

Inhibitor of DNA binding 2 が口腔扁平上皮癌におよぼす影響

鎌田, 裕

<https://doi.org/10.15017/1931838>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

Inhibitor of DNA binding 2 が
口腔扁平上皮癌細胞におよぼす影響

九州大学大学院歯学府

口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

鎌田 裕

指導教員

九州大学大学院歯学研究院

口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

森 悦秀 教授

本研究の内容の一部は下記の学術雑誌に掲載されたものである。

Introduction of *ID2* Enhances Invasiveness in *ID2* –null Oral Squamous Cell Carcinoma
Cells via the SNAIL Axis

YU Kamata, Tomoki Sumida, Yosuke Kobayashi, Akiko Ishikawa,

Wataru Kumamaru and Yoshihide Mori

CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 13 (2016) 493-498

本研究の内容の一部は下記学術雑誌に投稿中である。

ID2 expression controls epithelial–mesenchymal transition in human squamous cell
carcinoma cells through the ID2–SNAIL axis

Tomoki Sumida, YU Kamata, Yosuke Kobayashi, Akiko Ishikawa and Yoshihide Mori

Experimental Cell Research (Submitted)

目次

目次	2
略語表	3
要旨	4
緒言	6
実験材料と方法	8
結果	15
考察	25
結語	30
謝辞	31
引用文献	32

略語表

bHLH : basic helix-loop-helix transcription factor (塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス型転写因子)

cDNA : complementary DNA (相補的 DNA)

EMT : epithelial-mesenchymal transition (上皮間葉転換)

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)

FBS : fetal bovine serum (ウシ胎仔血清)

ID : inhibitor of DNA binding

IP : immunoprecipitation (免疫沈降)

MMP : matrix metalloproteinase (マトリックスメタロプロテアーゼ)

MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrasodium bromide

PBS : phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium (ロズウェルパーク記念研究所培地)

SDS : sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)

TBST : Tris-buffered saline Tween 20 (0.1% Tween 20 含有トリス緩衝生理食塩水)

要旨

Basic helix-loop-helix 型転写因子 (bHLH) は、生物における組織特異的な遺伝子の調節因子である。bHLH 単体は、HLH 領域と塩基性領域から構成されている。

bHLH は HLH 領域で結合し二量体を形成し、塩基性領域で E-box を持つ標的遺伝子に結合し転写を調節している。Inhibitor of DNA-binding (ID) タンパクは bHLH と二量体を形成するが、ID は塩基性領域を欠く構造をしており、ID-bHLH ヘテロ二量体は標的遺伝子に結合できない。ID は bHLH の機能の調節を行い、結果として細胞の増殖や分化、悪性形質の獲得などに関与していると考えられている。ID family は ID1~4 の 4 つのサブタイプからなり、それぞれ異なるパターンの組織発現や機能を持つ。中でも ID1 は世界的に広く研究がなされており、これまで口腔癌における ID1 の役割も解析されてきた。しかし、これまで他のサブタイプに関しては十分な研究はされていない。

そこで本研究では、ID2 サブタイプに着目し、口腔扁平上皮癌細胞における役割の一端を解明することとした。実験には ID2 発現のないヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である Ca9-22 と、ID2 を強発現するヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である SAS を用いて、強制発現系と抑制系の各解析を行った。まず Ca9-22 に ID2 遺伝子を導入して ID2 を発現させ、各種悪性形質の検証、タンパク発現の検証およびマトリックスメタロプロテアーゼ活性の検証を行った。ID2 を発現させた

Ca9-22 細胞では、有意に増殖能と浸潤能の促進を認め、E-Cadherin の発現は減少し、N-Cadherin と Vimentin の発現の増強を認めた。さらに上皮間葉転換マーカーである SNAIL の発現増強も認めた。次に、SAS に ID2-antisense vector を導入して ID2 の発現を抑制し、同様にして各種悪性形質の検証とタンパク発現の解析を行った。ID2 発現を抑制した SAS 細胞では、強制発現系の実験とは対照的に間葉系マーカーの発現減少を認め、有意に浸潤能は抑制されていた。また、強制発現系と抑制系の2つの解析から SNAIL と ID2 が複合体を形成することが明らかになった。

以上の結果より、ID2 は口腔扁平上皮癌の悪性形質の促進、特に浸潤能の促進に働くことが明らかとなり、上皮間葉転換を促進していることが示された。中でも ID2-SNAIL axis が浸潤能と上皮間葉転換へ強く関与していることが示唆された。このことから ID2 は新たな治療標的となる可能性があると考えられた。

緒言

Basic helix-loop-helix transcription factor (bHLH) は、ショウジョウバエからヒトまで保存された遺伝子情報を持ち、組織の特異的発生における重要な調節因子である [1]。bHLH は、helix-loop-helix (HLH) 領域と塩基性領域から構成されている。bHLH は HLH 領域で結合し二量体を形成し、塩基性領域で E-box を持つ標的遺伝子を認識、結合し転写を調節している [2]。Inhibitor of DNA binding (ID) タンパクは bHLH と二量体を形成するが、ID は塩基性領域を欠く構造をしており ID-bHLH ヘテロ二量体は標的遺伝子に結合できない。結果として、ID は bHLH の機能調節を行うとされており、ID タンパクの構成的発現は様々な細胞の増殖や分化に関与するとされている [3,4]。現在のところ、ID タンパクは 1~4 の 4 種類が確認されており、各 ID タンパクは異なる遺伝子領域にコードされ、異なる発現様式を示す [5,6]。これまでに、ID1 に関しては口腔癌で一般的な組織型である扁平上皮癌の進展に重要な役割を果たしていることが報告されている [7]。また、他臓器の癌においても ID1 は細胞増殖の段階での発現を認め、細胞の分化を抑制するとされている。しかし、別のサブタイプである ID2 の役割に関しては未だ十分な解明がなされていない。

ID2 の HLH 領域の構造は、ID1 と近似しているが、ID1 と ID2 はそれぞれ異なる遺伝子領域にコードされており、その働きや分布様式には大きな相違が認め

められる [8,9]。ID2 は、ID1 と同様に様々な細胞の分化の過程で発現が減少することから、その機能は細胞の分化抑制であると最初に認識された [4,10]。加えて、ID2 の過剰発現は筋芽細胞の分化を抑制し [11]、T 細胞の分化成熟を阻害することなどが証明された [12]。さらに、前立腺癌の進行期には、ID1 と ID2 の発現亢進が認められた [13]。また、扁平上皮癌に目を移すと、その浸潤の先端では、E-Cadherin の発現が減少し Vimentin の発現が増強するいわゆる epithelial-mesenchymal transition (EMT) がみられることが報告されている [14]。また、浸潤度が高く悪性度の強い扁平上皮癌細胞では ID2 を強発現していることが確認されている [15]。

