扁平上皮癌の高度浸潤能獲得過程における Snail の発現とその作用

横 山 和 博 鎌 田 伸 之 長 山 勝

要旨: 細胞間接着分子の消失と細胞外基質の分解は癌細胞の浸潤・転移に必須である。E-カドヘリンはカルシウム依存性の細胞間接着因子であるが浸潤型扁平上皮癌ではその発現の低下が報告されている。最近、転写因子である Snail が E-カドヘリンの転写抑制因子として同定された。われわれは E-カドヘリンを不均一に発現している HOC719 細胞を見出し、これより E-カドヘリン陽性細胞 (HOC719-PE) と陰性細胞 (HOC719-NE) を分離・樹立した。HOC719-PE 細胞は上皮細胞様形態を呈し、一方 HOC719-NE 細胞は線維芽細胞様形態を呈していた。さらに、HOC719-PE 細胞に比べて、HOC719-NE 細胞は高い浸潤能を有し MMP-2 と Snail の発現が高かった。次に Snail 発現ベクターを E-カドヘリン陽性細胞にトランスフェクションしてその影響を検討した。A431 細胞と HOC719-PE 細胞における E-カドヘリンプロモーターの転写活性は Snail トランスフェクションにより低下した。Snail 安定発現 A431 細胞は上皮細胞様形態から線維芽細胞様形態に変化し、その浸潤能が上昇した。RT-PCR による検討の結果、これらの細胞における E-カドヘリンの発現は低下し、MMP-2 の発現は上昇した。さらにルシフェラーゼアッセイの結果、A431 細胞と HOC719-PE 細胞における MMP-2 プロモーターの転写活性は Snail により上昇することが示された。

以上の結果から、Snail は細胞形態を変化させ E-カドヘリンと MMP-2 の発現を調節することによって、癌細胞の高度浸潤能獲得過程に関与することが示唆された。

キーワード: E-カドヘリン, Snail, 扁平上皮癌

緒 言

扁平上皮癌は頭頸部領域における悪性腫瘍の大部分を占め、浸潤・転移はその予後を大きく左右する。浸潤・転移の過程には細胞接着能の低下、細胞運動能の亢進、細胞外基質の分解等の変化が重要であると考えられている。カドヘリンはカルシウムイオン依存性の細胞間接着分子で、このうち E-カドヘリンは主として上皮系の細胞に発現しているが、その発現低下は扁平上皮癌をはじめとして種々の癌で報告されている。例えば、Schipper らは頭頸部の扁平上皮癌において E-カドヘリンの発現と腫瘍の分化度やリンパ節転移との間に重要な相関性があることを述べている¹⁾。この発現低下機構としては上流に存在するプロモーター領域の G (グアニン) C (シトシン) を多く含む領域における DNA のメチル化が知られているが^{2,3)}、その一方で、プロモーター領域に存在する CANNTG で表わされる E-box 配列が E-カドヘリンの発現を負に制御することも報告されている⁴⁾。最近、Batlle ら⁵⁾および Cano ら⁶⁾は E-box に結合する蛋白として Snail を同定し、E-カドヘリンの転写抑制因子として作用することを報告した。Snail

は上皮-間葉系移行に関与する転写抑制因子であるが、癌細胞の浸潤能に関する報告は少なく、ヒト扁平上皮癌において Snail の発現と作用を検討したものは少ない。そこで今回われわれは、口腔扁平上皮癌細胞における Snail の発現とその作用について検討したので報告する。

実験材料および実験方法

1. 細胞および培養法

本研究では扁平上皮癌細胞株 A431 細胞⁷⁾と HOC719 細胞⁸⁾を用いた。これらの細胞は 10% FBS (SIGMA, St. Louis, MO, USA), 100 μ g/ml ストレプトマイシン, 100 U/ml ペニシリン (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA) を含む DMEM (SIGMA) を使い、5% CO₂ の存在下、37℃ で培養した。

2. 浸潤能の検討

インベージョンアッセイは Lisa らの方法に準じて行った⁹⁾。0.1% BSA (SIGMA) を含む DMEM に細胞を懸濁し、マトリゲルで表面処理したバイオコートセルウェア (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) のメンブレン上に細胞を 2×10^5 個ずつ播種した。メンブレン下のウェルには DMEM 中で 24 時間培養して得られた正常線維芽細胞の培養上清を 600 μ l 添加した。24 時間培養

