 時間培養した。培養後メンブレン上面の細胞を綿棒で除去し、4%パラホルムアルデヒド(和光純薬, 大阪)でメンブレンを固定後、メンブレン下に浸潤した細胞をトリパンブルー (SIGMA) で染色し、顕微鏡下で浸潤細胞を計測した。1ウェルにつき 6 視野で計測した細胞数の平均値を測定値とし 3well の測定値を平均しグラフ化した。

11. 活性型 small G Protein の検出

EZ-Detect™ Rac 1 Activation Kit および EZ-Detect™ Rho Pull-down and Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてそれぞれ活性型 Rac1 と活性型 Rho を精製した。10cm 培養ディッシュに細胞を 2×10^6 個播種し、Cell lysis buffer 1ml を用いて蛋白質を可溶化し、16,000xg で 15 分遠心した後、上清を回収しサンプルとした。サンプル 500 μ l にそれぞれ GST-RBD ビーズ(Rac1; GST-Pak1-PBD, Rho; GST-Rhotekin-RBD) 20ul を加え4°Cにて 1 時間混和した後、7,200 xg で遠心してビーズを回収し、SDS サンプルバッファー(125mM Tris-HCl pH6.8, 2% glycerol, 4%SDS(w/v), 0.05% ブロモフェノールブルー)を加え加熱した。実験方法 3 のごとく Western blotting を行い、活性型各蛋白質を定量した。

12. 三次元培養

1×10^6 個 cells/ml のヒト不死化歯肉線維芽細胞 GT1²⁰) を 1ml と、Type I コラーゲン溶液(高研, 東京)を懸濁し、12-well 組織培養プレート上に 2ml 播種した。37°C で 1 時間静置し、コラーゲンがゲル化した後、 1×10^6 cells/ml の癌細胞をゲル上に播種し

た. 1時間後ゲルをウェルから剥離浮遊させた. 3 日おきに培地交換を行い, 1週間後収縮したコラーゲンをセルストレイナー (BD Falcon, NJ, USA) 上に表面を空気に曝しながら培養を継続した. さらに 1 週間後マイルドホルム(和光純薬)にてゲルを一晩固定しパラフィン包埋した. 8 μ m 厚の垂直方向の切片を作製し, 脱パラフィン脱水処理後ヘマトキシリン-エオジン染色を行い光学顕微鏡にて観察した.

Ⅲ. 結果

1. 扁平上皮癌細胞株における Cyr61 の発現

Cyr61 は EMT 型癌細胞および Snail 誘導性 EMT 型細胞に共通して発現変動が亢進する遺伝子として抽出された¹⁸⁾. 各種扁平上皮癌細胞における Cyr61 蛋白質の発現を検討したところ, Snail 発現が低く E-cadherin を発現している細胞 (A431, OM-1, HOC719-PE) と比較して E-cadherin の発現が消失した EMT 型細胞 (HOC719-NE, HOC313, TSU) は Cyr61 の高発現を示した(図 1A. E-cadherin の結果は示していない). Snail を遺伝子導入することで EMT を誘導した A431, OM-1 細胞^{15), 17)} においても Cyr61 蛋白質発現は亢進していた(図 1B). real-time RT-PCR によるこれらの細胞における Cyr61 mRNA 発現プロファイル(図 1C) は以上の Cyr61 蛋白質発現のプロファイルと一致して高い発現を示した.

2. Snail による Cyr61 転写亢進機構の解析

Cyr61 転写開始点上流 928, 794, 53, 28bp を含む遺伝子断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを作製し, プロモーター活性に対する Snail の影響を検討した. Snail 非存在下ではすべてのレポータープラスミドのルシフェラーゼ活性は TATA box 配列を含まない転写開始点上流 28bp を含むレポータープラスミドと同等であり, プロモーター活性は非常に低い値を示した(図 2A). 一方, Snail 発現により上流 28bp を含むレポータープラスミドのルシフェラーゼ活性は変化しなかったが, 上流 928bp を含むレポータープラスミドのルシフェラーゼ活性は約 10 倍に亢進した(図 2A). また, Snail による上流 794bp を含むレポータープラスミドの転写活性亢進は, 上流 928bp を含むレポーターでの活性亢進の約 40%にとどまり, 上流 53bp を含むレポータープラスミドの転写活性亢進率はさらに低くなった(図 2A). 上流 928～

794bp の領域をコンピューター検索 (TFSEARCH, <http://www.cbrc/research/db/TFSEARCH.html>) した結果, 上流 794~784bp に NF κ B (Nuclear Factor kappaB) 結合配列の存在が予測された (図 2B). そこで, レポータープラスミドを遺伝子導入した HEK293 細胞に NF κ B の活性化因子である TNF- α (tumor necrosis factor -alpha) 処理を行い, Cyr61 転写における NF κ B の関与を検討した. その結果, 上流 928bp を含むレポータープラスミドは著明な TNF- α 応答性を示したが (図 2C), 上流 794bp を含むレポータープラスミドではこの応答性は認められなかった (図 2C).

Cyr61 の転写調節に対する NF κ B の関与が示唆されたため, さらに Snail 安定発現細胞における NF κ B の活性動態を検証した. Snail により EMT が誘導された A431, OM-1 細胞では, Cyr61 に加え NF κ B 標的遺伝子 XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)²², IAP-2 (Inhibitor of apoptosis-2)²³, Bcl-xL²⁴, ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1)²⁵ の mRNA 発現亢進が確認された (図 2D). さらに Snail 導入細胞では I κ B- α および I κ B- ϵ の蛋白質量が減少しており (図 2E), NF κ B は恒常的に活性化されていることが示唆された.

3. Cyr61 遺伝子安定導入による機能解析

Cyr61 の発現亢進が癌細胞表現型に及ぼす影響を解析するため, C 末端に V5/His タグを付与した Cyr61 発現ベクターを A431 および OM-1 細胞に遺伝子導入した. Cyr61 安定発現細胞を 2 クローンずつ樹立し, 外来性 Cyr61 の発現を確認した (図 3A). Cyr61 を安定導入した A431 および OM-1 細胞は伸展した細胞形態を示し, 特に形成したコロニーの周辺部にある細胞には顕著なラップリング像が観察された (図 3B). また ALEXA Fluor 488 Phalloidin による細胞染色では, 特徴的なラップリング膜近傍における F-actin の再構成が確認された (図 3C). これら Cyr61 安定導入細胞の細胞増殖能には著明な変化は認められなかったが (図 4A), wound healing assay では,

遊走能亢進が確認された(図 4B). さらに, 浸潤能に及ぼす影響を検討するため, matrigel invasion assay を行った. A431, OM-1 細胞共に Cyr61 安定導入により浸潤細胞数が顕著に増加した(図 5).

Snail により, E-cadherin の発現消失, MMP-2 の発現亢進, それに伴ない基質分解能亢進依存的に浸潤能が亢進するため^{15),26)}, Cyr61 安定導入細胞における両蛋白質の発現を検討した. その結果, Snail とは異なり Cyr61 導入細胞では, E-cadherin の発現消失は見られず, MMP-2 発現量にも顕著な変化は見られなかった(図 6A, B).

以上より Cyr61 は主に細胞運動能の亢進を介して癌浸潤能を亢進させることが示唆された.

4. 分泌型 Cyr61 による癌細胞浸潤への影響

液性因子である Cyr61 を高発現する EMT 型癌細胞が実際に Cyr61 を培養上清中に分泌しているかどうかを検討した. 培養上清を用いた Western blotting の結果 Cyr61 および Snail 安定発現細胞における Cyr61 分泌亢進が確認された(図 7A).

次に大腸菌由来組換えヒト Cyr61 蛋白質を用いて, A431, OM-1 細胞の浸潤能に与える影響を matrigel invasion assay により検討した. 組換えヒト Cyr61 蛋白質の添加により, A431 細胞のマトリゲルに対する浸潤能は約2倍, OM-1 細胞では約 3 倍に亢進した(図 7B).

さらに, 実際に細胞から分泌される Cyr61 が A431, OM-1 細胞の浸潤能に与える影響を検討した. 図 7C で示したように上部ウェルマトリゲル上に A431 あるいは OM-1 細胞を播種し, 下部のウェルには上部ウェルと同じ細胞, あるいは各種発現ベクターを安定導入した細胞を播種した. Snail 安定導入細胞を下部ウェルに播種した場合, 上部ウェルの A431 あるいは OM-1 細胞のマトリゲルに対する浸潤細胞数は亢進し, Cyr61 安定導入細胞を下部ウェルに播種した場合にも上部ウェルの A431 あるいは

OM-1 細胞のマトリゲル浸潤細胞数は 5 倍以上に亢進した(図 7C).

Cyr61 はインテグリンリガンドとして機能することが知られているため^{27)・30)}, Cyr61 による浸潤能亢進が癌細胞の発現するインテグリンを介するか否かを, RGD ペプチドを添加することにより検討した. 大腸菌由来組換えヒト Cyr61 タンパク添加による A431 あるいは OM-1 細胞のマトリゲルに対する浸潤亢進は, RGD ペプチドの添加により抑制された(図 7D). すなわち, EMT 型癌細胞が高発現する Cyr61 は, 分泌された液性因子として, またインテグリンリガンドとして癌細胞の浸潤能を亢進させることが示唆された.

5. Cyr61 による癌細胞運動制御機構の解析

Cyr61 安定発現によるアクチン再構成を伴う顕著な細胞膜ラップリング像(図 3C), と細胞遊走能の亢進(図 4B)が見られたことから, Cyr61 による細胞運動制御機構について解析を行った. アクチン細胞骨格は Small G protein に属する Rho family protein により制御される³¹⁾. これら Rho family protein がアクチン重合動態をコントロールすることで, 突起, 仮足の形成やアクチンストレスファイバー形成が誘導され, それらが協調することで方向性を持った細胞運動が生じる^{31)・34)}. Cyr61 安定導入は RhoA, RhoC, Rac1, Cdc42 の mRNA 発現に影響を与えなかった(図 8A). また Rac1 および Rho の総蛋白質量に影響がない一方で, 活性型 Rac1 の減少と活性型 Rho の増加が明らかになった(図 8B). そこで, Cyr61 安定発現による Rho の活性調節因子発現への影響を検討したところ, Rho 不活化因子 RhoGAP1 および RhoGAP8 の発現低下と Rho 活性化因子 GEF-H1 の発現亢進が確認された(図 8C).

6. Cyr61 による癌浸潤像形成

これまでの結果より Cyr61 が癌浸潤能を亢進させることが示唆されたため, Cyr61 安

定導入癌細胞が形成する癌浸潤像を検証した。ヒト不死化歯肉線維芽細胞を含む Type I コラーゲンゲル上で扁平上皮細胞を培養する 3 次元培養では, *in vitro* で 3 次元的に重層扁平上皮が再構成できる¹⁵⁾。また癌細胞はその形質により, さまざまな重層像・浸潤像を 3 次元的に形成する^{15),17)}。3 次元培養を行った A431 あるいは OM-1 細胞はゲル上で重層化し, 低い浸潤性を示した。Snail により EMT が誘導された細胞は重層化せず, 細胞間接着が解除されたびまん性の高度浸潤像を示した。一方, Cyr61 を安定導入した細胞は胞巣状に細胞間接着を保ったままゲル内へ深く浸潤した(図 9A, B)。

IV. 考 察

Cysteine-rich 61 (Cyr61/CCN1)は血管新生誘導因子として同定され³⁵⁾, CTGF (Connective Tissue Growth Factor;CCN2)や Nov(Nephroblastoma overexpressed; CCN3)とともに CCN ファミリーを形成する³⁶⁾⁻³⁹⁾. Cyr61 の構造として N 末端からシグナルペプチド, IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins)モジュール, VWC(von Willebrand 因子タイプ C)モジュール, TSP1(トロンボスポンジンタイプ 1 リポート)モジュールが保存されており, C 末端システインノットモジュールを特徴的に有している³⁶⁾⁻³⁹⁾. Cyr61 ノックアウトマウスは胎盤の血管新生に異常をきたし胎生致死となることから³⁶⁾⁻⁴⁰⁾, Cyr61 は胎生期における重要な血管新生誘導因子であり, 血管内皮細胞の遊走能を VEGF-A, C (Vascular Endothelial Growth Factor-A, C)を介して遊走させると考えられている²⁷⁾. また, immediate-early gene として各種細胞において上皮成長因子, 血小板由来成長因子などの種々の成長因子により誘導される³⁷⁾. 筋肉や骨, 腎臓や前立腺などの多くの臓器, 線維芽細胞や血管内皮細胞などで発現し, 線維芽細胞の遊走・増殖因子として創傷治癒へ関与する⁴¹⁾. また乳癌や大腸癌組織における高発現⁴²⁾⁻⁴⁵⁾や, 子宮内膜癌における Cyr61 染色陽性度と TNM ステージ分類との相関が報告されている⁴⁶⁾. 乳癌細胞において高発現する Cyr61 は血管内皮細胞にインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を介して作用し, MAPK 経路依存的に増殖・遊走能を亢進させ癌栄養血管を新生することで癌の進展を亢進させる^{40),42)}.