これらの総合的背景から、ID2 の発現も口腔扁平上皮癌においてはその進展に重要な役割を果たしていると推察した。本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株を用いて、ID2 が口腔癌細胞に及ぼす影響を調べるとともに、その悪性形質にどのような変化をもたらすかを検討することとした。

実験材料と方法

1. 細胞および試薬抗体

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である Ca9-22、SAS、HSC-2 および HSC-3 は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。OSC2、OSC5 は、高知大学医学部、尾崎登喜夫名誉教授により樹立され [16]、供与を受けた。FBS は、Filton Pty (Brooklyn, Australia) より購入した。Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 培地は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。細胞は 5% FBS 含有 RPMI1640 培地にて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。細胞株の継代は、phosphate-buffered saline (PBS) と 0.05% Trypsin / エチレンジアミン四酢酸 (EDTA ; Gibco, Grand IsLand, NY) を用いて行った。

ラビット抗ヒト ID1 抗体、ラビット抗ヒト ID2 抗体、ラビット抗ヒト ID3 抗体、ラビット抗ヒト p21 抗体およびマウス抗ヒト c-myc 抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) より購入した。マウス抗ヒト E-Cadherin 抗体、マウス抗ヒト SNAIL 抗体、マウス抗ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 2 抗体およびマウス抗ヒト MMP9 抗体は、Abcam (Cambridge, UK) より購入した。マウス抗ヒト Vimentin 抗体は、Dako (Glostrup, Denmark) より購入した。マウス抗ヒト N-Cadherin 抗体、マウス抗ヒト serine/threonine kinase 1 (AKT) 抗体、マウス抗ヒト pAKT (Thr 308) 抗体およびマウス抗ヒト pAKT (Ser 473) 抗体は、

BD Biosciences (San Jose, CA) より購入した。マウス抗ヒト Actin 抗体は、EMD Millipore (Billerica, MA) より購入した。ヤギ抗ラビット IgG ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ヤギ抗マウス IgG ホースラディッシュペルオキシダーゼは、Santa Cruz Biotechnology より購入した。

遺伝子導入に用いる Lpofetamine® 2000™ Reagent は、Life Technologies (Carlsbad, CA) より購入し、使用した。pBabe-puro vector は、Cell Biolabs (San Diego, CA) より購入した。CMV-ID2 vector は東京理科大学、原英二博士より供与を受けた [17]。

2. ウェスタンブロッティングによる各種タンパクの発現確認

各種細胞サンプルは Laemmli バッファーに懸濁し、 -70°C に保存し、タンパク抽出を行った。タンパク濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて測定し、総タンパク量を $30\ \mu\text{g}$ に調整した。タンパクは 5~15% グラデIENT sodium dodecyl sulfate (SDS) -ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。電気泳動後、タンパクをポリフッ化ビリニデン膜 (Hybond® P; GE Healthcare, Amersham Buckinghamshare, UK) に転写した。ポリフッ化ビリニデン膜を室温で 1 時間、5% スキムミルクでブロッキングを行った後、0.1% Tween 20 含有トリス緩衝生理食塩水 [TBST (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 3.8 mM HCl, 0.1% Tween 20)]

で洗浄した。その後、一次抗体で室温 1 時間処理した。TBST で洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体を常温 1 時間反応させて、TBST で洗浄した。ECL Plus ウェスタンブロットティング検出システム (GE Healthcare) を用いて発光させ、解析を行った。

3. Ca9-22 及び SAS 細胞への *ID2* 遺伝子の導入

CMV-*ID2* vector からヒト *ID2* の全長 complementary DNA (cDNA) を抽出し、pBabe-puro vector に sense オリエンテーションにて挿入し、pBabe-*ID2S* を作製した [18]。同様にして pBabe-*ID2AS* 作製した。コントロール群として pBabe-puro (CMV empty vector) を pBabe-ctl として使用した。

pBabe-*ID2S* と pBabe-ctl をそれぞれ Lipofectamine® 2000™ Reagent を用いて、Ca9-22 に導入した。

pBabe-*ID2S*、pBabe-*ID2AS* および pBabe-ctl をそれぞれ上述の方法で、SAS に導入した。

細胞のセレクションは、0.6 mg/ml puromycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて行い、Ca9-22-*ID2S*、Ca9-22-ctl、SAS-*ID2S*、SAS-*ID2AS* および SAS-ctl を作製した。遺伝子導入からタンパクの発現確認は、前述のウェスタンブロットティングにて確認した。

4. 細胞増殖の評価

細胞増殖能の評価は、3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT) assay kit (Chemicon International, Temecula, CA) と細胞数の計測より行った。

Ca9-22、Ca9-22-ctl および Ca9-22-ID2S の細胞増殖能の評価は MTT assay kit を用いた。細胞を 3×10^3 個ずつ 96 穴プレート (Thermo Fisher Scientific) に播種し、2 日間培養した。その後、MTT を加えて 37°C で 4 時間培養し、 HCl (4×10^{-2} mol/L) を添加したイソプロパノールを加えて、1 時間後に 570 nm の波長で吸光度を測定した。培地単独の吸光度を除外し、細胞増殖能 (%) = (試験群細胞) / (コントロール群細胞) $\times 100$ として算出した。

SAS、SAS-ctl、SAS-ID2S および SAS-ID2AS の細胞増殖能の評価は、細胞数計測により行った。培養細胞は 37°C で 5 分間、trypsin-EDTA を用いて処理し、8 ml の培地を添加し細胞を回収した。細胞浮遊液から 0.5 ml を平衡電解液 9.5 ml に懸濁した。細胞数を計測し、Multisizer™ 3 system (Beckman Coulter, Brea, CA) を用いて解析した。

5. 細胞浸潤の評価

高い浸潤性や転移性をもつ癌細胞の特徴のひとつとして、細胞外マトリック

スの分解をはじめとし、細胞表面に発現するタンパク質の分解に関わる MMP を分泌することで周囲の微小環境への浸潤を可能にすることが挙げられる。そこで浸潤能は、Boyden chamber 法を用いて比較を行った。24 穴プレート (Collaborative Research, Waltham, MA) に 8 μm のポアサイズを有するフィルターインサート (Collaborative Research) を用い、フィルターは、10~12 μl のマトリゲル (Collaborative Research) でコーティングした。各ウェルのフィルター上側に Ca9-22、Ca9-22-ctl および Ca9-22-ID2S と、SAS-ctl、SAS-ID2S および SAS-ID2AS をそれぞれ 40×10^3 個ずつ、200 μl の無血清培地とともに加え、フィルターの下側には線維芽細胞を培養した馴化培地を 300 μl 加えた。20 時間の培養の後、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、2% 炭酸ナトリウム溶液に溶解した 0.5% トルイジンブルーで染色した。フィルター上方に残留した細胞は、綿棒を用いて除去した。フィルター下面の染色された全細胞数を顕微鏡で観察、計測した。