表 1 プライマーの塩基配列および PCR の条件

target mRNA	sequence of primers	product size	annealing temperature
E-cadherin	f: 5'-AGCCATGGGCCCCTTGGAG-3' f: 5'-CCAGAGGCTCTGTACCTTC-3'	653 bp	60℃
Snail	f: 5'-CTCCTCTACTTCAGCCTCTT-3' r: 5'-CTTCATCAAAGTCCTGTGGG-3'	611 bp	53℃
MMP-2	f: 5'-AAGGCCAAGTGGTCCGTGTGAA-3' r: 5'-AACAGTGGACATGGCGGTCTCAG-3'	371 bp	55℃
G3PDH	f: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' r: 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	451 bp	52℃

した後、メンブレン上面の細胞を綿棒で拭い取り、10%グルタルアルデヒドを含む PBS で固定後、メンブレン下に浸潤した細胞をギムザ染色 (和光純薬, 大阪) し、顕微鏡下で浸潤細胞数を測定した。

3. 免疫組織化学的検討

培養細胞における E-カドヘリンの発現は免疫組織化学的に検討した。検出は ABC 法により、Vectastain ABC Kit (Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用いた。細胞を Lab TeK Chamber Slide (Nunc, Roskilde, Denmark) でほぼコンフルエントになるまで培養し、3.5% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定後、3.0% 正常馬血清でブロッキングした。一次抗体として、500 倍に希釈した抗ヒト E-カドヘリンモノクローナル抗体 (HECD1: 宝酒造, 東京) を室温で 2 時間反応させた後、0.3% H₂O₂/メタノール溶液で 30 分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。さらに、ビオチン化抗マウス IgG 抗体を 45 分間反応させた後 ABC 試薬を 2 時間反応させた。0.2mg/ml に希釈した DAB を含む 50mM Tris-HCl (pH 7.6) を 10 分間反応させ発色させた。対比染色として 0.2% メチルグリーンを用い、約 10 分間染色した。

4. total RNA の抽出および Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法

セミコンフルエントに達した細胞を PBS で洗浄後、TRIzol (GIBCO BRL) で溶解し、クロロホルムを加えて遠心により蛋白除去を行った。上清よりエタノール沈殿にて RNA を回収し、DEPC 処理水に溶解した。1μg の RNA を室温で 15 分間 DNase I (GIBCO BRL) 処理した後、25mM EDTA を添加し、65℃ 10 分間処理による DNase I の失活を行った。ついで、ランダムヘキサマープライマー (GIBCO BRL) を加え、70℃ 10 分間処理した後、逆転写酵素 SuperScript II (GIBCO BRL) を用いて 25℃ 5 分間、42℃ 50 分間、70℃ 15 分間の条件で逆転写反応を行った。さらに 37℃、20 分間 RNase H (GIBCO BRL) 処理したのち、サーマルサイクラー (宝酒造) を用いて PCR 反応を行った。PCR は 94℃ で 5 分 DNA を

変性させた後、94℃ で 60 秒、表 1 に示すアニーリング温度で 60 秒、72℃ で 90 秒を 22~35 サイクル、最後に 72℃ 10 分の条件で DNA 断片の増幅を行った。PCR 産物は臭化エチジウム (Sigma) を含む 1.8% アガロースゲルにて電気泳動を行った。本研究で用いたプライマーと PCR の条件を表 1 に示した。

5. トランスフェクション法 (Snail 発現クローンの樹立)

Snail トランスフェクションには、Henreros らより供与されたマウス Snail cDNA の C 末端に HA タグを付与した pcDNA3-mm snail-HA を用いた⁵⁾。セミコンフルエントの A431 細胞にコントロールベクター (pcDNA3) あるいは pcDNA3-mm snail-HA を Tfx-20 (Promega, Madison, WI, USA) を用いてトランスフェクションし、600 μg/ml G418 (SIGMA) 存在下で約 2 週間培養した。G418 耐性クローンをクローニングリング (IWAKI, 東京) を用いて分離し、pcDNA3 をトランスフェクションしたコントロール細胞 A431 pcD クローンと pcDNA3-mm snail-HA をトランスフェクションしたマウス Snail 発現細胞 A431SNA クローンを安定発現株として得た。

