

令和元年5月29日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11240

研究課題名(和文) AP-1関連エクソソーム由来miRNAによる頭頸部癌頸部転移の機能解析と早期診断

研究課題名(英文) The role of AP-1 mediated miRNA on regional metastatic process of head and neck cancer

研究代表者

佐野 大佑 (Daisuke, Sano)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：10620990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今までの研究より頭頸部扁平上皮癌の転移関連遺伝子としてFosL1を選出した。頭頸部癌におけるFosL1発現抑制に伴い、in vitroでは浸潤能、遊走能の低下を、in vivoでは認めた。また頸部転移率の低下とモデルマウスの生存延長を認めた。FosL1発現抑制株とコントロール株を用いてプロテオミクス解析を行い、過去の報告なども参考にFosL1の標的遺伝子としてHMGA1を選出した。HMGA1の発現抑制に伴い遊走能の低下を認めた。以上より、本研究により頭頸部扁平上皮癌において、FosL1は浸潤能、遊走能を亢進することで頸部転移形成を促進し、その制御にHMGA1を介することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌は進行癌で発見されることが多く、予後不良である。ここ数十年の予後改善は乏しく、その大きな原因の一つは、高頻度に発生する頸部リンパ節転移を含む、転移病変の制御が困難なため治療成績が改善しないことにある。

本研究で明らかにしたFosL1を介した頸部リンパ節転移制御機構により、頸部リンパ節転移を標的とした新しい頭頸部癌治療開発につなげることが可能となり、頭頸部癌患者の予後改善に大きく寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：We initially performed the upstream and key nodes analysis related with whole gene microarray analysis characterized by regional metastatic potential in vivo with HNSCC cell lines and identified FosL1, member of the activated protein-1 (AP-1) family, as a key molecule regulating the pathways related with regional metastasis of HNSCC. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of FosL1 in HNSCC cells, markedly suppressed the ability of invasion and migration in vitro. In addition, short hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of FosL1 significantly repressed the incidence of cervical lymph node metastases in vivo. These results suggested that FosL1 could play an important role to promote cell invasion, migration and regional metastasis of HNSCC.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌扁平上皮癌 頸部リンパ節転移 AP-1 FosL1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は高頻度に頸部リンパ節転移病変を有し、その制御が困難であるため予後不良である。このような背景のもと、申請者は以前獲得した文科省科学研究費(研究課題番号: 24791797)により、頸部リンパ節転移を再現、検討できる同所性頭頸部癌モデルを用いて得られた *in vivo* における頭頸部癌頸部リンパ節転移能の結果に加え、Whole gene microarray、並びに同解析結果をもとに施行された遺伝子カスケード解析の結果から、頭頸部癌頸部リンパ節転移と強い関連をもつ可能性が高い遺伝子として、AP-1 遺伝子群を同定した(図1)。

また前回獲得した文科省科学研究費(研究課題番号: 26861406)では、頭頸部癌遠隔転移モデル、Whole gene microarray、遺伝子カスケード解析の結果から、AP-1 遺伝子群が遠隔転移に関わる候補遺伝子であることが判明し、AP-1 遺伝子群が頭頸部癌における頸部リンパ節転移、遠隔転移の制御に密接に関与していることを同定した。

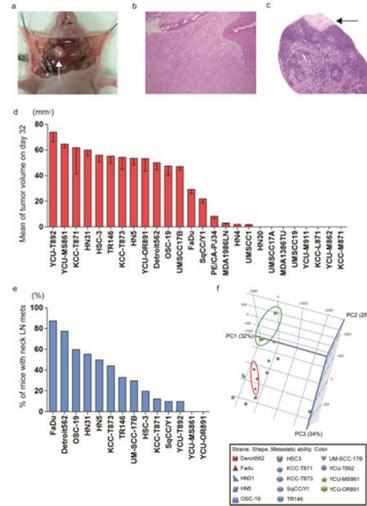


図1. 同所性頭頸部癌モデルの頸部転移能

2. 研究の目的

申請当初 AP-1 遺伝子群に関連する miRNA の機能解析を通して、miRNA の頭頸部癌における頸部リンパ節転移の進展に果たす役割を明らかにすることを目的としていたが、まずは頭頸部癌の頸部転移における AP-1 遺伝子群の役割を同定し、将来の新しい頭頸部癌の治療法、頭頸部癌転移を早期に同定しうる新しい診断法の開発への足がかりとなりうるか、という点を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

