

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592203

研究課題名（和文） 頭頸部がんの浸潤・転移に対する Wnt/Snail シグナルと MMP の制御

研究課題名（英文） Regulation of Wnt/Snail signal and MMP on head and neck cancer invasion and metastasis

研究代表者

家根 且有（YANE KATSUNARI）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：40220199

研究成果の概要（和文）：Wnt シグナルおよびその下流に存在する Snail が、マトリックスメタロプロテアーゼ（MT-MMPs）の発現を誘導することによって癌細胞の浸潤・転移を促進することを、新しい簡便な *in vivo* モデルである鶏卵絨毛尿膜を用いた chick chorioallantoic membrane assay（CAM assay）で明らかにした。また高度の浸潤・転移能を有する癌細胞の Snail 発現を抑制すると浸潤・転移は抑制されることから、Snail を標的とした阻害薬が癌の浸潤・転移を抑制する新しい治療法になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrate that Wnt signaling and its downstream factor, Snail, induce cancer invasion and metastasis *in vivo* via a matrix metalloproteinase-dependent process, using a chick chorioallantoic membrane invasion assay（CAM invasion assay）. Furthermore, siRNA-specific silencing of Snail ablates the ability of cancer invasion and metastasis. Taken together, these data suggest that Snail1-targeted therapy could be effective to cancer invasion and metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：頭頸部がん、浸潤、転移、Wnt、Snail、MMP

1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞が浸潤・転移していく過程で、上皮の基底膜や周囲の間質を突き破り増殖していくためにはタンパク質分解酵素

proteinase が必要であり、特にその浸潤・転移のあらゆる局面において MMP が関与していると言われている (Matrisian LM *et al.* J.

Clin. Oncol. 18(5):1135-1149, 2000)。これまでに、細胞膜結合型の MMP である MT1-MMP が、がん細胞自身に強発現し、がん細胞の浸潤・転移の直接的な担い手となることを報告している (Sabeh F, Ota I *et al.* J Cell Biol. 167(4), 769-781, 2004)。さらに、肝臓がんにおいて Snail の発現と MT1-MMP の発現には正の相関関係があり、Snail の強発現患者は予後が悪いとも報告されている (Miyoshi A, *et al.* Br J Cancer 92:252-258, 2005)。しかし、これらの因子 (MT1-MMP、Snail、Wnt) を直接結びつける報告は未だされていない。

(2) Wnt/Snail のシグナル伝達経路が EMT を誘導し、MT1-MMP を発現させ、がんの浸潤・転移を進めることが予想される。実際、大腸がん、乳がんばかりでなく、頭頸部扁平上皮がん細胞においても Wnt-1 とそのレセプターである Fz が強発現していることが報告されており、Wnt シグナルが頭頸部扁平上皮がん細胞において恒常的にはたらいていることが確認されている (Rhee CS *et al.* Oncogene 21(43): 6598-6605, 2002; Leethanakul C. *et al.* Oncogene 19(28): 3220-3224, 2000)。したがって、頭頸部がん細胞の浸潤・転移においてもこの Snail を介した Wnt シグナル伝達経路が関与している可能性が考えられ「頭頸部がんの浸潤・転移に対する Wnt/Snail シグナルと MMP の制御」を探求することで、今後の頭頸部がん治療に大いに貢献できるものと考えた。

2. 研究の目的

MT1-MMP が、がん細胞自身に強発現することによってがん細胞の浸潤・転移の直接的に関与し (Sabeh F, Ota I *et al.* J Cell Biol. 167(4), 769-781, 2004)、Wnt シグナル伝達経路が Snail を介して EMT を誘導する可能性を示唆する報告がある (Yook JI, Ota I, *et*

al. Nature Cell Biol. 8(12):1398-1406, 2006; Yook JI, Ota I, *et al.* J Biol Chem. 280 (12):11740-11748, 2005)。今回の研究目的は、頭頸部がん細胞においていかにして Wnt/Snail のシグナル伝達経路が EMT を誘導し、MT1-MMP や MT2-MMP などのマトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMPs) を発現させ浸潤・転移を促しているかを、*in vitro* および *in vivo* のレベルで分子生物学的手法および独自の浸潤・転移モデルを用いて解明する。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部がん細胞における Wnt、Snail、MT1-MMP の発現と *in vitro* での機能解析および siRNA などの阻害薬を用いた浸潤の抑制の検討