6. 転写活性の側定

A431 細胞から抽出した DNA を鋳型としてプライマー (forward: 5'-aactgacttcgcgaagcttacagatgcttt-3', reverse: 5'-aattaggtgctagctcagtggtcatgg-3') によって E-カドヘリンの転写開始点より -674bp~+48bp までのプロモーター領域を、またプライマー (forward: 5'-tggcacgcgtgggtgcttccttaacatgctaatg-3', reverse: 5'-caacctcgagccaccgctgaggaagtctg-3') によって MMP-2 の転写開始点より -940bp~+22bp までのプロモーター領域を増幅しこれらを pCR II ベクター (Invitrogen) にクローニングし、シーケンスを確認した。E-カドヘリンのプロモーター配列を制限酵素 Nhe I と Hind III で切り出し、同じ制限酵素で処理した pGL II Basic ベクター (Promega) に挿入し pGL-Ecad-prom を作製した。また、MMP-2 のプロモーター配列を制限酵素 Mlu I と Xho I で切り出し、同じ制限酵素

で処理した pGL II Basic ベクターに挿入し pGL-MP2-prom を得た。転写活性の測定には Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を使用した。60mm の培養ディッシュ上でセミコンフルエントの A431 細胞に $1\mu\text{g}$ の Snail 発現ベクターあるいは pcDNA3 と $1\mu\text{g}$ の pGL-Ecad-prom あるいは pGL-MP2-prom, さらに内部コントロールとして 0.5ng のウミシタケルシフェラーゼレポーターベクター (pRL-CMV: Promega) を Tfx-20 を用いてトランスフェクションした。48 時間培養後, 細胞を PBS で 2 回洗浄し, $400\mu\text{l}$ の Passive Lysis Buffer (Promega) で細胞を溶解した。 $100\mu\text{l}$ の Luciferase Assay Buffer (Promega) に $20\mu\text{l}$ の cell lysate を添加し, 1254 ルミノイルミネレーター (Labsystems, Helsinki, Finland) にて発光度を測定した。さらに $100\mu\text{l}$ の Stop & Glo solution (Promega) を添加し, 内部コントロールの発光度を測定した。転写活性は内部コントロールに対する比で判定した。

7. 統計処理

実験結果は平均値±標準偏差で表わし, Student-t 検定にて有意差検定を行った。

結 果

1. 同一細胞株から樹立した E-カドヘリン陽性細胞と E-カドヘリン陰性細胞とその性状

口腔扁平上皮癌細胞株 HOC719 を E-カドヘリンモノクローナル抗体 HECD-1 を用いて免疫染色を行った結果, E-カドヘリンを発現している細胞と発現していない細胞が混在している像を示した。これらの細胞を限界希釈法とクローニングリングを用いて分離し, 細胞膜に E-カドヘリンを発現している HOC719-PE 細胞とその発現が低下している HOC719-NE 細胞を得た (図 1A)。HOC719-PE 細胞は上皮細胞様形態を示し, 一方 HOC719-NE 細胞は線維芽細胞様形態を示した (図 1B)。インベージョンアッセイによってこれらの細胞の浸潤能を比較検討した結果, HOC719-PE 細胞の浸潤数: $2.1 (\pm 0.5)$ に対して, HOC719-NE 細胞の浸潤細胞数は $26.8 (\pm 13.4)$ で有意に高かった (図 1C)。

2. E-カドヘリン陽性細胞と E-カドヘリン陰性細胞における MMP-2 と Snail の発現

これらの細胞における E-カドヘリン, Snail および MMP-2 の発現を RT-PCR によって比較した (図 2)。陽性コントロールである A431 細胞と同様に HOC719-PE 細胞においては E-カドヘリンの発現が認められたが, HOC719-NE 細胞ではその発現が認められなかった。MMP-2 の発現は HOC719-NE 細胞で強くみられたが, A431 細胞と HOC719-PE 細胞では低下していた。さらに,

E-カドヘリンの転写抑制因子である Snail の発現は HOC719-NE 細胞で強くみられたが, A431 細胞と HOC719-PE 細胞ではその発現が低下していた。