今までの研究で頭頸部扁平上皮癌の転移関連遺伝子群として同定した AP-1 遺伝子群の中でも FosL1 を検証対象として選出し、頭頸部扁平上皮癌の大きな予後因子の一つである頸部リンパ節転移能への FosL1 の関与について以下のように検討を行った。

頭頸部扁平上皮癌における FosL1 発現抑制細胞株を siRNA または CRISPR/cas9 を用いて作製し、invasion assay, migration assay, cell viability assay を行い、FosL1 発現抑制による *in vitro* における浸潤能、遊走能、増殖能に与える影響を検討した。

また CRISPR/cas9 による FosL1 の発現抑制細胞株による同所性頭頸部癌マウスモデルを用いて、FosL1 発現抑制による *in vivo* における頸部転移能に与える影響を、マウスモデルの生存期間、頸部転移率を調べることで検討した。

最後に、FosL1 が制御する遺伝子を探索するため、FosL1 発現抑制細胞株とコントロール細胞株を用いてプロテオミクス解析を行い、FosL1 の標的遺伝子候補として HMGA1 を選出したため、HMGA1 発現抑制細胞株を siRNA を用いて作製し、migration assay, cell viability assay を行い、HMGA1 発現抑制による *in vitro* における遊走能、増殖能に与える影響を検討した。

4. 研究成果

siRNA を用いて FosL1 ノックダウン細胞株を作製し、invasion assay, migration assay を施行したところ、両細胞株において、FosL1 の発現抑制に伴い浸潤能、遊走能の低下を認めた(図2)。

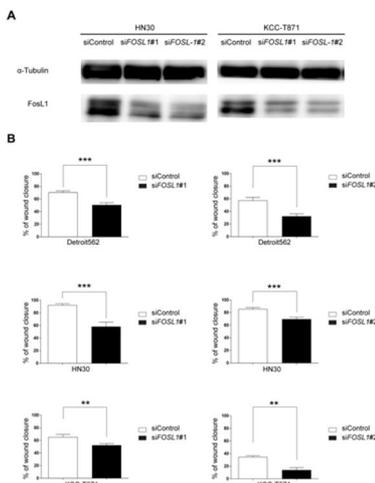


図2. FosL1 発現抑制に伴う *in vitro* における浸潤能、遊走能への影響

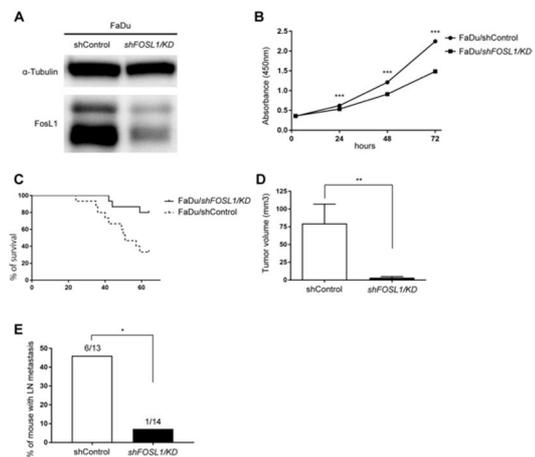


図3. FosL1 発現抑制に伴う *in vivo* における腫瘍増殖能、頸部転移能への影響

同所性頭頸部癌マウスモデルにおいては，FosL1 の発現抑制により頸部転移率の低下を認め，それらと共にモデルマウスの生存延長を確認した（図3）。

FosL1 発現抑制細胞株とコントロール細胞株を用いてプロテオミクス解析を行ったところ，FosL1 の標的遺伝子候補として8遺伝子が同定され，過去の報告なども参考に FosL1 の標的遺伝子として HMGA1 を選出した。siRNA を用いて HMGA1 ノックダウン細胞株を作製し，migration assay を施行したところ，HMGA1 発現抑制に伴い，遊走能の低下を認めた。以上の結果から，本研究により頭頸部扁平上皮癌において，FosL1 は細胞浸潤能，遊走能を亢進することで頸部転移形成を促進し，その制御に HMGA1 を介することが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kuwahara T, Takahashi H, **Sano D**, Matsuoka M, Hyakusoku H, Hatano T, Hiiragi Y, **Oridate N**.: Fibrinogen and Neutrophil-to-lymphocyte Ratio Predicts Survival in Patients with Advanced Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2018 Sep;38(9):5321-5330. 査読有

