

論 文 要 旨

The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells

転写因子 Snail は口腔扁平上皮癌細胞において E-カドヘリンと Desmoglein 2 の分解を亢進する

久 米 健 一

【序論および目的】

近年、癌細胞が浸潤転移を行う際に、転写因子 Snail の発現が上昇した結果、間葉系性質を獲得する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition ; EMT) が起こっていることが明らかにされてきた。もともと Snail は発生初期に外胚葉細胞が遊走能を持つようになり中胚葉を合成する際に発現が多くみられるタンパクである。口腔癌に限らず、様々な固形癌において浸潤転移を起こすものほど予後が悪いことが言われているが、その詳細な機序は解明されていない。この機序を解明することは患者生存率を上昇させる上で必要であると考えられる。

今回われわれは、口腔扁平上皮癌細胞株 (OSCC 細胞株) である HSC-4 細胞に遺伝子導入し、Snail を発現させた Snail/HSC-4 細胞を新規に樹立、その挙動を分析し、OSCC 細胞株が EMT 性質を獲得し浸潤転移能を亢進する機序を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

1. OSCC 細胞株である HSC-4 細胞に、ヘマグルチニン(HA)で標識した Snail 発現ベクターを導入し、Snail 強制発現 HSC-4 細胞(Snail/HSC-4 細胞)を新規に樹立した。コントロールとして HSC-4 細胞に HA で標識した GFP 発現ベクターを導入した GFP/HSC-4 細胞を作製した。これらの細胞を用いて、細胞形態、遊走能(Wound healing assay)、浸潤能(invasion assay)について比較した。
2. HSC-4 細胞、GFP/HSC-4 細胞、Snail/HSC-4 細胞に対して、E-カドヘリン、desmoglein 2 などの上皮系マーカーと N-カドヘリン、vimentin などの間葉系マーカーの発現変化を蛍光免疫染色法、免疫ブロット法、RT-PCR 法を用いて比較した。また、HSC-4 細胞と Snail/HSC-4 細胞に対しては同じ上皮系マーカーと間葉系マーカーの発現変化について DNA マイクロアレイ法を用いて比較した。
3. Snail/HSC-4 細胞での上皮系マーカーの挙動を調べるためにタンパク合成阻害剤である Cyclohexisimide を加えて、これらのマーカーの経時的な発現量の変化と局在の変化をそれぞれ免疫ブロット法と蛍光免疫染色法を用いて解析した。また、これらのマーカーはエンドサイトーシスによって分解されていることを調べるために dynamin 阻害剤である dynasore 処理を行い免疫ブロット法を施行した。
4. Snail は transforming growth factor(TGF)経路の下流で働くタンパクであることが報告されていることから、TGF- β 刺激による HSC-4 細胞の変化を RT-PCR 分析を用いて調べた。

【結 果】

1. HSC-4 細胞や GFP/HSC-4 細胞は上皮細胞様の多角形の敷石状形態であったが、Snail/HSC-4 細胞では紡錘形へ形態変化した。また、HSC-4 細胞と比較して Snail/HSC-4 細胞では、遊走能・浸潤能の亢進が見られ、Snail/HSC-4 細胞では約 7.6 倍も浸潤細胞数が多かった。
2. 免疫染色では、Snail/HSC-4 細胞では上皮系マーカーである E-カドヘリンや Desmoglein 2 の発現低下、間葉系マーカーである N-カドヘリンや vimentin の発現上昇が見られた。免疫ブロット分析、RT-PCR 分析、DNA マイクロアレイ分析でも上皮系マーカーの発現が低下し、間葉系マーカーの発現が上昇するという同様の結果が得られた。
3. タンパク合成阻害剤(cycloheximide)を加えて、免疫ブロット分析を行ったところ、Snail/HSC-4 細胞では、E-カドヘリンと Desmoglein 2 の発現が経時的に減少していた。また、免疫染色による細胞の取り込み実験では、Snail/HSC-4 細胞では E-カドヘリンや Desmoglein 2 のエンドサイトーシスが亢進していた。さらに dynamin 阻害剤である dynasore を加えた実験を行ったところ、E-カドヘリンは dynamin 依存性経路によるエンドサイトーシスが起っていたが、Desmoglein 2 は dynamin 非依存性経路によるエンドサイトーシスが起っていたことが分かった。
4. HSC-4 細胞に対し、TGF- β のみを加えると、細胞表面の E-カドヘリンは減少し、TGF- β と dynasore を同時に加えると細胞表面の E-カドヘリンの減少が抑制された。

【結論及び考察】

今回の研究では、ヒト OSCC 細胞株である HSC-4 細胞において Snail の過剰発現させると EMT の性質に変化することが示された。従来、EMT への変化では Snail はカドヘリンのプロモーターに結合してその転写を抑制し、mRNA レベルで発現を抑制することが言われてきた。しかし、今回われわれの実験結果から、HSC-4 細胞において、Snail は E-カドヘリンや Desmoglein 2 の mRNA 発現を完全には抑制せずに、それらのタンパクの細胞内への取り込みを亢進する事によって分解速度が上昇し、遊走・浸潤能を上昇させていることが分かった。さらに、E-カドヘリンは dynamin 依存性経路、Desmoglein 2 は dynamin 非依存性経路を通じてエンドサイトーシスが起っていることも分かった。