6. ゼラチナーゼ活性の評価

ゼラチンザイモグラフィ法にてゼラチナーゼ活性の評価を行った。Ca9-22-ctl、Ca9-22-ID2S と、SAS-ctl、SAS-ID2S および SAS-ID2AS の各種細胞をそれぞれ 1×10^6 個ずつ、径 100 mm の培養皿 (CORNING, Corning, NY) に播種し、10 ml

の無血清培地で 2 日間培養した。その後、新たな 10 ml の無血清培地に交換した。48 時間培養後に培地を回収し、10 kDa カットフィルター (EMD Millipore) を用いて 10 倍から 15 倍に濃縮した。濃縮した培地は非還元 Laemmli バッファーに懸濁し、37°C で 15 分間培養した。その後、3 mg/ml のゼラチン (Sigma-Aldrich) を含む 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。泳動後、ゲルは 2.5% Triton X-100 中に常温で 1 時間静置してから、基質緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 15 mM CaCl₂] 中で 24~48 時間静置した。ゲルは 30 分間クマシーブルーで染色し、30% メタノールを溶媒にした 10% 酢酸で脱色した。

7. 免疫沈降法

免疫沈降 (IP) 法にてタンパク複合体の評価を行った。各種細胞をそれぞれ Lysis バッファー (0.5% Nonidet P-40, 50 mM Tris-Cl, 10% glycerol, 0.1 M EDTA, 15 mM NaCl) で溶解し、細胞溶解液として回収した。5 µg の抗ヒト SNAIL 抗体と 2 µg のコントロール抗体を 500 µg の細胞溶解液と懸濁し、4°C で 4 時間作用させた。15 µl のプロテイン A/G プラス-アガロース (Santa Cruz Biotechnology) を加えて懸濁し、再び 4°C で 12 時間攪拌した。アガロースビーズと付着した免疫複合体は、Lysis バッファーで数回十分に洗浄し、ウェスタンブロッティング法で解析した。

8. 統計処理

上述の各検証は3回ずつ行い、スチューデントの t 検定によって統計的有意差の有無を確認した。 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。統計ソフトウェアは SPSS version 22.0 (IBM, Armonk, NY) を用いた。

結果

1. 各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株での ID タンパク発現の比較

ウェスタンブロッティングで各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における ID タンパクの発現を確認した。SAS のみに ID2 のタンパク発現を認めた (図 1)。SAS と HSC-2 に ID1 のタンパク発現を認め、OSC2 と Ca9-22 に若干の ID1 のタンパク発現を認めた (図 1)。以上のスクリーニングの結果から、口腔扁平上皮癌細胞に ID2 の及ぼす影響を明らかにするため、一般に悪性形質の低いとされる Ca9-22 で ID2 強制発現系の検証を、分化度が極めて低く高悪性とされる SAS を用いて ID2 抑制系の検証を行うこととした。

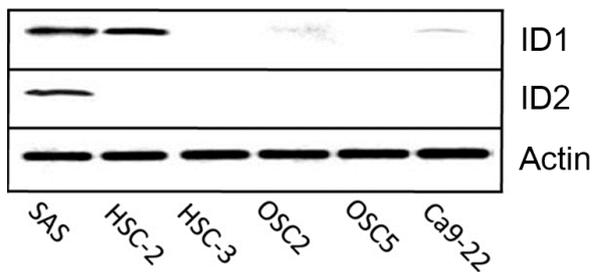


図 1. ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における ID タンパクの発現
ウェスタンブロッティングによる ID1 と ID2 タンパクの発現の比較。

2. Ca9-22 および SAS 細胞への ID2 遺伝子の導入とその影響

ID2 タンパク発現の認められない Ca9-22 細胞を用い、ID2 強制発現細胞を作製した。ID2 の全長 cDNA を sense オリエンテーションで含む pBabe vector とコントロールとして pBabe empty vector をそれぞれ遺伝子導入した。作製した細胞はそれぞれ Ca9-22-ID2S、Ca9-22-ctl とした。細胞から抽出したタンパクのウェスタンブロッティングで、Ca9-22、Ca9-22-ctl と比較して、Ca9-22-ID2S での ID2 タンパクの発現の増強を認め、ID2 が導入されていることが確認できた (図 2A)。

Ca9-22 への ID2 遺伝子の導入前後で ID1 と ID3 の発現に差異はみられなかった (図 2A)。また、培養細胞を位相差顕微鏡で観察すると変化が確認された。Ca9-22 および Ca9-22-ctl は単層で増殖しているのに対し、Ca9-22-ID2S では細胞は重層となって増殖するという増殖形態の変化がみられた (図 2D)。次に、EMT においてその発現抑制が不可欠とされるタンパクである E-Cadherin、発現増強するとされるタンパクである N-Cadherin と Vimentin に関して検証を行ったところ、Ca9-22-ID2S において E-Cadherin の発現の減少、N-Cadherin と Vimentin はともに発現の増強を認めた (図 2B)。サイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21 の発現は抑制され、E-Cadherin のプロモーターへ結合し、その転写を抑制することができる SNAIL は発現の増強を認めた (図 2B)。

次に、ID2 タンパクの発現が唯一認められた SAS 細胞を用いてそのタンパク

発現抑制を試みた。*ID2* の全長 cDNA を sense オリエンテーションで含む pBabe vector および antisense オリエンテーションで含む pBabe vector と、コントロールとして pBabe empty vector をそれぞれ遺伝子導入した。作製した細胞はそれぞれ SAS-*ID2S*、SAS-*ID2AS* および SAS-ctl とした。同様に各細胞から抽出したタンパクのウェスタンブロッティングで、SAS-*ID2S* では SAS-ctl と比較して *ID2* のタンパク発現の増強を認め、*ID2* が導入されていることが確認でき、SAS-*ID2AS* では SAS-ctl と比較して *ID2* のタンパク発現の減少を認め、*ID2* -antisense が導入でき、*ID2* タンパクの発現抑制に成功していることが確認できた (図 2C)。さらに、こちらも細胞を観察すると変化を認めた。SAS-*ID2S* では、細胞は重層となって増殖していた。これに対して SAS-*ID2AS* では、細胞は単層で増殖していた (図 2E)。次に、EMT で発現抑制が必須であるとされるタンパクである E-Cadherin、一般に発現増強されるタンパクである N-Cadherin と Vimentin に関して検証を行ったところ、SAS-*ID2AS* おいて E-Cadherin は発現の増強、N-Cadherin と Vimentin はともに発現の減少を認めた (図 2C)。さらに、SNAIL と c-myc の発現はともに減少し、p21 の発現は増強を認めた (図 2C)。