**Sano D**, Yabuki K, Takahashi H, Arai Y, Chiba Y, Tanabe T, Nishimura G, **Oridate N**. Lymph node ratio as a prognostic factor for survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2018 Aug;45(4):846-853. 査読有

**Sano D**, Yabuki K, Arai Y, Tanabe T, Chiba Y, Nishimura G, Takahashi H, Yamanaka S, **Oridate N**. The applicability of new TNM classification for humanpapilloma virus-related oropharyngeal cancer in the 8th edition of the AJCC/UICC TNM staging system in Japan: A single-centre study. *Auris Nasus Larynx.* 2018 Jun;45(3):558-565. 査読有

Hatano T, **Sano D**, Takahashi H, Hyakusoku H, Isono Y, Shimada S, Sawakuma K, Takada K, Oikawa R, Watanabe Y, Yamamoto H, Itoh F, Myers JN, **Oridate N**. Identification of human papillomavirus (HPV) 16 DNA integration and the ensuing patterns of methylation in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 2017 Apr 1;140(7):1571-1580. 査読有

Yabuki K, **Sano D**, Shiono O, Arai Y, Chiba Y, Tanabe T, Nishimura G, Takahashi M, Taguchi T, Kaneta T, Hata M, **Oridate N**. Surgery-based versus radiation-based treatment strategy for a high metabolic volume laryngeal cancer. *Laryngoscope.* 2017 Apr;127(4):862-867. 査読有

Yabuki K, **Sano D**, Shiono O, Arai Y, Takahashi H, Chiba Y, Tanabe T, Nishimura G, Takahashi M, Taguchi T, Kaneta T, Hata M, **Oridate N**. Prognostic significance of metabolic tumor volume in patients with piriform sinus carcinoma treated by radiotherapy with or without concurrent chemotherapy. *Head Neck.* 2016 Nov;38(11):1666-1671. 査読有

Nishimura G, Taguchi T, Takahashi M, Shiono O, Komatsu M, **Sano D**, Yabuki K, Arai Y, Takahashi H, Hata M, **Oridate N**. Phase II trial of concurrent bio-chemoradiotherapy using docetaxel, cisplatin, and cetuximab for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016 Jun;77(6):1315-9 査読有

Taguchi T, Nishimura G, Takahashi M, Shiono O, Komatsu M, **Sano D**, Yabuki KI, Arai Y, Yamashita Y, Yamamoto K, Sakuma Y, Oridate N. Treatment results and prognostic factors for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with salvage surgery after concurrent chemoradiotherapy. *Int J Clin Oncol.* 2016 Oct;21(5):869-874 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

**Sano D**, Sawakuma K, Hyakusoku H, Takahashi H, Hatano H, Isono Y, Takada K, Sato K, Kuwahara T, Aizawa Y, **Oridate N**: FOSL1 promotes regional metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. The 77<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer Association, 大阪国際会議場（大阪府大阪市），September 27-29, 2018

**Sano D**: The impact of matted nodes status for the survival of patients with human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in the 8th edition of the AJCC/UICC TNM classification in Japan. 14th conference on Otolaryngology-head & neck surgery, Kaohsiung, Taiwan, December 1-2, 2017

**Sano D**: The molecular details of human papillomavirus (HPV) 16 DNA integration and various patterns of methylation in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma cell lines. GAP 2017 conference, Houston, TX, USA, May 9-11, 2017

**Sano D**, Hyakusoku H, Takahashi H, Hatano H, Isono Y, Shimada S, Sawakuma K, Jeffrey NM, **Oridate**

N: JunB plays an important role in promoting cell invasion, migration and distant metastasis through regulating matrix metalloproteinase in head and neck squamous cell carcinoma. AHNS 9th International Conference on Head and Neck Cancer, Seattle, WA, July 16-20, 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：折館 伸彦

ローマ字氏名：(ORIDATE, Nobuhiko)

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：90312355

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 秀聡

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, Hideaki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。