本研究では Snail 発現により EMT が誘導された細胞における Cyr61 の高発現を見出し, Cyr61 の口腔扁平上皮癌浸潤に与える影響について検討を行った.

Snail は E-cadherin¹¹⁾や Claudin-1⁴⁷⁾などのプロモーター領域に存在する E-box に結合し, それらの転写を直接抑制する転写抑制因子として機能することから Snail による Cyr61 転写活性の亢進には間接的な転写活性化因子の存在が想定され, 本研究

では NF κ B が Cyr61 の転写活性を制御していることが示唆された。また、癌抑制遺伝子 p53 のファミリー遺伝子 Δ Np63 も Snail による転写抑制を受けるが、これは間接的な C/EBP α (CAAT/enhancer binding protein- α) 依存的制御であることから⁴⁸⁾、Snail は E-box 配列への直接的結合を介した標的遺伝子の発現抑制のみならず間接的に転写因子群の機能を制御して、EMT 型癌細胞の形質を規定することが示唆された。さらに、NF κ B の活性化因子である TNF- α による Cyr61 プロモータの活性亢進は Snail による亢進より低く、NF κ B 結合配列を含まないプロモーター領域も Snail 応答性を示した(図 2C)。よって Snail による Cyr61 転写活性制御には NF κ B 以外の転写因子が関与している可能性も推察された。腎臓上皮由来 MDCK 細胞では、Snail が NF κ B の恒常的活性化依存的に MMP-9 発現を上昇させるとの報告があるものの⁴⁹⁾、Snail によるこの NF κ B 活性制御機構はいまだ不明である。さらに、Snail 安定発現細胞での NF κ B 活性の恒常的な発現亢進は NF κ B 抑制因子である I κ B アイソフォーム蛋白質の発現低下(図 2E)によるものであると考えられ、実際 NF κ B 標的遺伝子群の発現上昇が見られた(図 2D)。Snail による NF κ B の活性化が、NF κ B 標的遺伝子として Cyr61 だけでなく抗アポトーシス因子 XIAP, IAP-2, Bcl-xL の発現亢進を示したことにより EMT 型癌細胞が高悪性形質を獲得している可能性が示唆された。また本研究では恒常的な I κ B 蛋白質の減少が NF κ B 活性を亢進させていることが推察されたが、I κ B 自身も NF κ B 標的遺伝子であることから⁵⁰⁾、Snail は何らかの機構で I κ B 蛋白質発現を阻害している可能性が示唆された。

また、本研究では、Cyr61 安定発現によって Rac1 活性の減少および Rho 活性の上昇が恒常的に起こることを見出した(図 8B)。これは Rho 不活化因子⁵³⁾⁻⁵⁶⁾である Rho GAP1, 8 の発現低下と Rho 活性化因子⁵⁷⁾GEF-H1 の発現上昇に起因することが明らかになった(図 8C)。Small G protein に属する Rho family protein がアクチン細胞骨格を制御し仮足の形成やアクチンストレスファイバー形成を協調的に調節することで方

向性を持った細胞運動が生じる^{31)・34)}。本研究では、EMT 型癌細胞が著明なアクチンストレスファイバー形成を伴って自由に遊走する像とは異なり、Cyr61 安定発現細胞では恒常的に Rho が活性化され細胞間接着を維持し膜ラフリング形成・アクチン細胞骨格の再構成を生じて細胞遊走能が亢進するという特徴的な結果を見出した(図 3C および図 4B)。Matsuda らは、シート状に培養した MDCK 細胞では細胞中心部において RhoA は Rac 依存的に不活性化され、仮足の形成には Rho A 活性が必要であると報告している⁵¹⁾。以上の結果と既報から、Cyr61 安定発現細胞において Rho 活性が亢進することにより見られたアクチン再構成像は、細胞間接着を保ったままで細胞遊走能が亢進するための特徴的な像であると推察された。

Matrigel invasion assay において、組み換え Cyr61 蛋白質の添加により A431, OM-1 細胞の浸潤能は亢進したが、RGD ペプチドの添加によってその浸潤能はほぼ完全に抑制された(図 7D)。すなわち液性因子として Cyr61 はインテグリンを介して癌細胞に浸潤能を与えることが示唆された。

また、Snail 安定発現細胞が分泌する液性因子により A431, OM-1 細胞の浸潤能は同様に亢進したが、RGD ペプチド添加による阻害効果は部分的であった(結果は示していない)。EMT 型癌細胞においては Cyr61 の他に CTGF, OSF-2 (Osteoblast-specific factor-2; Periostin), SPARK⁵⁹⁾(Secreted protein acidic and rich in cysteine, Osteonectin) 分泌蛋白質の発現上昇が見出されている¹⁸⁾。Periostin は乳癌および卵巣癌における高発現が報告されており、これを遺伝子導入したヒト胎児腎細胞は、線維芽細胞様形態への変化、浸潤能および遊走能の亢進、Vimentin および MMP-9 の発現上昇を示す⁵²⁾。また Kudo らは口腔扁平上皮癌における Periostin の高発現と浸潤様式や転移との相関性について報告している⁵⁸⁾。以上より EMT 型癌細胞から分泌された Cyr61 が細胞間接着を維持する癌細胞の遊走能依存的な浸潤に大きく貢献していることが推察された。しかし、EMT 型癌細胞においては Cyr61 を含む

インテグリンリガンド以外の液性因子の寄与も示唆された。口腔扁平上皮癌の浸潤開始部位では大部分が上皮形質を維持した癌細胞で構成されることから、EMT 型癌細胞は浸潤先端部において先導的な役割を果たしている可能性が考えられる。すなわち EMT 型癌細胞と細胞間接着を維持する癌細胞との液性因子を介した相互作用が存在し、EMT 型癌細胞から分泌された Cyr61 が細胞間接着を維持する癌細胞の遊走能依存的な浸潤に貢献しているというモデル(図 10)が考えられた。

癌進展に関わる Cyr61 は液性因子であり特異的な中和抗体あるいは阻害剤を開発し局所的な投与方法を開発できれば、現在臨床試験が始まったインテグリン阻害剤による癌進行抑制療法^{60),61)}とともに有効な治療手段となることが期待される。

V. 結論

本研究において、扁平上皮癌細胞の高度浸潤能獲得における Cyr61 の役割について検討し、以下の結果を得た。

1. EMT 型高度浸潤細胞および Snail 誘導性 EMT 癌細胞における Cyr61 の高発現を見出した。
2. プロモーター解析の結果、Cyr61 は Snail によりその転写が誘導された。また、その誘導には、転写開始点上流 928bp と 794bp 間に存在する NF κ B 結合配列が重要であることが明らかとなった。さらに、Snail 安定発現細胞では NF κ B 阻害因子である I κ B の発現低下および抗アポトーシスに關与する NF κ B 標的遺伝子の発現が上昇したことから、Snail は NF κ B を介して抗アポトーシス作用を自身に付与することが示唆された。
3. 樹立した Cyr61 安定発現細胞における明らかな細胞増殖能の変化は見られなかったが、細胞遊走能、浸潤能が著明に亢進した。
4. Invasion assay において、組み換え Cyr61 蛋白質の添加により上皮形質を維持する癌細胞 A431 および OM-1 細胞の浸潤能が明らかに亢進し、その浸潤能の亢進はインテグリン競合阻害剤である RGD ペプチドによって完全に抑制された。また、Cyr61 安定発現細胞および Snail 安定発現細胞が分泌する Cyr61 は A431 および OM-1 細胞の遊走能を亢進させた。

5. Cyr61 安定発現細胞では, 恒常的に Rac1 の活性が低下し, Rho の活性が上昇するという活性バランスの変動を生じた. これは, Rho 活性調節因子の発現変動に起因することが明らかとなった.
6. 三次元培養では, Cyr61 安定発現細胞は上皮形質を維持したままゲル内へ高度に浸潤する像を呈した. その際, E-cadherin および MMP-2 の発現に明らかな変化は見られなかった.

以上のことから, EMT 型癌細胞における Cyr61 の高発現は, 細胞間接着を維持する癌細胞に細胞遊走能依存的な浸潤能を付与し, さらに癌の初期における浸潤像形成の一役を担うことが示唆された.

VI. 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えて頂くとともに御指導、御校閲を賜った広島大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔頸部医科学講座口腔外科学教室 鎌田伸之教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御校閲、御助言賜りました先進医療開発科学講座分子口腔医学・顎顔面外科学講座 岡本哲治教授、探索医科学講座口腔生化学教室 加藤幸夫教授、先進医療開発科学講座口腔顎顔面病理病態学教室 高田 隆教授、病態情報医科学講座粘膜免疫学教室 飛梅 圭准教授ならびに顎口腔頸部医科学講座口腔外科学教室 武知正晃准教授に深謝いたします。

また、本研究の遂行のために御指導頂いた口腔外科学教室 東川晃一郎講師、御協力頂いた口腔外科学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、研究への想いを理解し支えてくれた両親と家族に心から感謝します。

VII. 参考文献

- 1)WHO Disease and injury country estimates : World Health Organization (2009)
- 2)Greenburg G, Hay ED : Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95, 333-9(1982)
- 3)Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA : Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21, 3241-6(2002)
- 4)Jiao W, Miyazaki K, Kitajima Y : Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 86, 98-101(2002)
- 5)Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, Konishi I : Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* 163, 1437-47(2003)
- 6)Hay ED : The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* 233, 706-20(2005)
- 7)Duband JL, Monier F, Delannet M, Newgreen D : Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat (Basel)* 154, 63-78(1995)
- 8)Peinado H, Portillo F, Cano A : Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48, 365-75(2004)
- 9)Kang P, Svoboda KK : Epithelial-mesenchymal transformation during

- craniofacial development. *J Dent Res* 84, 678-90(2005)
- 10) Saika S, Miyamoto T, Tanaka S, Tanaka T, Ishida I, Ohnishi Y, Ooshima A, Ishiwata T, Asano G, Chikama T, Shiraishi A, Liu CY, Kao CW, Kao WW : Response of lens epithelial cells to injury: role of lumican in epithelial-mesenchymal transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44, 2092-102(2003)
- 11) Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J and Garcia de Herreros A : The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89(2000)
- 12) Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA : The transcription factor snail controls epithelial-Mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83(2000)
- 13) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G : Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head and Neck Surg*. 6, 938-47(1984)
- 14) 山本悦秀, 砂川 元, 小浜源郁 : び慢性浸潤型口腔扁平上皮癌に関する研究. *日本口腔外科学会誌* 28, 1471-79(1982)
- 15) Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, Nagayama M, Kamata N : Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 28, 487-96(2006)
- 16) Kamata N, Chida K, Rikimaru K, Horikoshi M, Enomoto S, Kuroki T :

Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res* 46, 1648-53(1986)

17) 瀧 雅行, 東川晃一郎, 米田進吾, 鎌田伸之: 扁平上皮癌細胞における Snail による上皮・間葉移行を介した遺伝子発現制御の解析. *口腔組織培養学会誌* 15, 1-10(2006)

18) Higashikawa K, Yoneda S, Taki M, Shigeishi H, Ono S, Tobiume K, Kamata N: Gene expression profiling to identify genes associated with high-invasiveness in human squamous cell carcinoma with epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 264, 256-64(2008)

19) Kamata N, Fujimoto R, Tomonari M, Taki M, Nagayama M, Yasumoto S: Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. *J Oral Pathol Med* 33, 417-23(2004)

20) 藤本良一, 鎌田伸之, 横山和博, 瀧 雅行, 友成真弓, 堤 聡, 山之内浩司, 長山 勝: テロメラーゼ遺伝子導入による不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞の樹立. *日本口腔粘膜学会誌* 8, 1-8(2002)

21) Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R, Nagayama M: Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol* 37, 65-71(2001)

22) Lin MT, Chang CC, Chen ST, Chang HL, Su JL, Chau YP, Kuo ML: Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF κ B-dependent XIAP up-regulation. *J Biol Chem.* 279, 24015-23(2004)

- 23) Jones DR, Broad RM, Comeau LD, Parsons SJ, Mayo MW : Inhibition of nuclear factor kappaB chemosensitizes non-small cell lung cancer through cytochrome c release and caspase activation . J Thorac Cardiovasc Surg. 123, 310-7(2002)
- 24) Lotem J, Sachs L : Regulation of bcl-2, bcl-XL and bax in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone. Cell Growth Differ. 6, 647-53(1995)
- 25) Yang SF, Chen MK, Hsieh YS, Chung TT, Hsieh YH, Lin CW, Su JL, Tsai MH, Tang CH : Prostaglandin E₂/EP1 signaling pathway enhances intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) expression and cell motility in oral cancer cells. J Biol Chem. 39, 29808-16(2010)
- 26) Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H , Nagayama M : Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. Int J Oncol 22, 891-8(2003)
- 27) Zhou D, Herrick DJ, Rosenbloom J, Chaqour B : Cyr61 mediates the expression of VEGF, alpha-v-integrin, and alpha-actin genes through cytoskeletally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth muscle cells. J Appl Physiol. 98, 2344-54(2005)
- 28) Sakamoto S, Yokoyama M, Aoki M, Suzuki K, Kakehi Y, Saito Y : Induction and Function of CYR61(CCN) in prostatic stromal and epithelial cells : CYR61 is required for prostatic cell proliferation. The Prostate 61, 305-17(2004)
- 29) Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, Lam SCT, Lau LF : The angiogenic

- factor cysteine-rich 61(CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle adhesion and stimulates chemotaxis through integrin $\alpha_6 \beta_1$ and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology* 143, 1441-50(2002)
- 30) Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Teng PK, Griggs DW, Lupu R : A novel CYR61-triggered 'CYR61- $\alpha_v \beta_3$ integrin loop' regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway. *Oncogene* 24, 761-79(2005)
- 31) Jaffe AB, Hall A : Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Dev Biol.* 21, 247-69(2005)
- 32) Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K : Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Tr. Pharmacol. Sci.* 22, 33-9(2001)
- 33) Katoh H, Negishi M : RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature.* 424, 461-64(2003)
- 34) Etienne-Manneville S, Hall A : Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420, 629-35(2002)
- 35) Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF : CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 6355-60(1998)
- 36) Brigstock DR, Goldschmeding R, Katsube KI, Lam SC, Lau LF, Lyons K, Naus C, Perbal B, Riser B, Takigawa M, Yeger H : Proposal for a unified CCN nomenclature. *Mol Pathol* 56, 127-8(2003)
- 37) Chen CC, Lau LF : Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 771-83(2008)

- 38)Brigstock DR : The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN)family. *Endocr Rev.* 20, 189-206(1999)
- 39)Perbal B: CCN proteins ; Multifunctional signaling regulators. *Lancet* 363, 62-4(2004)
- 40)Dhar A, Ray A: The CCN family proteins in carcinogenesis. *Exp Oncol* 32, 2-9(2010)
- 41)Chen CC, Mo FE, Lau LF : The angiogenic factor Cyr61 activates a gastric program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 276, 47329-37(2001)
- 42) Mo FE, Muntean AG, Chen CC, Stolz DB, Watkins SC, Lau LF : CYR61 is essential for placental development and vascular integrity. *Mol Cell Biol.* 22, 8709-20(2002)
- 43)Tsai MS, Hornby AE, Lakins J, Lupu R : Expression and function of CYR61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. *Cancer Res.* 60, 5603-7(2000)
- 44) Ladwa R, Pringle H, Kumar R, West K : Expression of CTGF and Cyr61 in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 64, 58-64(2010)
- 45) Lin MT, Zuon CY, Chang CC, Chen ST, Chen CP, Lin BR, Wang MY, Jeng YM, Chang KJ, Lee PH, Chen WJ, Kuo ML : Cyr61 induces gastric cancer cell motility/invasion via activation of the integrin/nuclear factor-kappaB/cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Clin Cancer Res.* 11, 5809-20(2005)
- 46)Watari H, Xiong Y, Hassan MK, Sakuragi N : Cyr61, a member of

- ccn(connective tissue growth factor /cysteine-rich 61 /nephroblastoma overexpressed) family, predicts survival of patients with endometrial cancer of endometrioid subtype. *Gynecol Oncol.* 112, 229-34(2008)
- 47) Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, Peinado H, Bolós V, Martínez FO, Reina M, Cano A, Fabre M, Vilaró S : The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J.* 394, 449-57(2006)
- 48) Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Taki M, Shigeishi H, Kamata N : Snail-induced down-regulation of DeltaNp63alpha acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 67, 9207-13(2007)
- 49) Jorda M, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A, Cano A, Fabra A : Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of Snail transcription factor. *J of Cell Sci.* 118, 3371-85(2005)
- 50) Aoki T, Sano Y, Yamamoto T, Inoue JI : The ankyrin repeats but not the PEST-like sequences are required for signal-dependent degradation of IkappaBalpha. *Oncogene* 12, 1159-64(1996)
- 51) Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, Nagashima K, Matsuda M : Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol.* 162, 223-32(2003)
- 52) Yan W, Shao R : Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. *J Biol Chem.* 281,

19700-8(2006)

- 53) Hancock JF, Hall A : A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *EMBO J.* 12, 1915-21(1993)
- 54) Lancaster CA, Taylor-Harris PM, Self AJ, Brill S, van Erp HE, Hall A : Characterization of rhoGAP. *J Biol Chem.* 269, 1137-42(1994)
- 55) Lamarche N, Hall A : GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* 10, 436-40(1994)
- 56) Tabu K, Ohba Y, Suzuki T, Makino Y, Kimura T, Ohnishi A, Sakai M, Watanabe T, Tanaka S, Sawa H : Oligodendrocyte lineage transcription factor 2 inhibits the motility of a human glial tumor cell line by activating RhoA. *Mol Cancer Res.* 5, 1099-109(2007)
- 57) Birkenfeld J, Naibant P, Yoon SH, Bokoh GM : Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF : is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis. *Trends Cell Biol.* 18, 210-9(2008)
- 58) Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, Kitagawa M, Kawai H, Gaffney PM, Miyauchi M, Takata T : Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Res.* 66, 6928-35(2006)
- 59) Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, Sabatie E, Cano A, Garcia de Herreros A, Ballotti R, Tartare-Deckert S : SPARK represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res.* 66, 7516-23(2006)
- 60) Millonig A, Hegen H, Di Pauli F, Ehling R, Gneiss C, Hoelzl M, Künz

B, Lutterotti A, Rudzki D, Berger T, Reindl M, Deisenhammer F :
Natalizumab treatment reduces endothelial activity in MS patients. J
Neuroimmunol 227, 190-4(2010)

61)Tourneau CL, Faivre S, Siu LL : Molecular targeted therapy of head and
neck cancer. Eur J Cancer. 43, 2457-66(2007)

VIII. 付図説明

表1 本研究で使用したプライマーの塩基配列およびPCR条件を示す.

図1 各種扁平上皮癌細胞におけるCyr61の発現

- (A) Western blottingによる各種扁平上皮癌細胞におけるCyr61発現の検討.
non-EMT 癌細胞株(A431, OM-1, HOC719-PE 細胞)でCyr61は低発現し, EMT型癌細胞株(HOC719-NE, HOC313, TSU 細胞)では高発現した.
- (B) コントロール細胞と比較し, Snail誘導性EMT型癌細胞でCyr61の高発現を認めた.
- (C) real-time RT-PCRによるCyr61 mRNA発現の検討. Cyr61はEMT型癌細胞及びSnail誘導性EMT細胞で発現亢進し, 蛋白質発現との相関性を示した.

図2 SnailによるCyr61転写制御についての検討

- (A) ルシフェラーゼアッセイを用いたSnailによるCyr61転写活性の測定.
Cyr61転写開始点上流928, 794, 53, 28bpまでのプロモーター領域を含むレポーターベクターとpcDNA-Snail, あるいはpcDNA3をHEK293細胞にco-transfectionし, 48時間培養後, ルシフェラーゼアッセイを用いてCyr61転写活性を測定した.
- (B) 転写開始点上流928bpを含むCyr61プロモーター配列
- (C) TNF- α を添加し, ルシフェラーゼアッセイを行った. Cyr61転写開始点上流928bpまたは794bpのプロモーター領域を含むレポーターベクターを用いてルシフェラーゼアッセイを行うことにより, NF κ B結合配列が実際

に TNF- α に応答するか検証した。その結果, TNF- α 応答性は, 上流 928bp を含むレポーターベクターでは認められたが上流 794bp を含むレポーターベクターでは完全に消失した。

(D)Snail 安定発現細胞における NF κ B 標的遺伝子の発現を RT-PCR により検討した。接着因子 ICAM-1, 抗アポトーシス因子である XIAP, IAP-2, Bcl-xL の発現が上昇した。

(E)Snail 安定発現細胞において, NF κ B 抑制因子である I κ B アイソフォームの蛋白質発現を Western blotting により検討した。コントロール細胞と比較し Snail 安定発現細胞では I κ B- α および I κ B- ϵ の発現低下を示した。

図 3 Cyr61 安定発現細胞の樹立およびその細胞形態

(A)Cyr61 安定発現細胞における外来性 Cyr61 の蛋白質発現を, 抗 v5 抗体を用いた Western blotting により確認した。

(B)コントロール細胞と Cyr61 安定発現細胞における位相差顕微鏡像。Cyr61 安定発現により, 個々の細胞において細胞質が伸長したような形態を呈した。

(C)Cyr61 安定発現細胞およびコントロール細胞における蛍光染色像。Cyr61 安定発現細胞をファロイジンにより蛍光染色すると, 細胞膜部に強く集積されたアクチンが染色された。

図 4 Cyr61 安定発現による細胞増殖能および遊走能の検討

(A)Cyr61 安定発現細胞およびそれらのコントロール細胞を 2000 個/well ずつ培養し(0 日目), 1, 2, 3, 4 日目に Cell counting kit を用いて cell viability を測定した。各値は平均値 \pm 標準偏差(n=4)を表す。これら細胞の増殖速度

には大きな変化を認めなかった。

(B)細胞遊走能の検討方法として Wound healing assay を用いた。Cyr61 を安定発現させた細胞は、明らかな細胞遊走能の亢進を示した。

図 5 Cyr61 安定発現細胞における細胞浸潤能の検討

Cyr61 安定発現による扁平上皮癌の浸潤能の変化を、Matrigel invasion assay を用いて検討した。24 時間後、A431 コントロール細胞と比較して、A431Cyr61 細胞では 2 クローンとも 3 倍以上に浸潤能の亢進が認められた。また、培養 12 時間後、OM-1 コントロール細胞と比較して、OM-1Cyr61 細胞では、2 クローンとも 3.5 倍以上の浸潤能の亢進を示した。