① 遺伝子導入細胞の作製

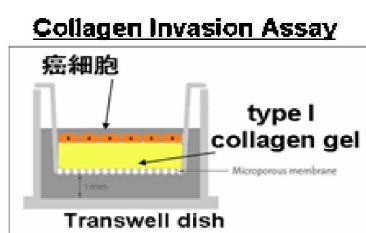
頭頸部扁平上皮癌がん細胞 (UM-SCC-1、HSC3、HSC4、SAS など) に、コントロールベクター (PCR3.1Uni; Invitrogen)、およびヒト Wnt1 あるいはヒト Snail の cDNA を PCR3.1Uni に組み込んだベクターを Fugene6 (Roche) を用いて遺伝子導入し、それぞれの遺伝子が強発現した細胞を作成する。また、siRNA によるヒト Wnt1 あるいはヒト Snail の発現抑制はコントロールを含め、electroporation 法 (Amaxa Biosystems) で細胞内に導入する。その導入効率を蛍光の nucleotide で 90% 以上あることを確認している。また siRNA の抑制効果は導入後 20 時間から 72 時間まで維持できることも確認している (Sabeh F, Ota I *et al.* J Cell Biol. 167(4), 769-781, 2004)。

② 生化学的な機能解析

これらの細胞を用いて、細胞内での Wnt、Snail、MT1-MMP の発現、相互作用をウェスタン・ブロット、免疫沈降法、レポーターアッセイなどを用いて検討する。

③ 細胞浸潤実験 Collagen Invasion Assay

ラット尾腱より抽出した type I コラーゲンを 24-mm Transwell dish (3- μ m pore size; Corning, Inc) の上部チャンバーに 1ml 加え (最終濃度 2.2mg/ml) ゲル化後、その上に上記で作製した遺伝子導入癌細胞 (1.5-2x10⁵ 個) を培地とともに加え、下部チャンバーには同様の培地とともにケモアトラクタントとして HGF (50ng/ml) を加え、7 日間培養する。その間、隔日に培地を交換し、倒立顕微鏡でその浸潤度を解析する。最終的にはコラーゲンの切片を作製し浸潤度を評価する。



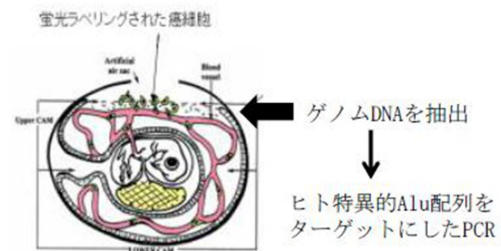
(2) がん浸潤・転移モデルを用いた頭頸部がん移植腫瘍における *in vivo* の機能解析
 鶏卵による *in vivo* がん浸潤・転移モデルを用いて、Wnt1 あるいは Snail を強発現させたがん細胞が、MT1-MMP を強発現させたがん細胞と同様に、生体において浸潤・転移能を獲得するかどうかを検討する。

① 鶏卵を用いた *in vivo* がん浸潤・転移モデル chick chorioallantoic membrane assay, (CAM assay) の作成

受精後 10 日から 11 日目の有鶏卵上面の漿尿膜 (chick chorioallantoic membrane, CAM) を傷つけないように人為的に air sac を作製し、上面の殻に径 1cm の窓を作製する。CAM 表面は、上皮細胞とその下の基底膜が形成されており、癌の初期浸潤の環境としては適していることを確認している。その CAM 表面に蛍光のナノビーズあるいは GFP でラベリングされたがん細胞 (約 10⁵ 個) を静かに播種し、約 3-5 日間、37.5°C、70%湿度の環境でイン