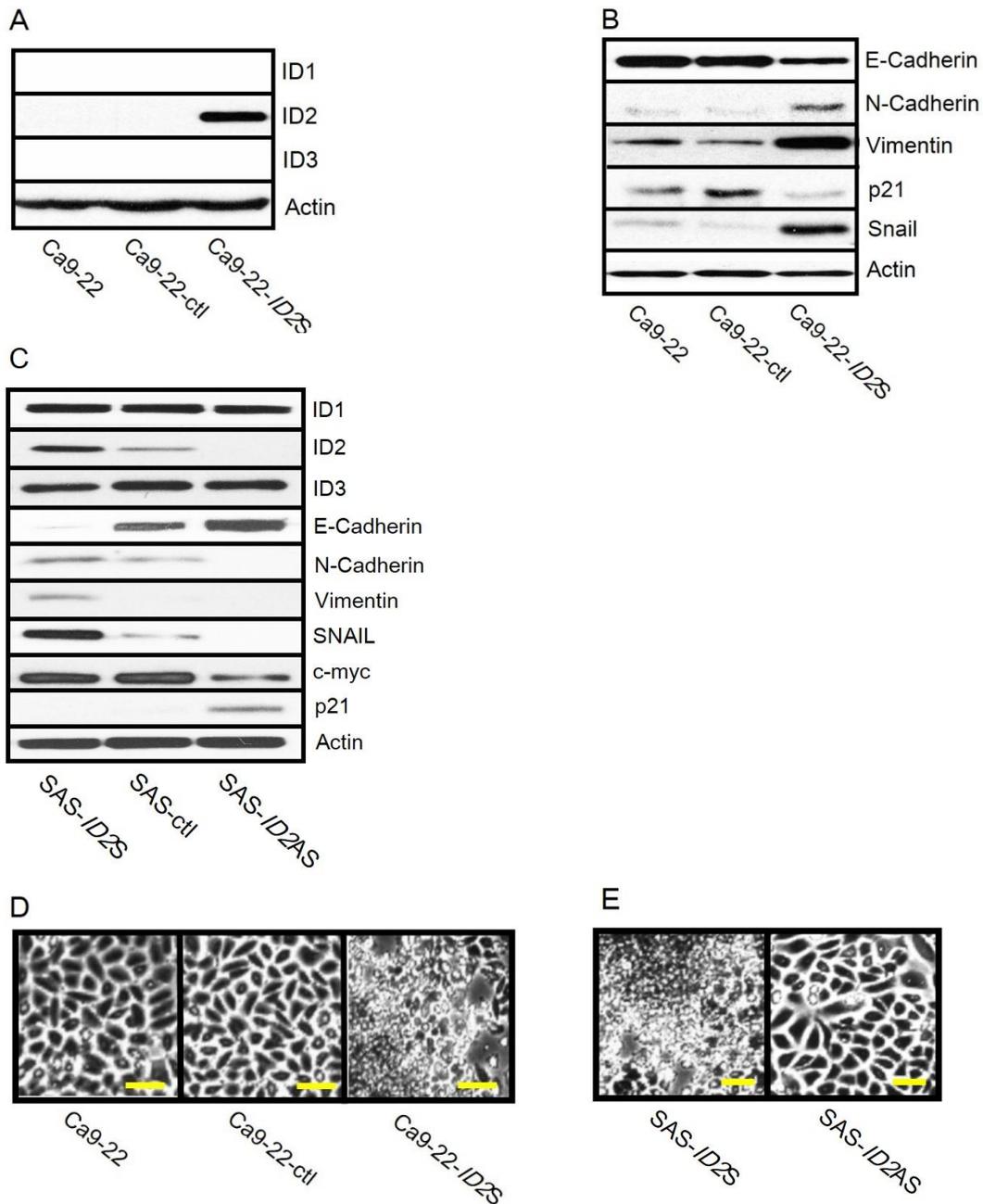


図 2. ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における ID2 が及ぼす影響

A. B. C. ウェスタンブロッティングによる Ca9-22 細胞に *ID2S* 遺伝子導入後の、ID タンパクの発現、E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、p21 および SNAIL のタンパク発現の比較と、SAS 細胞に *ID2S* 遺伝子と *ID2AS* 遺伝子導入後の、ID タンパクの発現、E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、SNAIL、c-myc および p21 のタンパク発現の比較。

D. E. 培養 2 日目の Ca9-22、Ca9-22-ctl および Ca9-22-*ID2S* と、SAS-*ID2S*、SAS-*ID2AS*。倍率 100 倍。スケールバー=150 μ m

3. ID2 が細胞増殖能に及ぼす影響

Ca9-22-ctl と比較して、Ca9-22-*ID2S* は有意に細胞増殖率が高かった ($p < 0.01$; 図 3A)。さらに、*ID2* 遺伝子の導入によって、AKT の特定部位のリン酸化も認められた。ウェスタンブロッティングで示すように、リン酸化 AKT (Thr308、Ser473) は Ca9-22-*ID2S* で増加を認めた (図 3B)。

また、細胞増殖率を SAS、SAS-ctl、SAS-*ID2S* および SAS-*ID2AS* 間で比較したところ、SAS-*ID2S* が SAS-*ID2AS* と比較して細胞増殖率が有意に高かった ($p < 0.01$; 図 3C)。