図 6 Cyr61 安定発現細胞における E-cadherin および MMP-2 発現の検討

A431Snail および OM-1Snail 細胞ともにコントロール細胞と比較して E-cadherin の蛋白質発現が消失し MMP-2 蛋白質発現が上昇した。一方 A431Cyr61 および OM-1Cyr61 細胞では、コントロール細胞と比較して E-cadherin 蛋白質発現および MMP-2 蛋白質発現に明らかな変化は認めなかった。

図 7 分泌型 Cyr61 が上皮形質を維持する癌細胞に与える影響

液性因子である Cyr61 が上皮形質を維持する癌細胞の浸潤能に与える影響を検討した。

(A)Cyr61 安定発現細胞および Snail 安定発現細胞における細胞培養上清の Western blotting にて、これら細胞が Cyr61 を培養液に分泌することを確認した。その際、抗 Cyr61 抗体を用いて検出した。

- (B)組み換え Cyr61 蛋白質を培地に添加し, **matri invasion assay** を行った. メンブレンおよびマトリゲル上に A431 または OM-1 細胞を播種し, 4 μ g/ml の組み換え Cyr61 蛋白質を添加した. 24 時間の培養後, コントロールと比較し組み換え Cyr61 蛋白質を添加した A431 細胞では 2 倍以上の浸潤能の亢進を認めた. また, 12 時間の培養後コントロールと比較し組み換え Cyr61 蛋白質を添加した OM-1 細胞では, 3 倍以上の浸潤能の亢進を示した.
- (C)分泌型 Cyr61 が上皮形質を維持する癌細胞に与える影響について検討を行った. メンブレンおよびマトリゲル上に上皮形質を維持する癌細胞を, 下部の培養ウェル内には Cyr61 安定発現細胞, Snail 安定発現細胞およびそれらのコントロール細胞を播種し, **Matrigel invasion assay** を行った. 24 時間後 A431 細胞では, コントロール細胞と比較し, Cyr61 安定発現細胞および Snail 安定発現細胞ともに 4 倍以上の浸潤能の亢進を認めた. 12 時間後 OM-1 細胞では, コントロール細胞と比較し, Cyr61 安定発現細胞および Snail 安定発現細胞では 5 倍以上の浸潤能の亢進が確認された.
- (D)インテグリン競合阻害剤である RGD ペプチド(50 μ g/ml), およびそのネガティブコントロールである RGE ペプチド(50 μ g/ml)存在下で **Matrigel invasion assay** を行った. その結果, 組み換え Cyr61 蛋白質によって亢進した浸潤能は, RGD ペプチドの添加によりほぼ完全に抑制された.

図 8 Cyr61 による運動制御機構の解析

- (A)Cyr61 安定発現細胞における Rho family protein の遺伝子発現を, RT-PCR を用いて検討した. RhoA, RhoC, Cdc42, Rac1 の発現に明らかな変化は見られなかった.
- (B)Cyr61 安定発現細胞における Rac1 および Rho の活性を検討した. 活性化

型の Rac1 や Rho に親和性のあるカラムを用いた Pull down 法により活性型各タンパクを精製後，精製された活性型 Rac1 および Rho を Western blotting により定量した．その結果，Cyr61 安定発現細胞の抽出蛋白質では Rac1 活性が低下し，Rho の活性が上昇するという活性バランスの変動が生じた．

(C)Rho family protein の活性制御因子の遺伝子発現を RT-PCR を用いて検討した．その結果，Rho 抑制因子 RhoGAP1, RhoGAP8 の発現低下および Rho 活性化因子 GEF-H1 の発現亢進が明らかとなった．

図 9 Cyr61 安定発現による癌浸潤像

Cyr61 安定発現細胞における癌浸潤像を，Type I コラーゲンと正常ヒト不死化歯肉線維芽細胞 GT-1 を用いた三次元培養を用いて検討した．A431 コントロール細胞においては，ゲル状に重層構造を構築し，低い浸潤像を示す．Snail 安定発現細胞では，細胞間接着が解除されゲル内へのびまん性浸潤像を示した．一方 Cyr61 安定発現細胞では細胞間接着を維持したまま高度にゲル内へ浸潤した．OM-1 細胞でも同様，コントロール細胞ではゲル上での重層構造と低い浸潤像を呈する．Snail 安定発現細胞では細胞間接着の解除とびまん性浸潤像を形成したが，Cyr61 安定発現細胞では細胞間接着を維持したままの高度な浸潤像を示した．

図 10 口腔扁平上皮癌における初期浸潤像形成（考察）

本研究結果より以下のカスケードが推察された．

Snail を高発現する EMT 型癌細胞は，E カドヘリンの発現低下を伴うびまん性浸潤像を形成する，またこの細胞は，2 次的な NF κ B の活性亢進をきたしており，

その標的遺伝子の発現亢進で自身に抗アポトーシス作用を付与するとともに、分泌型 Cyr61 の産生亢進を起こす。さらに可溶性 Cyr61 は、EMT を起こしていない癌細胞に細胞遊走能依存的な浸潤能をインテグリンを介して付与する。

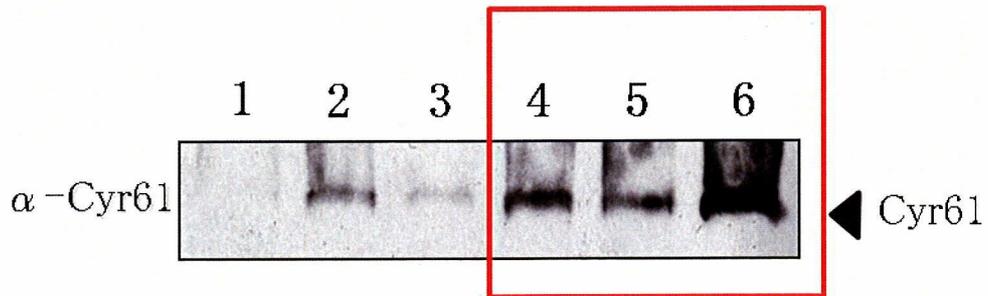
表1

target mRNA	sequence of primer	annealing temperature size
Snail	F : 5' - AATCGGAAGCCTAACTACAG-3'	60°C
	R : 5' - GGAAGAGACTGAAGTAGAG-3'	321bp
E-cadherin	F : 5' - AGCCATGGGCCCTTGGAG-3'	60°C
	R : 5' - CCAGAGGCTCTGTGCACCTTC-3'	653bp
Vimentin	F : 5' - AATCGGAAGCCTAACTACAG-3'	55°C
	R : 5' - GGAAGAGACTGAAGTAGAG-3'	750bp
CYR61	F : 5' - CTCCTGTTTTTGGAATGGA-3'	54°C
	R : 5' - TGGTCTTGCTGCATTTCTTG-3'	241bp
ICAM1	F : 5' - GCCAACCAATGTGCTATTCA-3'	52°C
	R : 5' - CTCCCGTTTCAGCTCCTTCT-3'	212bp
XIAP	F : 5' - GAAGACCCTTGGGAACAACA-3'	56°C
	R : 5' - CGCCTTAGCTGCTCTCTTCAGT-3'	400bp
IAP-2	F : 5' - CAGAATTGGCAAGAGCTGG-3'	52°C
	R : 5' - CACTTGCAAGCTGCTCAGG-3'	386bp
Bcl-xL	F : 5' - GGCAACCCATCCTGGCACCT-3'	60°C
	R : 5' - AGCGTTCCTGGCCCTTTCCG-3'	476bp
RhoA	F : 5' - TTCCTTGAATTAGCGCCTGG-3'	58°C
	R : 5' - AATCTGGGTGCCTTGTCTTG-3'	283bp
RhoC	F : 5' - TGAGCACTCAAGGTAGCCAA-3'	56°C
	R : 5' - ACATTCCTGAGAAGTGGACC-3'	310bp
Rac1	F : 5' - AAAGGTTCCAAGGGACAGGA-3'	56°C
	R : 5' - TGTCCCAACACTCCCATCAT-3'	597bp
Cdc42	F : 5' - CTCCGGAAACTCAACCCAAA-3'	56°C
	R : 5' - CTGAGCATCAGGCAACTCAA-3'	280bp

表1

target mRNA	sequence of primer	annealing temperature size
RhoGAP1	F : 5' - CCCATCAACACCTTCACCAA -3'	56°C
	R : 5' - AGAGAGGCAGTGAGAAGTGT -3'	300bp
RhoGAP8	F : 5' - TCGGGCTGAATTTGATCTGG -3'	56°C
	R : 5' - TGTGGGAGGTAGCTCGAAAT -3'	300bp
GEF-H1	F : 5' - ATGTCTCGGATCGAATCCCT -3'	56°C
	R : 5' - CGAAGAGAAACGGACTGCAA -3'	340bp
G3PDH	F : 5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'	53°C
	R : 5' - CAGCCCCAGCGTCAAAGGTG -3'	373bp