3. E-カドヘリン陽性細胞の性状に与える Snail の影響

HOC719-PE, NE 細胞間におけるこれらの差異が Snail に依存しているかを調べる目的で, E-カドヘリン陽性細胞である A431 細胞と HOC719-PE 細胞を用いて E-カドヘリンの転写活性に対する Snail の影響を検討した。Snail 発現ベクターあるいはコントロールベクターとともに, E-カドヘリンの転写開始点より, $-674\text{bp} \sim +48\text{bp}$ までのプロモーター領域を含む pGL-Ecad-prom レポーターベクターを細胞にトランスフェクションし, デュアルルシフェラーゼアッセイを行った結果, Snail により A431 細胞で 65.5% , HOC719-PE 細胞で 53.4% に E-カドヘリンの転写活性が低下した (図 3A)。さらに, A431 細胞に Snail をトランスフェクションして安定発現細胞を分離しその影響を検討した。コントロール細胞である A431 pcD1 細胞は上皮細胞様形態のままであったが, Snail を過剰発現させた A431 SNA1 細胞は線維芽細胞様形態を示した (図 3B)。インベージョンアッセイでは A431 pcD1 細胞の浸潤数は $15.5 (\pm 4.7)$ であるのに対し, A431 SNA1 細胞では $30.0 (\pm 4.4)$ であり, 浸潤数が有意に増加した (図 3C)。

次にこれらの細胞における E-カドヘリン, MMP-2 mRNA の発現を検討したところ, Snail の過剰発現によって E-カドヘリンの発現は低下し, MMP-2 の発現は上昇した (図 4A)。

A431 細胞と HOC719-PE 細胞における MMP-2 の転写活性に対する Snail の影響を検討した。MMP-2 の転写開始点より, $-940\text{bp} \sim +22\text{bp}$ までのプロモーター領域を含む pGL-MP2-prom レポーターベクターを用いたデュアルルシフェラーゼアッセイでは, Snail により A431 細胞で 152.4% , HOC719-PE 細胞で 121.7% に MMP-2 の転写活性が上昇した (図 4B)。

考 察

様々な癌細胞において E-カドヘリンの発現の低下が示されているが, Frixen らはその発現が極端に低下している癌細胞は線維芽細胞様形態を示す傾向にあり, さらに高い浸潤能を有していると報告している¹⁰⁾。当教室で樹立した口腔扁平上皮癌細胞における E-カドヘリンの発現を検討した結果, HOC313 細胞と TSU 細胞ではその発現が極端に低下しており, これらの細胞はともに線維芽細胞様形態を示していた¹¹⁾。この過程でわれわれは E-カドヘリンを不均一に発現している HOC719 細胞を見出し, この細胞から E-カドヘリンを発現し上皮様形態を示す HOC719-PE 細胞と, E-cadherin を消失しており線維芽細胞

A **B** **C**

図 1 HOC719-PE 細胞と HOC719-NE 細胞の E-カドヘリンの発現、形態および浸潤能

A : Lab Tek Chamber に細胞を 3×10^4 個ずつ播種し 3 日間培養後、E-カドヘリンモノクローナル抗体 HECD-1 で免疫染色を行った。倍率： $\times 100$ 。B : HOC719 細胞から分離・樹立した HOC719-PE 細胞と HOC719-NE 細胞の位相差顕微鏡像。倍率： $\times 100$ 。C : HOC719-PE 細胞と HOC719-NE 細胞の浸潤能の比較。マトリゲルで表面処理したバイオコートセルウェアに細胞を 2×10^5 個ずつ播種した後 24 時間培養し、ギムザ染色後メンブレン下方に浸潤した細胞数を測定した。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=5$) を示す。

胞様形態を示す HOC719-NE 細胞を分離，樹立した。HOC719-NE 細胞における E-カドヘリンの発現は，mRNA レベルで低下しており，HOC719-NE 細胞の方が

高い浸潤能を示した。同様な細胞の報告は食道扁平上皮癌においてもされており，土岐らは，同一の食道扁平上皮癌から，上皮細胞様形態を示す E-カドヘリン陽性細胞と，

図 2 HOC719-PE 細胞と HOC719-NE 細胞における E-cadherin, MMP-2 と Snail mRNA の発現
各細胞より調製した total RNA 1 μ g を用いて RT-PCR を行い, 1.8% アガロースゲルに電気泳動後エチジウムブロマイドにて染色した。