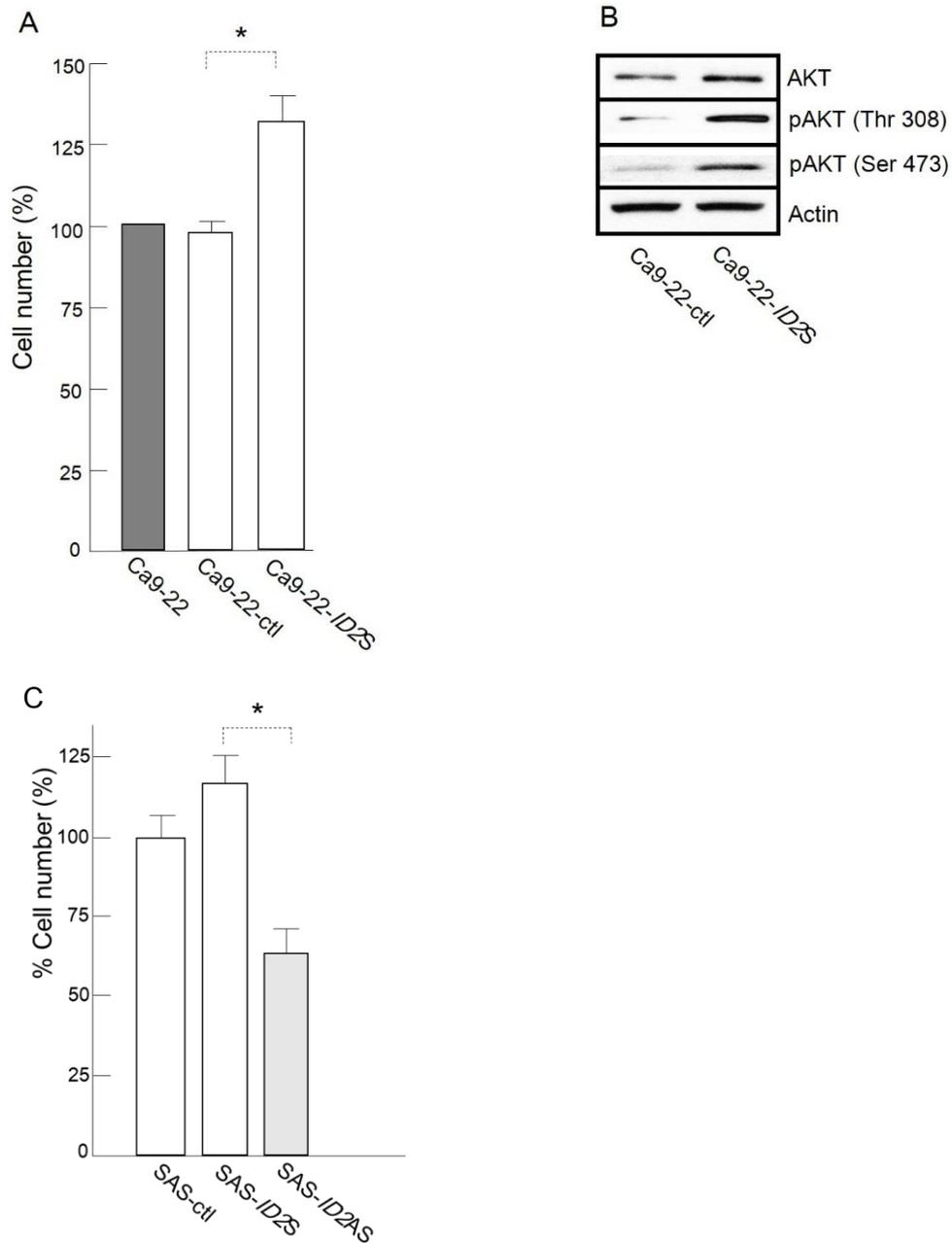


図 3. ID2 発現が細胞増殖と細胞周期に及ぼす影響

- A. MTT アッセイによる Ca9-22-ctl と Ca9-22-ID2S の細胞増殖能の比較 ($p < 0.01$)。バーは標準偏差を示す。
- B. ウェスタンブロッティングによる Ca9-22-ctl および Ca9-22-ID2S の AKT とリン酸化 AKT (Thr308、Ser473) の発現の比較。
- C. 細胞計測による SAS-ctl、SAS-ID2S および SAS-ID2AS の細胞増殖率の比較 ($p < 0.01$)。バーは標準偏差を示す。

4. ID2 が浸潤能および MMP の分泌に及ぼす影響

Boyden chamber 法を用いて浸潤能の比較を行った。ID2 強制発現系の検討において Ca9-22-ID2S は、Ca9-22-ctl と比較して有意に浸潤能が高かった ($p < 0.01$; 図 4A)。加えて、Ca9-22-ID2S においてゼラチンザイモグラフィやウエスタンブロッティングで、MMP2 と MMP9 のゼラチナーゼ活性が亢進し、タンパク発現が増強していた、しかし Ca9-22-ctl ではそれらの MMPs の発現は確認されなかった (図 5A)。

一方、抑制系の検討では、SAS-ctl と比較して SAS-ID2AS では、浸潤能が有意に抑制されていた ($p < 0.01$; 図 4B)。しかし、SAS-ctl と SAS-ID2S では同等な浸潤能を示し、ID2 の発現による細胞浸潤能への影響に有意な差はみられなかった。さらに、ゼラチナーゼでは MMP9 の発現量においてのみ変化が見られ、SAS-ctl と SAS-ID2S では同等であったが、SAS-ID2AS では MMP9 の発現は確認されなかった (図 5B)。MMP2 の発現はいずれの細胞においても認められなかった。このことから、SAS-ID2AS では浸潤能が抑制されていることが明らかになった。

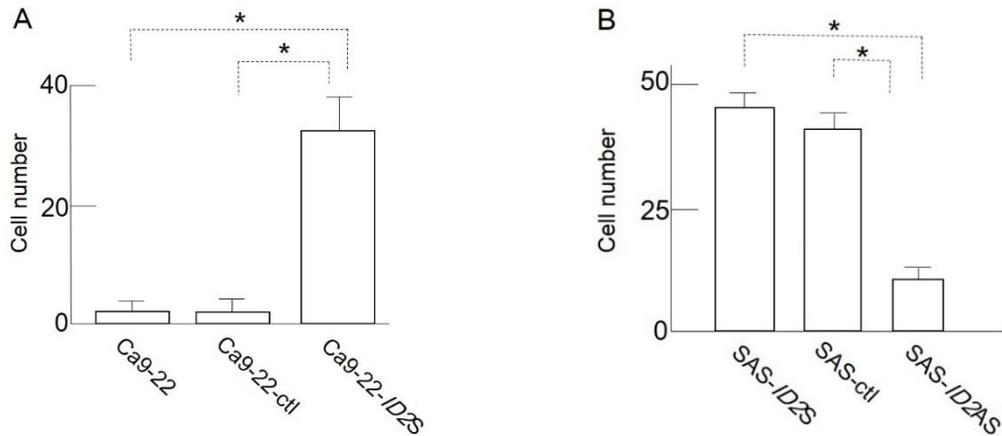


図 4. ID2 が細胞浸潤能に及ぼす影響

A. B. Boyden chamber 法による Ca9-22、Ca9-22-ctl および Ca9-22-ID2S と SAS-ID2S、SAS-ctl および SAS-ID2AS のゼラチン層からフィルターインサート下面まで浸潤した細胞数の比較 ($p < 0.01$)。バーは標準偏差を示す。