A



non-EMT癌細胞株

1. A431
2. OM-1
3. HOC719-PE

EMT型癌細胞株

4. HOC719-NE
5. HOC313
6. TSU

B

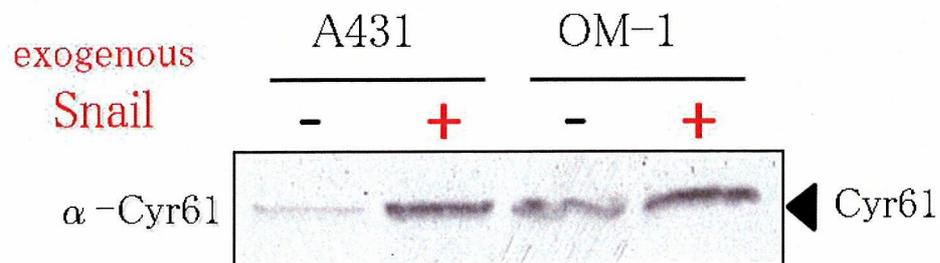


図 1

C

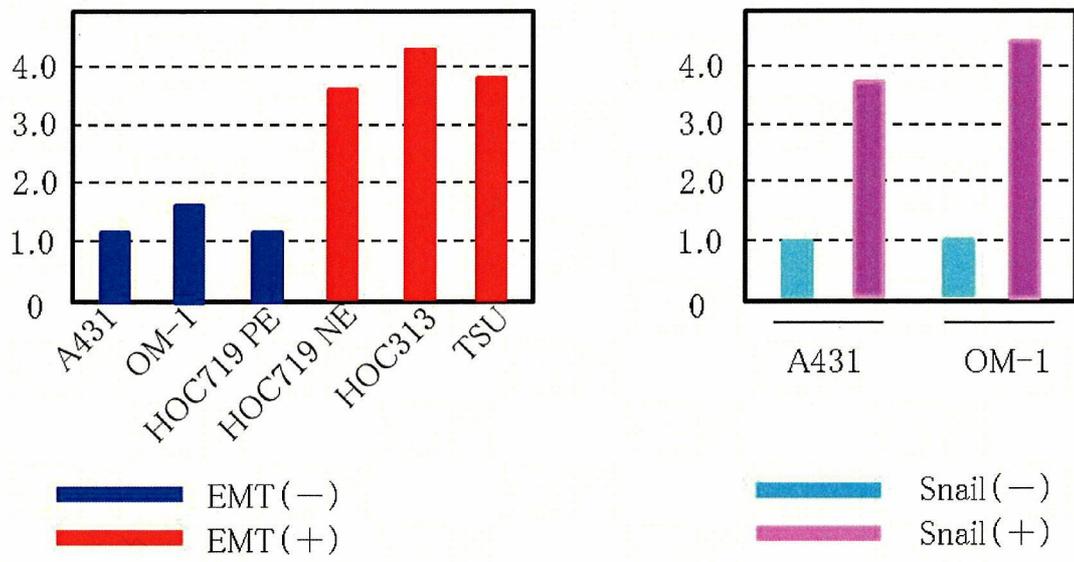


図 1

C

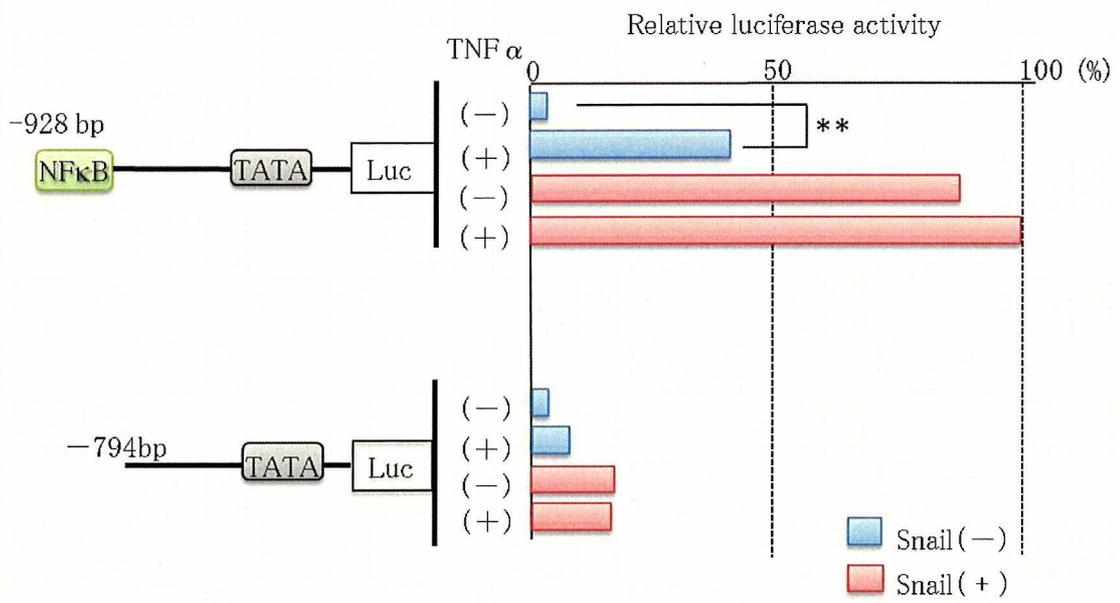
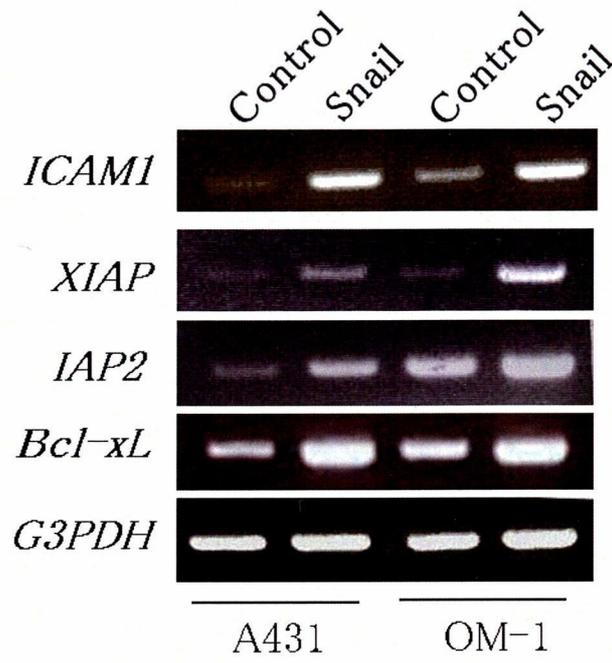


图 2

D



E

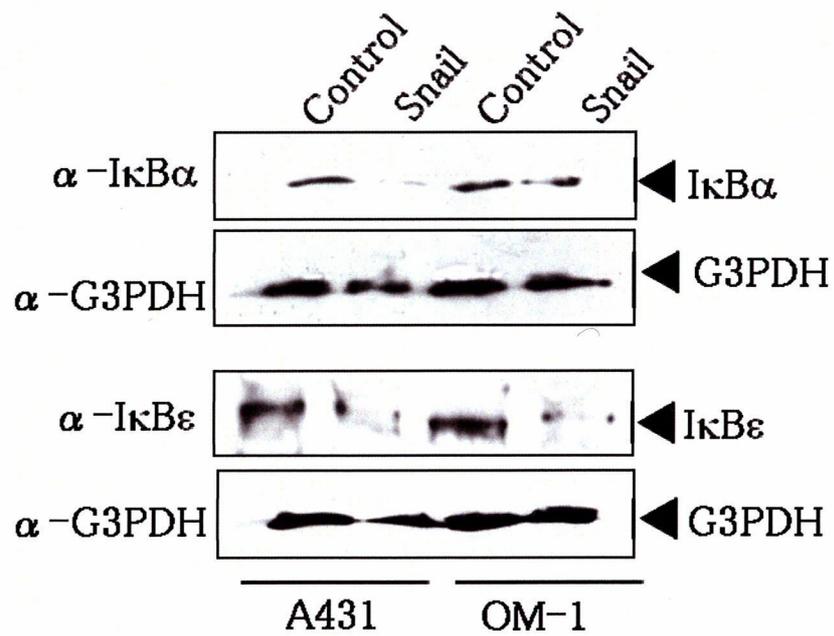
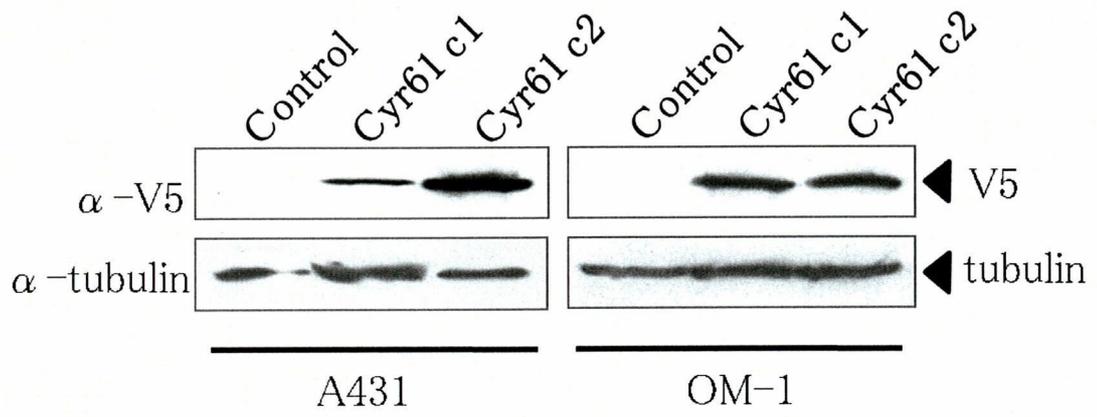