線維芽細胞様形態を示す E-カドヘリン陰性細胞を分離し, E-カドヘリン陰性細胞の方が高い浸潤能を示すことを報告している¹²⁾。これらの結果は, 正常上皮細胞が癌化し, さらに高度浸潤能を獲得する過程でなんらかの遺伝的变化により E-カドヘリンの発現低下や MMP-2 の発現上昇を誘導していることを示し, また HOC719 細胞のような混合形態あるいは移行形態が存在することは, *in vivo* においても同様な変化が起きていることを示唆している。

E-cadherin の発現低下機構のひとつとして, そのプロモーター領域の DNA のメチル化が考えられてきた。その一方で, このプロモーター領域に存在する E-box が E-カドヘリンの負の制御領域として同定されている。最近, Battle ら⁵⁾および Cano ら⁶⁾は, この配列に結合する転写因子として Snail を同定し, Snail が E-box に直接結合し E-カドヘリンの転写活性を抑制することを報告した。Battle らは膀胱癌, 膵臓癌, 大腸癌, 乳癌由来の線維芽細胞様形態を示す細胞を検討し, これらの細胞では E-カドヘリンの発現の低下と Snail の発現に相関があることを示した⁵⁾。われわれは扁平上皮癌細胞においても同様に E-

A

B

C

図 3

図 3 E-カドヘリン陽性細胞の性状に与える Snail の影響

A: セミコンフルエントの HOC719-PE 細胞あるいは A431 細胞に pGL-Ecad-prom と pcDNA3 (□) あるいは pGL-Ecad-prom と pcDNA3-mm snail HA (■) をトランスフェクションして 48 時間培養後デュアルルシフェラーゼアッセイシステムにて転写活性を測定した。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=6$) を示す。
B: A431 pcD1 細胞と A431 SNA1 細胞の位相差顕微鏡像。倍率: $\times 100$ 。
C: E-カドヘリン陽性細胞の浸潤能に与える Snail の影響。マトリゲルで表面処理したバイオコートセルウェアーに A431 pcD1 細胞と A431 SNA1 細胞を 2×10^5 個ずつ播種した後 24 時間培養し, ギムザ染色後メンブレン下方に浸潤した細胞数を測定した。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=5$) を示す。

A

B

図4 E-cadherin 陽性細胞の MMP-2 発現に与える Snail の影響

A: 各細胞より調製した total RNA 1 μ g を用いて RT-PCR を行い, 1.8% アガロースゲルに電気泳動後エチジウムブロマイドにて染色した。B: セミコンフルエントの HOC719-PE 細胞あるいは A431 細胞に pGL-MP2-prom と pcDNA3 (□) あるいは pGL-MP2-prom と pcDNA3-mm snail HA (■) をトランスフェクションして 48 時間培養後デュアルルシフェラーゼアッセイシステムにて転写活性を測定した。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=6) を示す。

カドヘリンと Snail の発現の逆相関を示した⁸⁾。そこで, 扁平上皮癌細胞における Snail の機能をさらに検索する目的で, E-カドヘリンを発現している A431 細胞に Snail 発現ベクターをトランスフェクションして検討を行った。一過性発現系におけるルシフェラーゼアッセイで E-カドヘリンの転写活性を検討した結果, Snail 発現によって E-カドヘリンの転写活性は有意に抑制された。さらに, Snail

を過剰に発現する安定発現クローンを樹立して検討した。これらの細胞においては E-カドヘリンの発現の明らかな低下とともに, 細胞形態は線維芽細胞様に変化し, 浸潤能の上昇がみられた。さらに, RT-PCR の結果が示すように, MMP-2 の発現の RNA レベルでの上昇がみられた。この上昇は MMP-2 の転写活性の上昇によるものである事がルシフェラーゼアッセイによって明らかとなった。癌細胞における MMP-2 の活性化機構は TIMP2 と MT1-MMP による蛋白の相互作用によって説明されているが, Snail が MMP-2 の転写活性の調節に関与しているという報告は今回がはじめてである。しかしこの Snail による MMP-2 の転写活性の上昇は直接の誘導によるものかどうかは, 今後さらに検討が必要である。