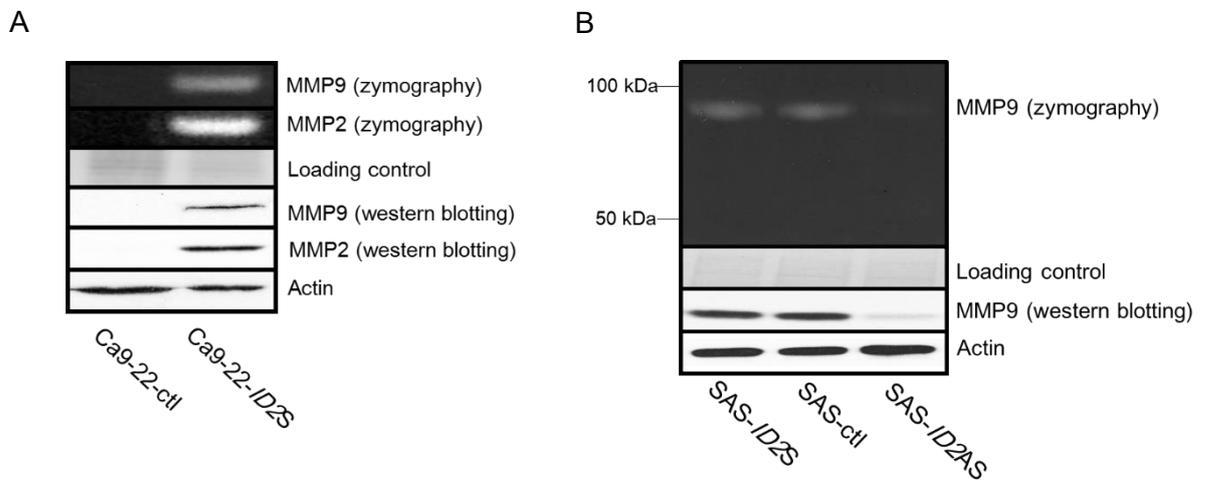


図 5. ID2 が MMP の分泌、活性に及ぼす影響

A. ゼラチンザイモグラフィーによる Ca9-22 と Ca9-22-ID2S における MMP2、MMP9 の分泌と、ウェスタンブロッティングによる、MMP2、MMP9 タンパク発現の比較。
 B. ゼラチンザイモグラフィーによる SAS-ID2S、SAS-ctl、SAS-ID2AS における MMP9 の分泌と、ウェスタンブロッティングによる MMP9 の発現の比較。

5. ID2 と SNAIL の直接結合

免疫沈降法を用いて、ID2 と EMT 制御因子である SNAIL との相互作用を検証した。

ID2 強制発現系の検討では Ca9-22-ctl および Ca9-22-ID2S を抗 ID2 抗体および抗 SNAIL 抗体を用いて確認すると、ID2 を強制発現させた Ca9-22-ID2S 細胞において ID2 と SNAIL の直接結合が確認された (図 6A)。

一方、ID2 抑制系の検討では SAS-ID2AS 細胞において ID2-SNAIL 複合体は認められなかったが、SAS-ctl および SAS-ID2S で直接結合が確認された (図 6B)。

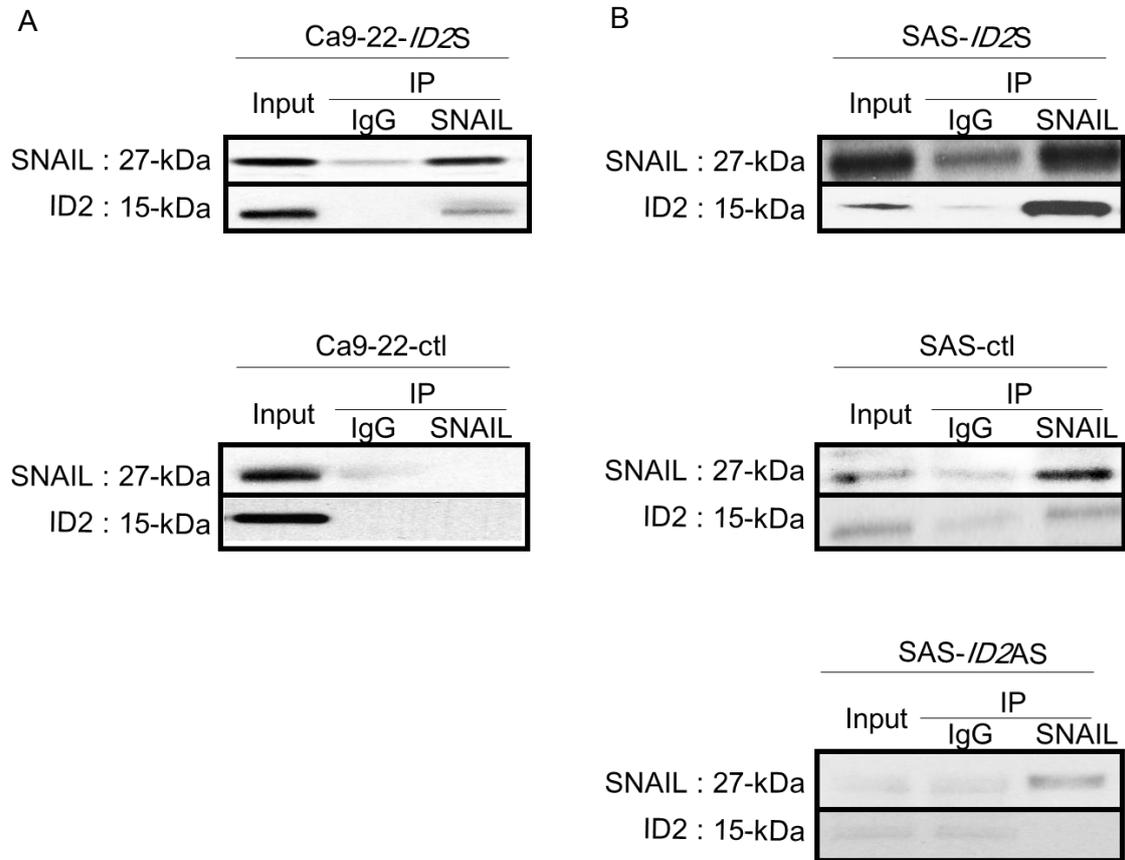


図 6. SNAIL と ID2 の相互的作用

A. B. Ca9-22-ctl、Ca9-22-*ID2S* および SAS-ctl、SAS-*ID2S*、SAS-*ID2AS* を抗 SNAIL 抗体とコントロール抗体を用いて免疫沈降し、ウェスタンブロッティングによる ID2-SNAIL 複合体形成の比較。

考察

今回、ID2 タンパクが扁平上皮癌細胞の悪性形質に与える影響を、各種培養細胞のスクリーニングを経た後、強制発現系、抑制系に適した細胞株を選定し、その変化を調べたので結果から考察を加えたい。