图 2

A



B

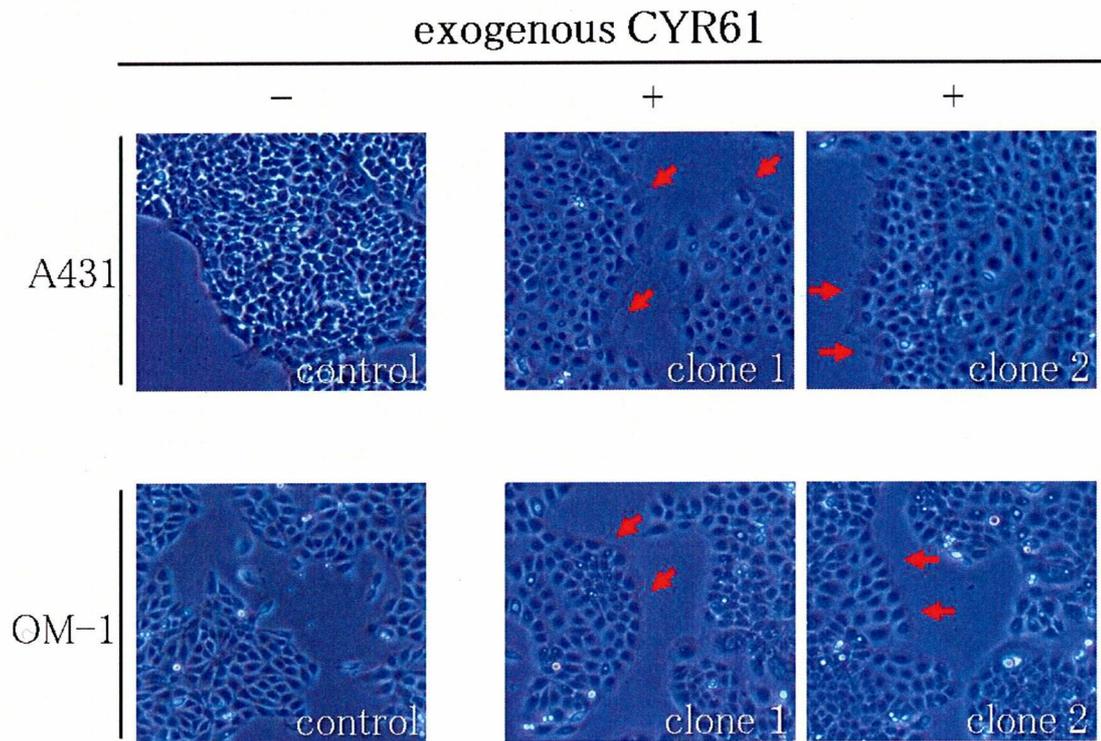


图 3

C

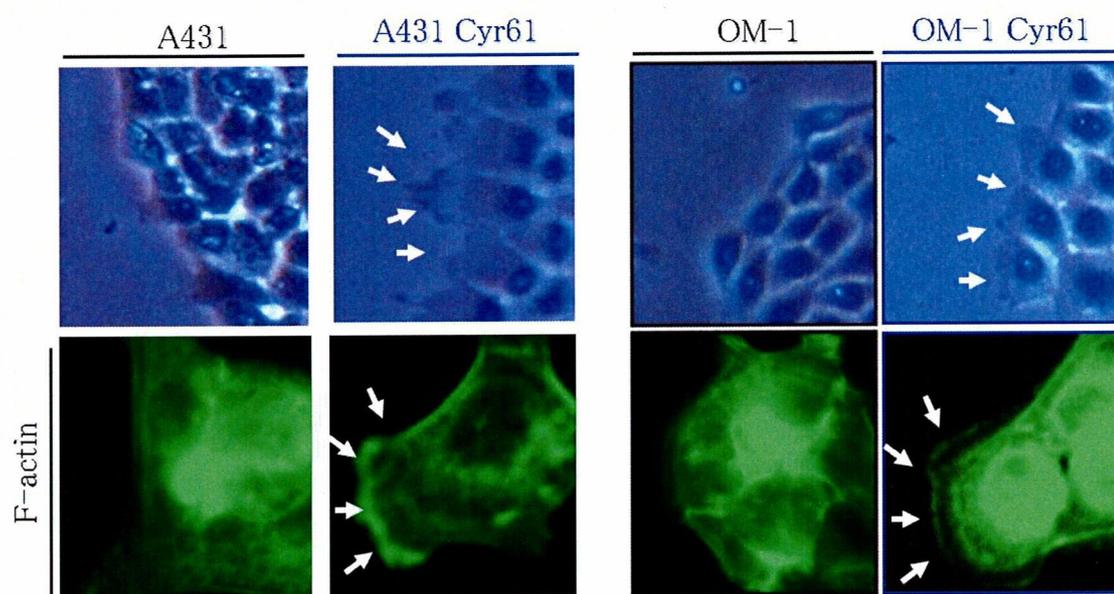


图 3

A

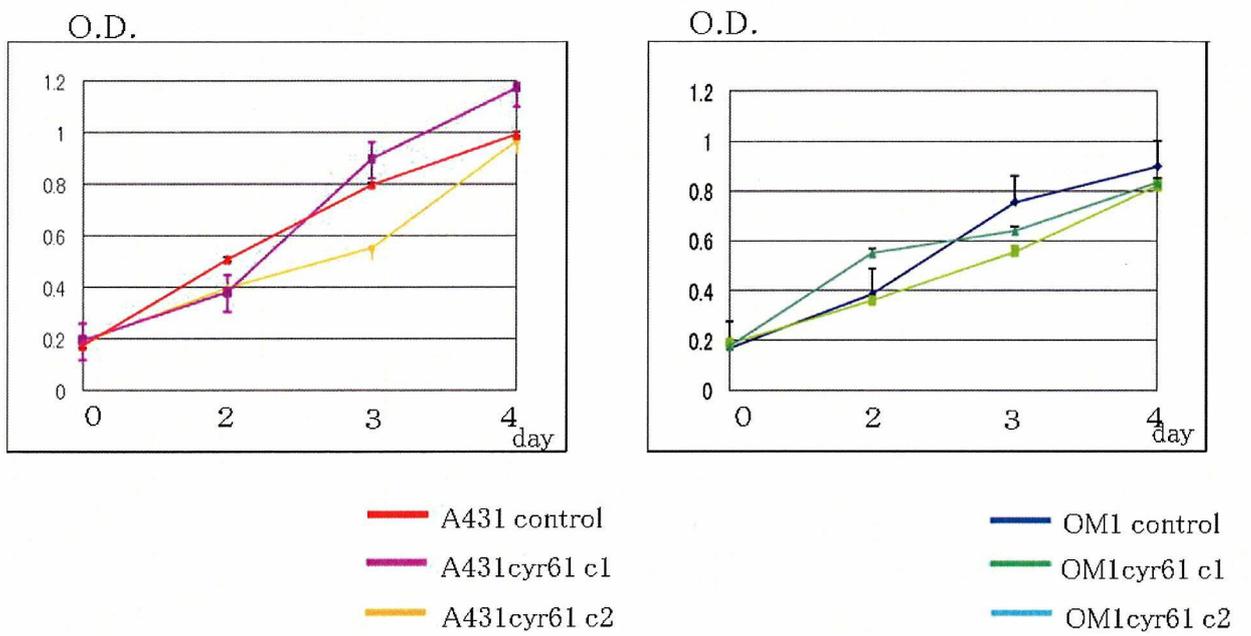


图 4

B

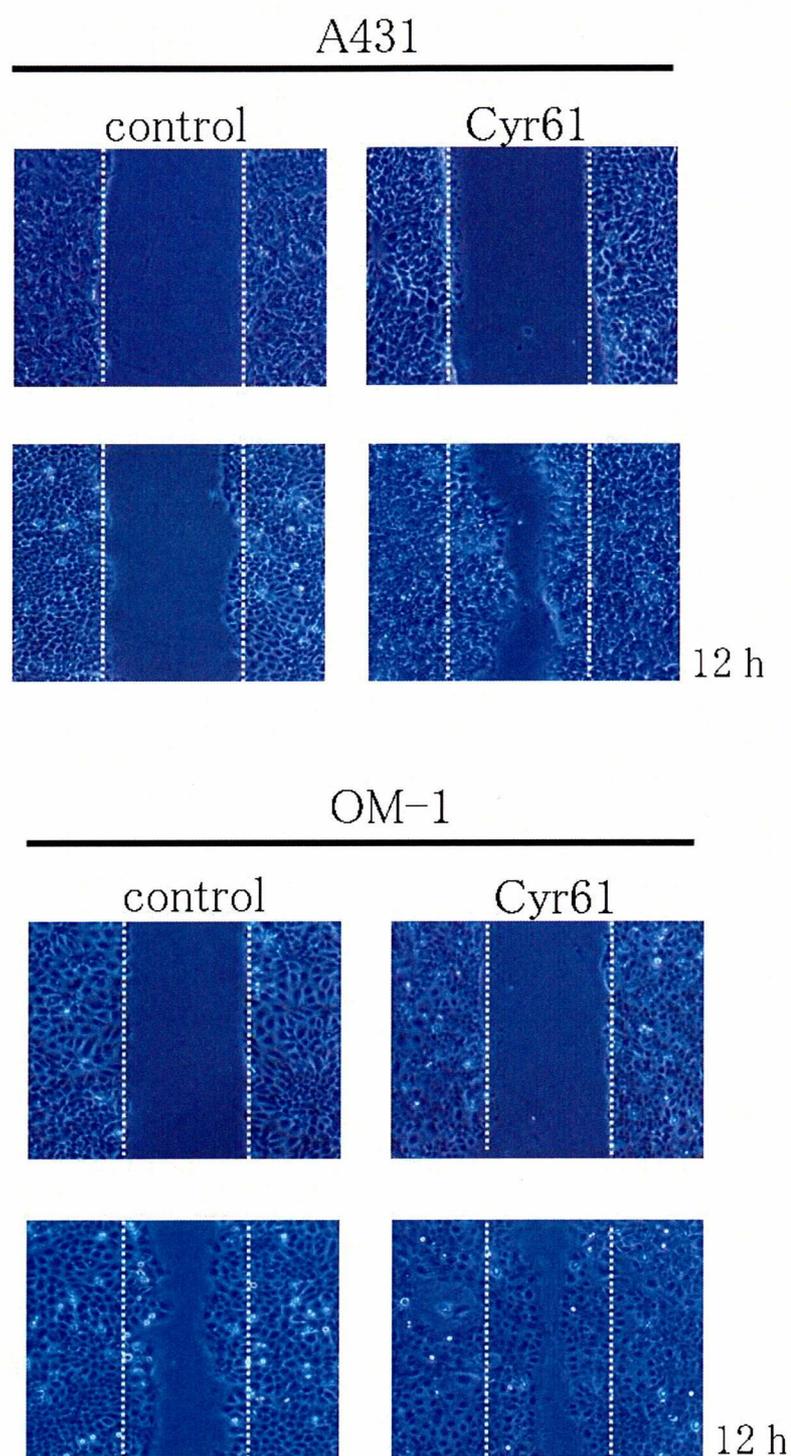


图 4

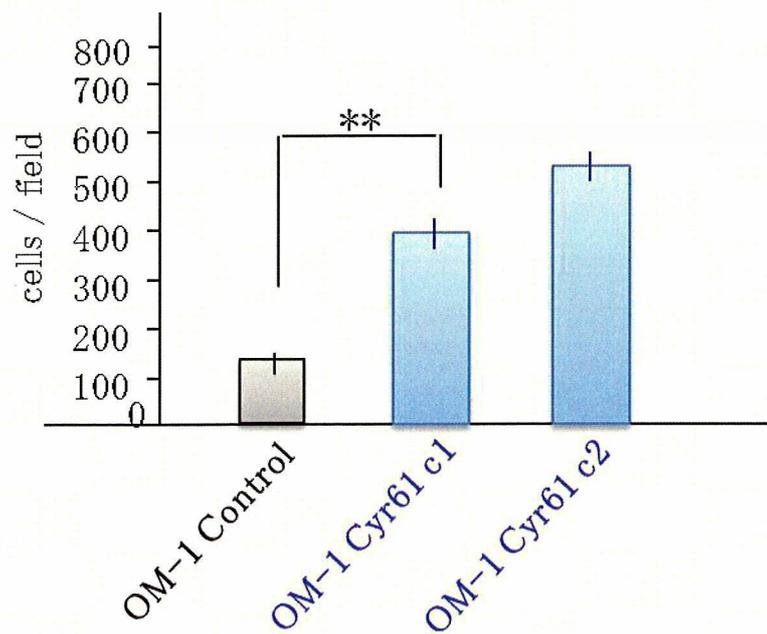
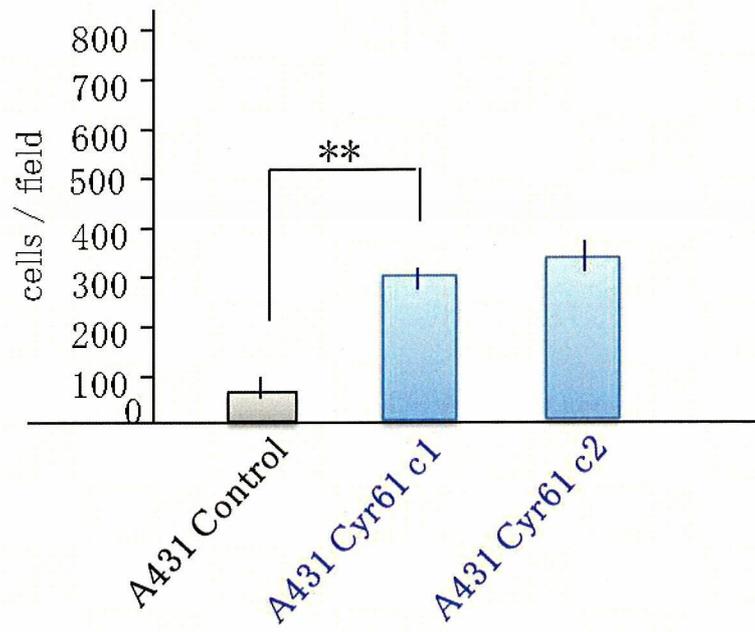
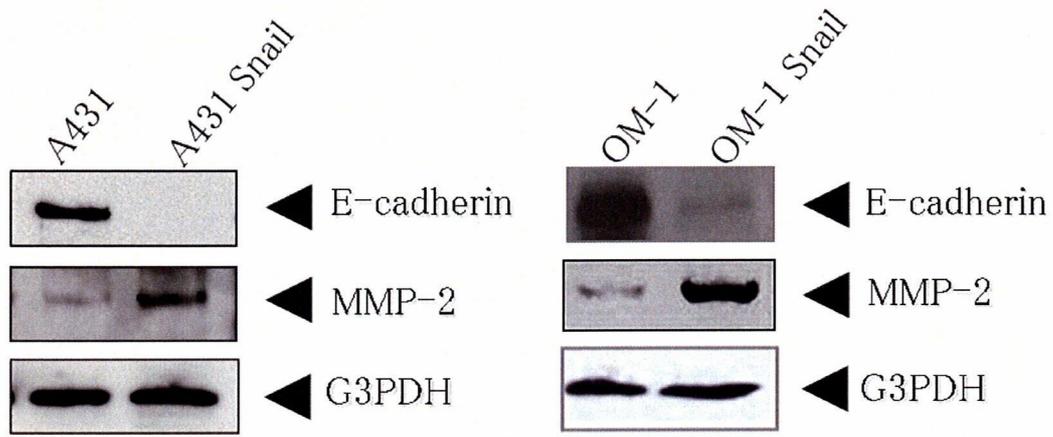