キュベーションする。その後、有鶏卵を上方の CAM (Upper CAM) と下方の CAM (Lower CAM) とに分け、UpperCAM からは浸潤を評価する為の切片を作製し、Lower CAM からはゲノム DNA を抽出し、その中からヒト特異的な配列である Alu 配列を PCR により増幅し、その配列が同定できれば、ヒト細胞が Lower CAM に存在することを意味し、つまり転移 (intravasation 以降の転移) が成立していることになる (Kim J *et al.* Cell 84:353-362, 1998)。

この CAM assay の特徴は、マウスを用いたがん浸潤・転移実験などと比べ、管理が簡便で、経費も安くつき、結果が迅速に判定できる点で、効率的に機能を解析できることである。



② がん浸潤・転移モデルを用いた頭頸部がん移植腫瘍における *in vivo* の siRNA を用いた浸潤・転移の抑制の検討

元来 Wnt1 あるいは Snail を強発現しているがん細胞に対して、特異的な siRNA を用いて遺伝子発現を knock down させ、生体において転移能を抑制できるかを鶏卵による *in vivo* がん浸潤・転移モデル (CAM assay) を用いて検討する。

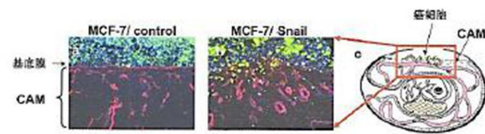
Wnt1 を強制発現させた癌細胞 (MCF7-Wnt1)、あるいは Snail が強発現している癌細胞 (HSC3 など) に、pSUPER-Snail-shRNA (あるいは pSUPERcontrol) と pCMS-EGFP plasmid とをリポフェクタミンを用いて遺伝子共導入し、Snail の発現を調節されたこれらの癌

細胞の浸潤・転移能についてこれまでに我々が確立した *in vivo* 癌浸潤・転移アッセイ (CAM assay) を用いて評価する。

4. 研究成果

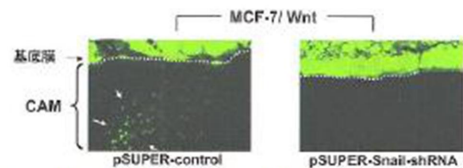
(1) ヒト癌細胞の動きをモニタリングするプラットフォームとして collagen invasion assay を用い、EMT を誘導された癌細胞において、膜結合型である MT1-MMP および MT2-MMP が、MMP-2 や MMP-9 などの分泌型 MMP にはない癌浸潤・転移能、血管新生能を発揮していることを見出した。すなわち Snail1 の発現が誘導されると、それまで浸潤能を有していなかった癌細胞に MT1-MMP と MT2-MMP の発現が誘導され、癌細胞の浸潤、増殖および血管新生が引き起こされることが分かった。一方、MT-MMPs を RNAi で knock-down することで、Snail1 による癌細胞の浸潤、転移、および血管新生を抑えることができた。以上の結果より、Snail1 により誘導された MT1-MMP と MT2-MMP が協調的にはたらき、癌細胞の浸潤、転移に直接的に関与していることが示唆された。

(2) これらの現象が *in vitro* だけでなく *in vivo* でも同様の現象が認められるかについて鶏卵によるがん浸潤・転移モデル chick chorioallantoic membrane assay (CAM assay) を用いて検討した。細胞の観察には GFP fluorescence 発現ベクターを用いた。結果は、Snail の発現していないコントロール細胞 (MCF-7/control) は CAM の基底膜上で浸潤せず留まっているのに対して、Snail を強発現させた細胞 (MCF-7/ Snail) は基底膜を破壊し、CAM 組織内に浸潤することが確認された。つまり、Snail が細胞間接着分子 E-カドヘリンの発現抑制を引き起こすことで上皮-間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) を誘発することが示唆された。

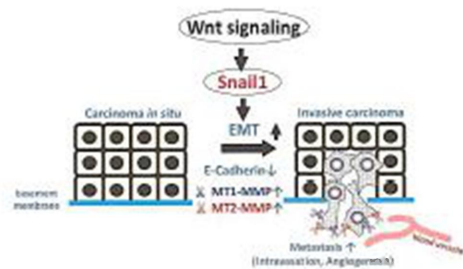


CAM assayを用いることによって、浸潤能のないMCF-7細胞にSnail遺伝子を導入すると基底膜を破壊し、CAM組織内に浸潤することが可視的に確認された。(緑:癌細胞、赤:type IV collagenを含む基底膜)