強制発現系においては、ID2 タンパクの発現を認めない口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 を用いたところ、結果は細胞の悪性形質が促進されるものとなった。ID2 を過剰発現させた Ca9-22-ID2S 細胞での細胞増殖能亢進には、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 の発現減少も伴っており、これが Cell Cycle の抑制解除に影響することが推察された。唾液腺癌細胞においては、過去の報告から ID2 と p21 の関連は示唆されていないが、ID1 と p21 の関連を認めると報告されている [19]。少なくとも唾液腺癌細胞と扁平上皮癌細胞では ID タンパクのサブタイプにより役割が異なることが推察された。一方、抑制系の実験では SAS-ID2AS 細胞では他の細胞に比較し、有意に抑制されていた。こちらは逆に p21 の発現増強に加え、Cell Cycle の進行に影響する c-myc の発現減少も認めた。本研究の結果から詳細なメカニズムを述べるには不十分ではあるが、転写因子 Sp1 を介した p21 の制御はよく知られており [20]、ID1 と Sp1 の密接な関係も報告されているため [21]、ID2 とも Sp1 を介した何らかのクロストークが存在するとも考えられ、今後解析していくべき課題である。また、引き続き行った AKT と pAKT

の発現様式の確認にて、AKT のリン酸化を認めたことから、リン酸化 AKT が直接的に p21 を抑制するため、こちらは経路の 1 つとなることが示された。また、ID2 は Rb タンパクに直接結合することも知られている [2, 22]。癌抑制遺伝子として知られる Rb タンパクは S 期への細胞周期の進行を抑制している。ID2 がこれを抑制することも胞周期が進行した結果として、細胞増殖が亢進したと考えられた。

強制発現系と抑制系の実験系から、細胞の形態においても明確な差異を認め、ID2 が細胞形態にも影響を与えることが明らかになった。Ca9-22-ID2S 細胞は非常に無秩序で重層化した増殖形態を認め、Ca9-22-ctl での細胞の増殖形態は扁平で、単層増殖であった。逆に抑制系の実験において ID2 タンパク発現を抑制した SAS-ID2AS 細胞では、細胞形態は単層で扁平化し、同時に作製した ID2 強発現細胞である SAS-ID2S 細胞では非常に無秩序で重層化した増殖形態を示した。この結果は非常に理解しやすく、ID2 は細胞の増殖形態にも影響をおよぼした。

一方、悪性形質に大きく関わる EMT に関する結果であるが、本実験系から明らかになったことから考察を述べたい。Ca9-22 および Ca9-22-ctl、Ca9-22-ID2S におけるタンパク発現の検証では、ID2 タンパクを発現させた Ca9-22-ID2S 細胞での E-Cadherin の発現の減少と、N-Cadherin、Vimentin の発現の増強を認めた。E-Cadherin の発現減少は細胞接着機能の喪失という EMT に必須の現象であり、

また、間葉系細胞で高発現する制御因子である N-Cadherin、Vimentin の発現増強も EMT をさらに裏付ける結果と言える。さらに、E-Cadherin との直接作用が知られる上流の転写因子 SNAIL の発現の増強は EMT 促進を端的に示している。

対して、SAS-ctl および SAS-ID2S、SAS-ID2AS におけるタンパク発現の検証では、ID2 のタンパク発現を抑制した SAS-ID2AS 細胞での E-Cadherin の発現の増強と、N-Cadherin、Vimentin の発現の減少を認め、SNAIL の発現減少を認めた。強制発現系とは全く逆の現象が確認されたことは reverse EMT が起こっていることを意味する。ID2 を標的とすることで、E-Cadherin の発現が変動し、上流のジンクフィンガー型転写因子である SNAIL とも連動していたことから、後で述べる ID2 と SNAIL の免疫沈降による相互作用の解析に繋がった。

浸潤能の解析でも ID2 が悪性形質を促進する結果が得られた。Ca9-22-ID2S 細胞の浸潤能は Ca9-22-ctl と比較して極めて高度な亢進を認めた。Ca9-22-ctl では、MMP2 と MMP9 の発現を認められなかったが、Ca9-22-ID2S では MMP2 と MMP9 の発現の増強と、活性亢進が認められた。一方、抑制系実験では SAS-ID2AS 細胞の浸潤能は、SAS-ctl および SAS-ID2S と比較して著しく減少していた。また、SAS-ID2S と SAS-ctl においては MMP9 の発現および活性を認めたが、SAS-ID2AS では MMP9 の発現を認めなかった。今回は MMP2、MMP9 のゼラチナーゼ活性や発現しか調べていないが、他の MMP の役割は付加されるとしてもこの 2 つ

の MMP が浸潤能促進に大きな影響を与えていることは間違いないと考えられる。

他の癌腫の報告に目を向けると、肝細胞癌において、E-Cadherin の発現減少と、ID2、MMP9 の発現増強は予後不良因子であるとされており [23]、大腸癌細胞では SNAIL の活性化により E-Cadherin の発現が抑制されると、MMP の活性化が誘発されると報告されている [24]。E-Cadherin の発現増強と Vimentin の発現減少が、頭頸部癌細胞に上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬であるラパチニブやゲフィチニブを作用させると誘発されるとも報告されている [25]。本研究で得られた癌進展に関与する基本的なメカニズムの一つとして考えられている EMT のマーカーである E-Cadherin および N-Cadherin、Vimentin、SNAIL の発現の変化はこれらの報告と合致し、ID2 タンパクの強制発現により EMT が、ID2 タンパクの抑制により reverse EMT が起こっていることが示唆された。ID2 が中心となって悪性形質の獲得、特に EMT 現象に密接に関連していることが考えられた。

そこで、本研究では、最後の解析として免疫沈降法で ID2 と EMT を誘導する SNAIL の作用を明らかにすることとした。結果、ID2 発現は SNAIL と密接に関係し、これら 2 つの分子は複合体を形成することが明らかになった。これらのことから ID2-SNAIL axis がヒト口腔扁平上皮癌細胞の悪性形質、特に浸潤能に

において促進し、EMT も促進していると考えられた。ただ、分化抑制因子と考えられる ID2 が SNAIL と複合体を形成し、EMT を引き起こすには SNAIL の E-Cadherin プロモーターへの結合促進が必要である。つまり、ID2 が SNAIL の転写活性を促進すると単純に考えてしまいがちだが、本来は bHLH の転写抑制に働くことからこのメカニズムを推測することは単純ではない。

しかし、近年ではわずかではあるものの ID2 と EMT の関係性を示唆する報告も散見されており [14]、ID2 と SNAIL の直接的な作用についても言及されている。このことから ID2-SNAIL axis が少なくとも何らかの形で悪性形質獲得に関与していることは間違いないと言える。今後はさらにこの複合体に他のタンパクが作用するかなどさらなる検証が必要である。本研究の結果からは、ID2 は口腔扁平上皮癌細胞において、他のサブタイプである ID1、ID3 の発現とは独立して作用していたことから、ID ファミリータンパクの中でも ID2 に着目して ID2-SNAIL axis のさらなる解明が悪性形質獲得のメカニズム解明に有用であることが示唆された。