图 5

A



B

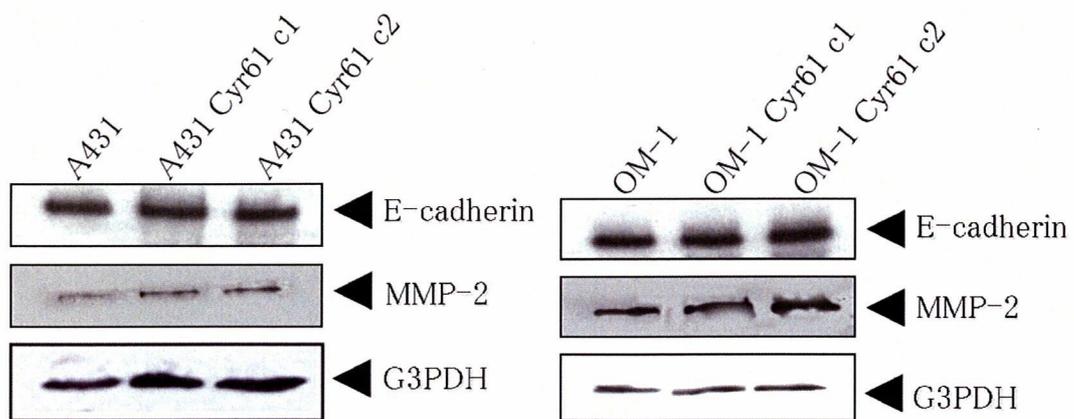


图 6

A

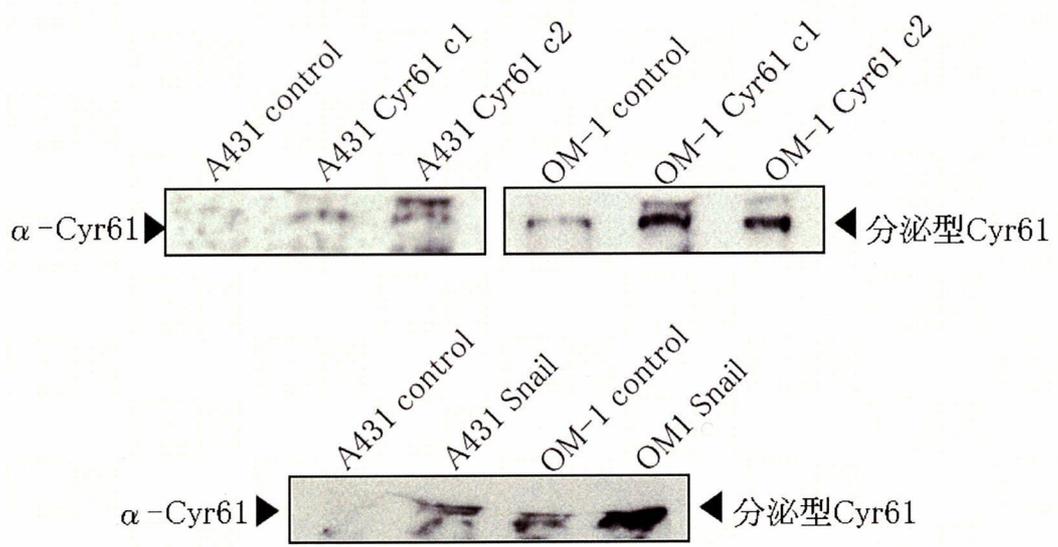


图 7

B

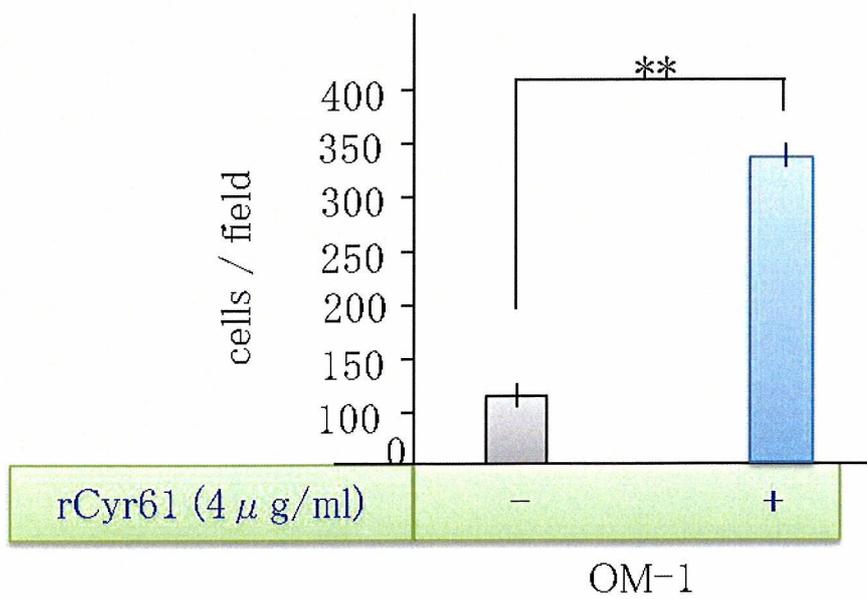
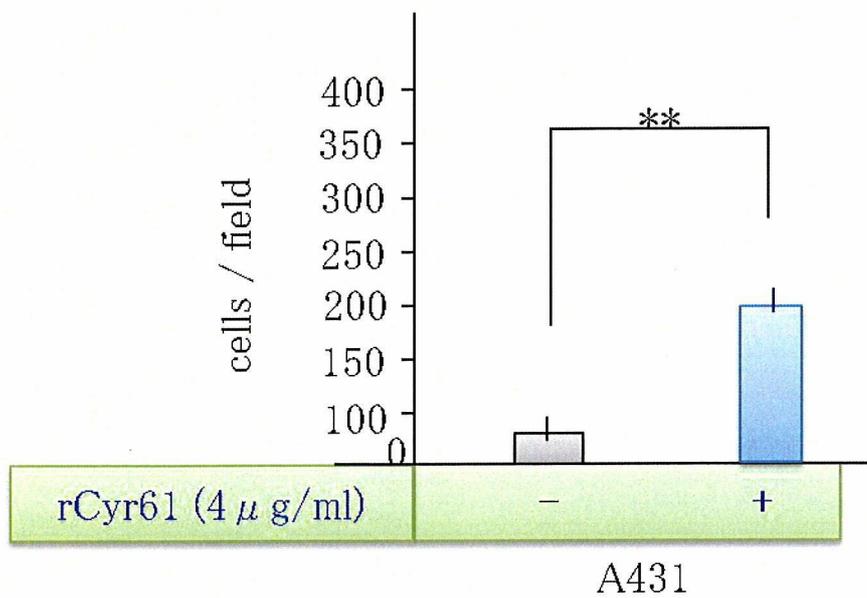


图 7

C

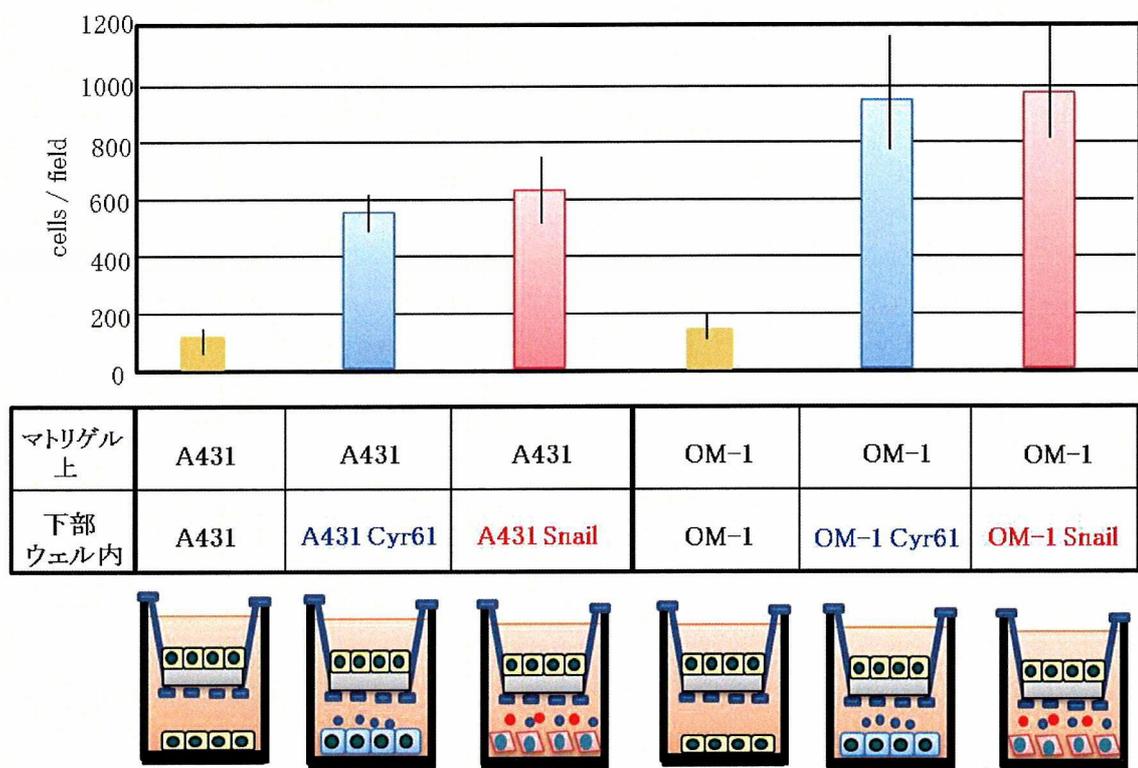


図 7

D

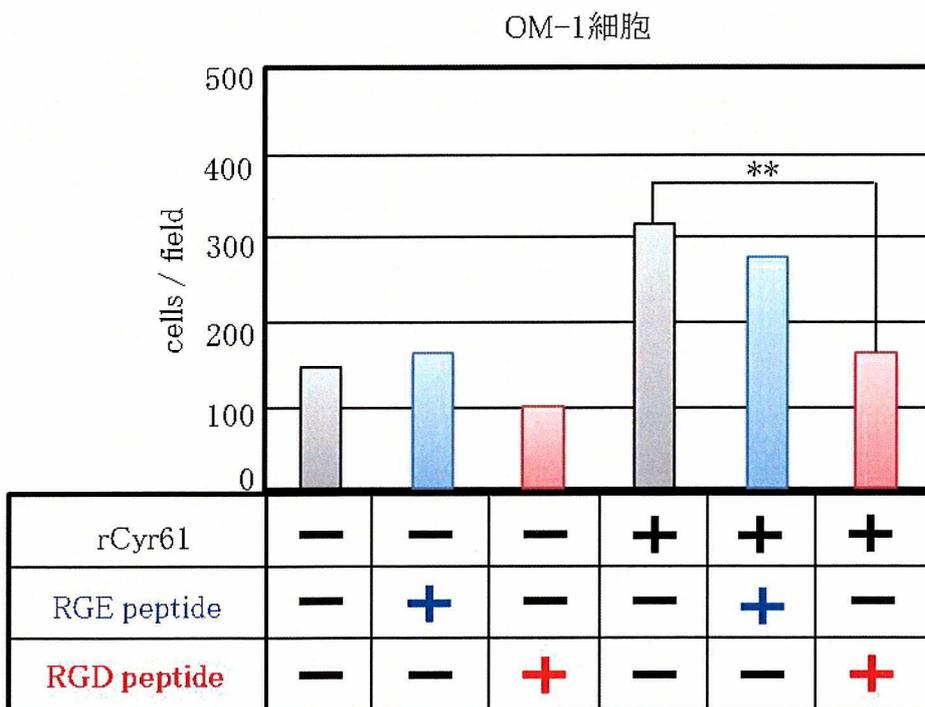
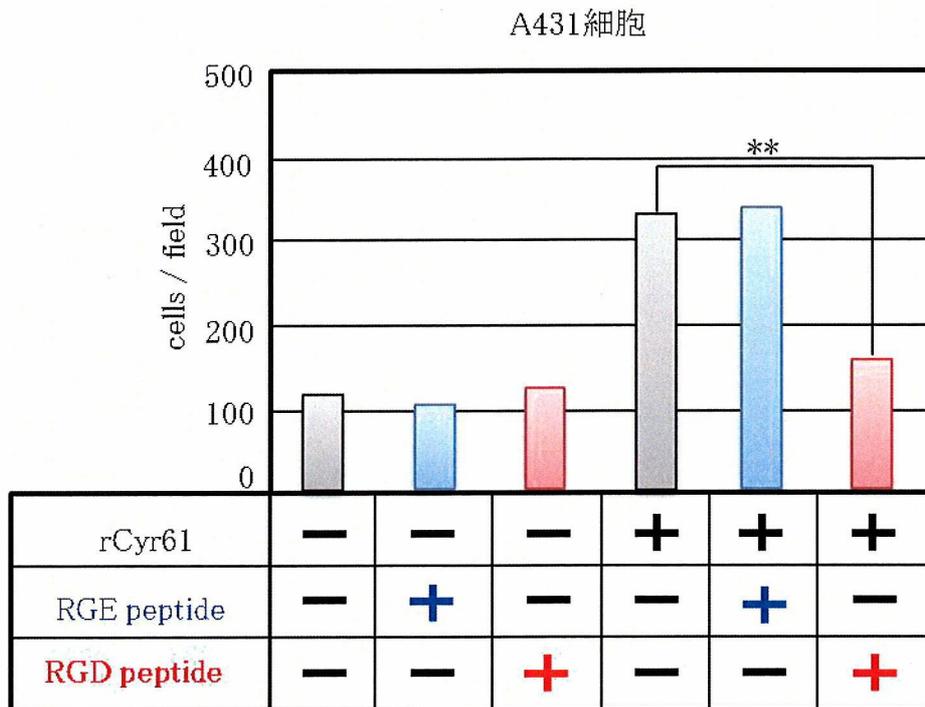