これらの結果によって, 口腔扁平上皮癌細胞は Snail 発現上昇により E-cadherin の発現の低下をきたし, さらに MMP-2 の発現を上昇させることによって高度浸潤能を獲得することが明らかとなった。すなわち Snail が発生過程における上皮-間葉系移行と同様な機能によって, 扁平上皮癌細胞の生物学的な悪性化に関与していることが示唆された。癌組織における Snail の発現の検討は, 癌の浸潤・転移の予測に有用であり, 予後の推測や治療方針の決定に有用であると考えられる。

参考文献

- 1) Schipper, J.H., Frixen, U.H., et al.: E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 51: 6328-6327, 1991.
- 2) Yoshiura, K., Kanai, Y., et al.: Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7416-7419, 1995.
- 3) Graff, J.R., Herman, J.G., et al.: E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55: 5195-5199, 1995.
- 4) Girolodi, L.A., Bringuier, P.P., et al.: Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 453-458, 1997.
- 5) Battle, E., Sancho, E., et al.: The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. *Nature Cell Biol* 2: 84-89, 2000.
- 6) Cano, A., Perez-Moreno, M.A., et al.: The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transition by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biol* 2: 76-83, 2000.
- 7) Giard, D.J., Aaronson, S.A., et al.: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of a solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-1423, 1973.
- 8) Yokoyama, K., Kamata, N., et al.: Reverse

- correlation of E-cadherin and Snail in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncology* 37 : 65-71, 2001.
- 9) McCawley, L.J., Obrien, P., et al.: Epidermal growth factor (EGF) – and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) – mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP) –9. *J Cell Physiol* 176 : 255-265, 1998.
 - 10) Friksen, U.H., Behrens, J., et al.: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113 : 173-185, 1991.
 - 11) Hoteiya, T., Hayashi, E., et al.: Expression of E-cadherin in oral cancer cell lines and its relationship to invasiveness in SCID mice in vivo. *J Oral Pathol Med* 28 : 107-111, 1999.
 - 12) Doki, Y., Shiozaki H, et al.: Correlation between E-cadherin expression and invasiveness in vitro in a human esophageal cancer cell line. *Cancer Res* 53 : 3421-3426, 1993.

Expression and functions of Snail in acquiring high invasive ability in squamous carcinoma cells

Kazuhiro yokoyama, Nobuyuki kamata and Masaru nagayama

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, University of Tokushima

Abstract

Loss of cell-cell adhesion and degradation of extracellular matrix are necessary for infiltration and metastasis of cancer cells. E-cadherin is a calcium-dependent cell adhesion molecule and the loss of E-cadherin expression has been reported in highly invasive squamous cell carcinomas (SCCs). Recently, a transcription factor Snail was identified as repressor of E-cadherin. In this report, we found that HOC719, a cell line derived from oral SCC, expressed E-cadherin heterogeneously and we isolated E-cadherin positive (HOC719-PE) and negative cells (HOC719-NE) from this cell line. HOC719-PE cells showed epithelial cell shape, while HOC719-NE cells showed fibroblastic. Moreover, HOC719-NE cells had higher invasive ability and expressed MMP-2 and Snail mRNA more strongly than HOC719-PE cells. Then we studied the effects of Snail expression in E-cadherin positive cells by transfecting a Snail expression vector. E-cadherin promoter activity decreased in transiently Snail transfected A431 and HOC719-PE cells. Stably Snail-expressing A431 cells changed to the fibroblastic morphology and acquired more invasive ability. By the RT-PCR analysis, these Snail-expressing cells showed decreased expression of E-cadherin but increased expression of MMP-2. Furthermore, overexpressing of Snail induced the increased MMP-2 promoter activity of A431 and HOC719-PE cells by the luciferase reporter assay.

These results indicate that Snail plays a key role in the acquisition of more invasive phenotypes of SCC via changing the cell shape and expression of E-cadherin and MMP-2.

Key words : E-cadherin, Snail, squamous cell carcinoma

Requests for reprints to: Dr. Yokoyama K., First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, University of Tokushima. 3-18-15 Kuramotocho, Tokushima 770-8504, Japan.