結語

本研究では、ID2 強制発現系と ID2 抑制系の実験結果から、ID2 が口腔扁平上皮癌の悪性形質を促進することが明らかになった。さらに、ID2 は bHLH を阻害するだけでなく、SNAIL とも直接結合することで複合体を形成し、口腔扁平上皮癌の悪性形質と癌浸潤の基本的プロセスのひとつである EMT に影響を与えていることが示唆された。

以上より、ID2 を標的とした新たな治療法が口腔扁平上皮癌において有効となる可能性を示した。

謝辞

本研究をさせていただく機会を与えてくださり、更に稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました森 悦秀教授に謝意を表します。また、本研究の課題を与え、実験方法や指針など真摯に御指導いただきました住田 知樹先生に深謝致します。本研究を遂行するにあたり、実験手技の御指導、御助言を頂きました、小林 洋輔先生、愛媛大学大学院 医学系研究科 口腔顎顔面外科学分野 石川 詔子先生に深く感謝いたします。また、様々な御助言や励ましのお言葉を頂きました口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野の教官各位、研究室の皆様、研 究生活を支えてくださった全ての皆様方に、心から深謝いたします。

引用文献

- [1] F. Ling, B. Kang, X.H. Sun, Id proteins: small molecules, mighty regulators, *Curr. Top. Dev. Biol.* 110 (2014) 189-216.
- [2] R. Benezra, R.L. Davis, D. Lockshon, D.L. Turner, H. Weintraub, The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins, *Cell* 61 (1990) 49-59.
- [3] J.D. Norton, R.W. Deed, G. Craggs, F. Sablitzky, Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation, *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 58-65.
- [4] J.D. Norton, ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 3897-3905.
- [5] V. Riechmann, I. van Cruchten, F. Sablitzky, The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 749-755.
- [6] V. Riechmann, F. Sablitzky, Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system, *Cell Growth Diff.* 6 (1995)

837-843.

- [7] R. Murase, T. Sumida, S.H. Liu, T. Yoshimura, A. Ishikawa, F.C. Wei, T. Tano, H. Hamakawa, The expression and roles of Id1 and Id2 in the aggressive phenotype of human oral squamous cell carcinoma cells, *J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol.* 25 (2013) 12-17.
- [8] X.H. Sun, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, D. Baltimore, Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins, *Mol. Cell Biol.* 11 (1991) 5603-5611.
- [9] J. Biggs, E.V. Murphy, M.A. Israel, A human Id-like helix-loop-helix protein expressed during early development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 1512-1516.
- [10] X.H. Sun, Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development, *Cell* 79 (1994) 893-900.
- [11] I.N. Melnikova, M. Bounpheng, G.C. Schatteman, D. Gilliam, B.A. Christy, Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells, *Exp. Cell Res.* 247 (1999) 94-104.

- [12] M.A. Morrow, E.W. Mayer, C.A. Perez, M. Adlam, G. Siu, Overexpression of the helix-loop-helix protein Id2 blocks T cell development at multiple stages, *Mol. Immunol.* 36 (1999) 491-503.
- [13] J.P. Coppe, Y. Itahana, D.H. Moore, J.L. Bennington, P.Y. Desprez, Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 2044-2051.
- [14] J.P. Zhou, Z.L. Gao, M.L. Zhou, M.Y. He, X.H. Xu, D.T. Tao, C.C. Yang, L.K. Liu, Snail interacts with Id2 in the regulation of TNF- α -induced cancer cell invasion and migration in OSCC, *Am. J. Cancer Res.* 5 (2015) 1680-1691.
- [15] M. Nishimine, M. Nakamura, K. Mishima, M. Kishi, T. Kirita, M. Sugimura, N. Konishi, Id proteins are overexpressed in human oral squamous cell carcinomas, *J. Oral Pathol. Med.* 32 (2003) 350-357.
- [16] T. Osaki, Y. Tatemoto, K. Yoneda, T. Yamamoto, Tumorigenicity of cell lines established from oral squamous cell carcinoma and its metastatic lymph nodes, *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.* 30 (1994) 296-301.
- [17] E. Hara, T. Yamaguchi, H. Nojima, T. Ide, J. Campisi, H. Okayama, K. Oda, Id-

related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2139-2145.

[18] S. Parrinello, C.Q. Lin, K. Murata, Y. Itahana, J. Singh, A. Krtolica, J. Campisi, P.Y. Desprez, Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39213–39219.

[19] T. Sumida, R. Murase, A. Onishi-Ishikawa, S.D. McAllister, H. Hamakawa, P.Y. Desprez, Targeting Id1 reduces proliferation and invasion in aggressive human salivary gland cancer cells, *BMC Cancer* 13 (2013) 141-148.

[20] H.S. Kim, J.I. Heo, S.H. Park, J.Y. Shin, H.J. Kang, M.J. Kim, S.C. Kim, J. Kim, J.B. Park, J.Y. Lee, Transcriptional activation of p21(WAF¹/CIP¹) is mediated by increased DNA binding activity and increased interaction between p53 and Sp1 via phosphorylation during replicative senescence of human embryonic fibroblasts, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 2397-2408.

[21] T. Takeda, M. Sakata, A. Isobe, T. Yamamoto, F. Nishimoto, R. Minekawa, M. Hayashi, Y. Okamoto, P.Y. Desprez, K. Tasaka, Y. Murata, Involvement of Sp-1 in the regulation of the Id-1 gene during trophoblast cell differentiation, *Placenta* 28

(2007) 192-198.

[22] A. Iavarone, A. Garg, A. Lasorella, J. Hsu, M. Israel, The helix-loop-helix protein Id2 enhances cell proliferation and binds to retinoblastoma protein, *Genes Dev.* 8

(1994) 270–284.

[23] J. Kim, S.J. Hong, J.Y. Park, J.H. Park, Y.S. Yu, S.Y. Park, E.K. Lim, K.Y. Choi, E.K.

Lee, S.S. Paik, K.G. Lee, H.J. Wang, I.G. Do, J.W. Joh, D.S. Kim, Korea Cancer Biomarker Consortium, Epithelial-mesenchymal transition gene signature to predict clinical outcome of hepatocellular carcinoma, *Cancer Sci.* 101 (2010) 1521-1528.

[24] A. Villarejo, A. Cortés-Cabrera, P. Molina-Ortíz, F. Portillo, A. Cano, Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to

mesenchymal transition, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 930-941.

[25] C. Umbreit, P. Erben, A. Faber, R.D. Hofheinz, C. Aderhold, C. Weiss, K. Hoermann,

A. Wenzel, J.D. Schultz, MMP9, Cyclin D1 and β -Catenin are useful markers of p16-positive squamous cell carcinoma in therapeutic EGFR inhibition in vitro, *Anticancer*

Res. 35 (2015) 3801-3810.