図 7

A

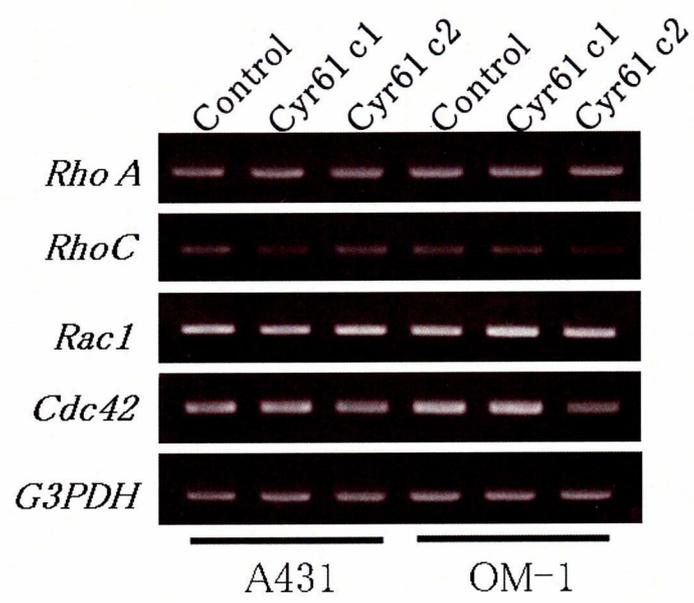
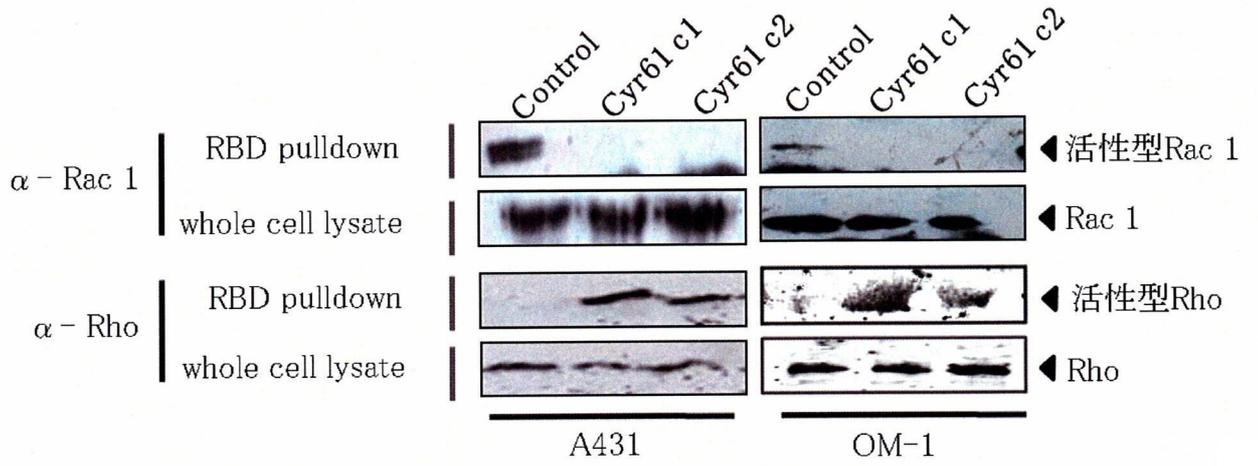
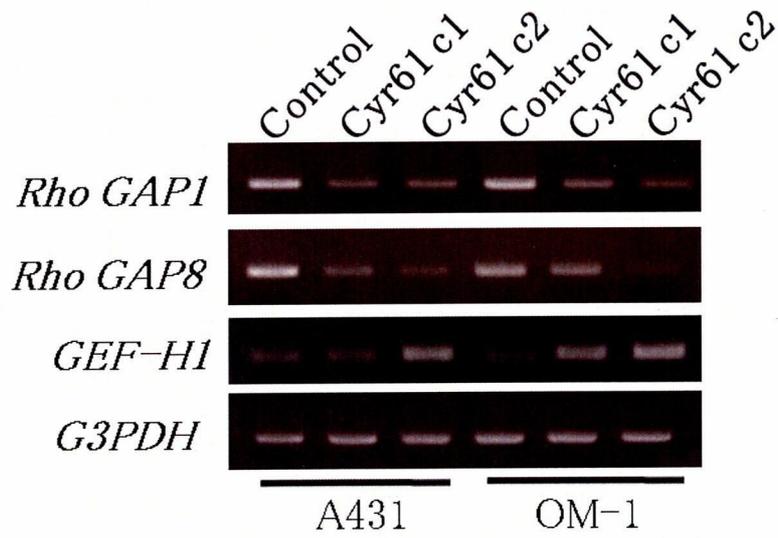


图 8

B



C

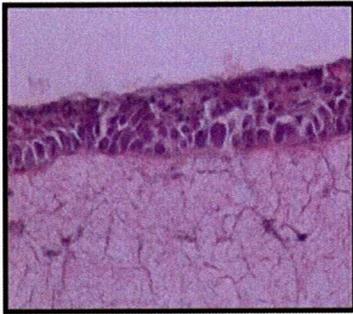


☒ 8

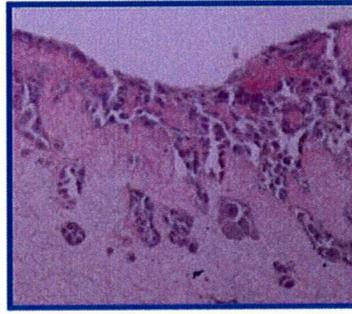
A

A431細胞

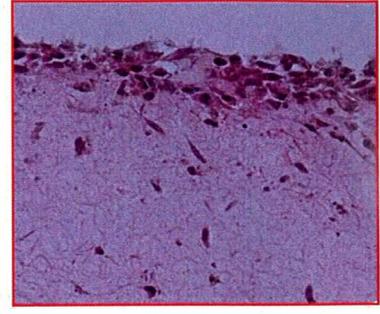
Control



Cyr61



Snail



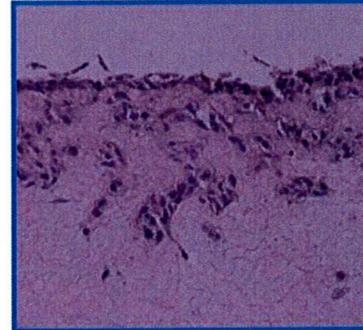
B

OM-1細胞

Control



Cyr61



Snail

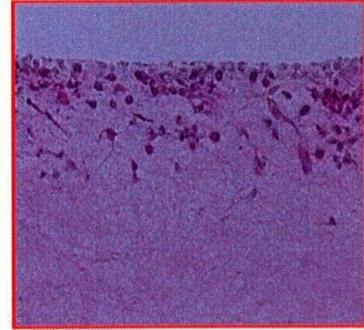


図 9

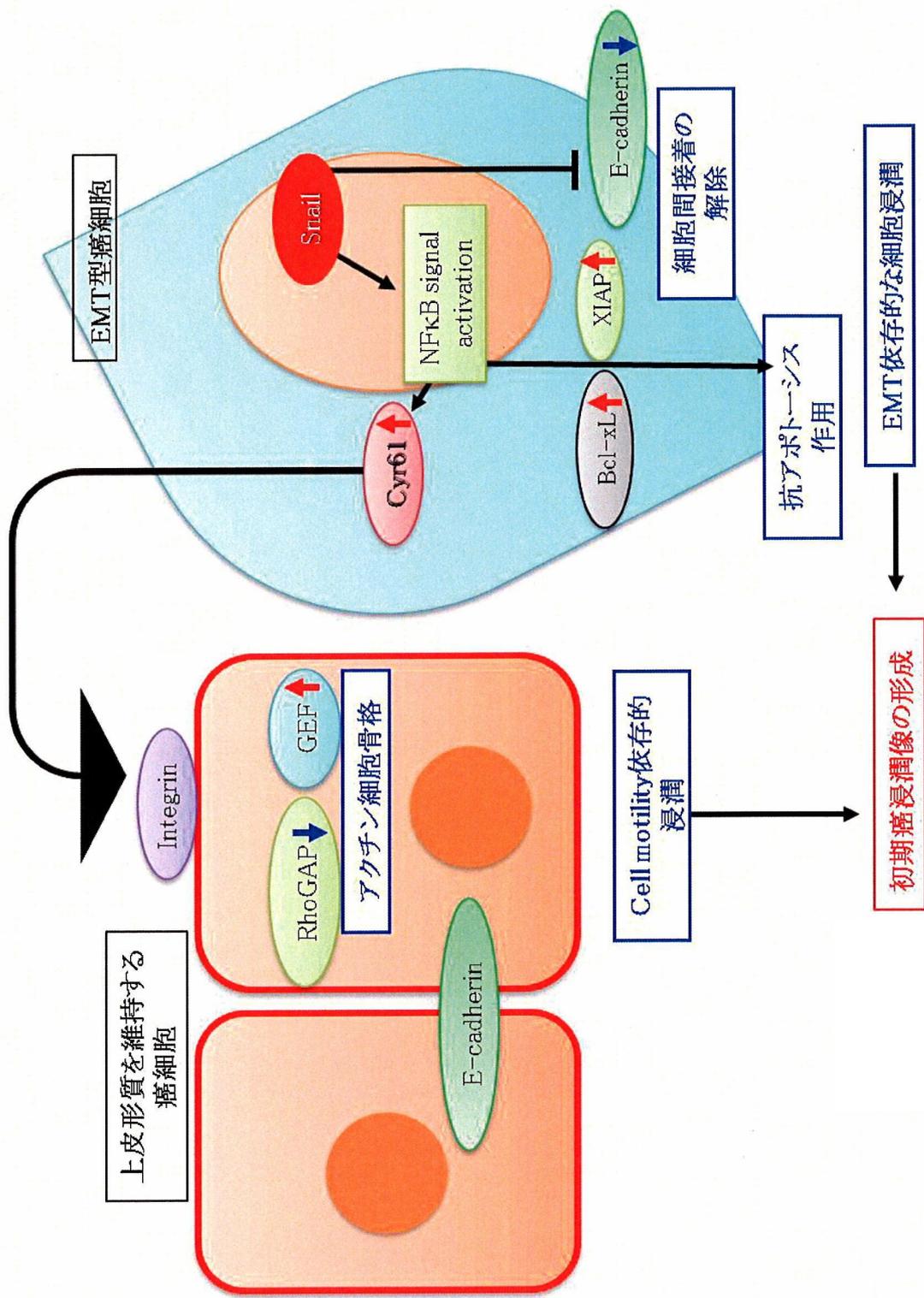


図 10