(3) さらに CAM assay を用いて、Snail を強発現しているがん細胞に対して Snail の遺伝子発現を抑制する目的で pSUPER-Snail-shRNA を導入すると、元来強い浸潤能を有する癌細胞 (MCF7-Wnt1 または HSC3) の浸潤能は抑制されることが確認された。以上の結果にて、Snail を標的とした siRNA を用いることによって浸潤・転移が抑制されることが明らかとなり、将来的には Snail を標的とした阻害薬が浸潤・転移を抑制する新しい治療法になる可能性が示唆された。



Wnt遺伝子を導入しSnailを強発現させたMCF-7細胞に、Snail特異的siRNAを導入しSnailをノックダウンさせると、細胞の浸潤能は抑制されることをCAM assayで可視的に明らかにした。(緑:癌細胞、矢印:浸潤している癌細胞、点線:CAM表面の基底膜レベル)



WntシグナルによるSnailを介した浸潤能の獲得

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Ota I, Okamoto N, Yane K, Takahashi A, Masui T, Hosoi H, Onishi T, Therapeutic strategies for head and neck cancer based on *p53* status, Experimental and

Therapeutic Medicine, 3: 585-591, 2012.

査読無

- ② Okamoto N, Takahashi A, Ota I, Ohnishi K, Mori E, Kondo N, Noda T, Nakagawa Y, Uemura H, Yane K, Hosoi H, Ohnishi T, siRNA targeted for *NBS1* enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells, *Int J Hyperthermia*, 27:297-304, 2011. 査読有
 - ③ 太田一郎、家根旦有、細井裕司 : Snail による MT1-MMP および MT2-MMP の癌浸潤・転移の制御、耳鼻免疫アレルギー、査読無、28(3) : 235-238, 2010.
 - ④ Ota I, Xiao-Yan Li, Yuexian Hu, Stephen J Weiss: Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *PNAS* 106:20318-20323, 2009. 査読有
- 他 4 件
[学会発表] (計 12 件)
- ① Ota I, siRNA targeted for *NBS1* enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells. The 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Dec 8, 2011, Kobe, Japan.
 - ② 家根旦有、頭頸部癌に対する分子標的治療の展望について、第 16 回頭頸部癌化学療法研究会、2011 年 2 月 3 日、東京
 - ③ 太田一郎、Snail による MT1-MMP および MT2-MMP 依存性の癌浸潤能の誘導、第 111 回日本耳鼻咽喉科総会、2010 年 5 月 19 日、仙台
 - ④ 家根旦有、Snail による MT1-MMP および MT2-MMP の癌浸潤・転移能の制御、第 16 回 国際癌治療増感研究会、2010 年 6 月 19 日、岐阜

⑤ Ota I, Snail mobilizes the membrane-anchored collagenases, MT1-MMP and MT2-MMP, to drive cancer cell invasion programs, The 13th Japan-Korea Joint Meeting of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Sep 11, 2010, Seoul, Korea.

⑥ 家根旦有、Snail を介した Wnt シグナル伝達によるがんの浸潤・転移の制御、第 12 回癌治療増感研究シンポジウム、2010 年 2 月 14 日、奈良

⑦ 太田一郎、Snail1 による MT-MMP および MT2-MMP の癌浸潤・転移能の制御、第 28 回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2010 年 2 月 19 日、福井

⑧ Ota I, Snail1 induces the membrane-anchored collagenases, MT1-MMP and MT2-MMP, to drive cancer cell invasion programs in vivo, 第 68 回日本癌学会、2009 年 10 月 2 日、横浜

⑨ Ota I, Snail mobilizes the membrane-anchored collagenases MT1-MMP and MT2-MMP to drive cancer cell invasion programs *in vivo*, 100 th Annual Meeting 2009, Apr 11, 2010, Denver, USA

他 3 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家根 旦有 (Yane Katsunari)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号 : 40220199

(2) 研究分担者

大西 武雄 (Ohnishi Takeo)
奈良医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 60094554

太田 一郎 (Ota ichiro)
奈良医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00326323