

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20433

研究課題名(和文) Sam68を標的とした口腔がんの新たな診断・治療方法開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Efficacy of mRNA-binding protein Sam68 as new biomarker and therapeutic target in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

黒嶋 雄志 (Kuroshima, Takeshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00610669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、口腔がんにおけるmRNA結合タンパクSam68の新規バイオマーカーおよび治療標的としての有用性を明らかにすることである。口腔扁平上皮癌組織のSam68発現様式を検討し、頸部リンパ節転移をきたした症例では細胞質内のSam68が高発現していることが明らかとなった。RNA結合タンパクが構成する細胞質内顆粒(Stress granules)を解析し、正常細胞とがん細胞ではストレス下でのStress granulesの挙動が異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Sam68の細胞質内発現の増加が口腔扁平上皮癌の転移能に寄与していることが示唆された。また、正常細胞とがん細胞ではStress granulesの挙動が異なり、ストレス下でのmRNA制御機構に違いがあることが示唆された。これらの結果は、口腔扁平上皮癌のSam68細胞質内高発現やがん細胞でのStress granulesの特異的挙動が、新規バイオマーカーおよび治療標的として有用である可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Main purpose of this study is to demonstrate the efficacy of mRNA-binding protein Sam68 as new biomarker and therapeutic target in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Immunohistochemical staining study of Sam68 in OSCC tissues revealed that OSCC with metastasis to cervical lymph nodes had high expression of cytoplasmic Sam68. The differences of stress-induced cytoplasmic granules (Stress granules) were observed between cancer cells and normal cells.

研究分野：口腔がん、アデノウイルス、mRNA代謝機構

キーワード：口腔がん RNA結合タンパク Sam68

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんの発生と進行において、遺伝子発現の異常が重要な役割を果たしている。遺伝子は mRNA へ転写されたのち、プロセッシング、核外輸送、分解、保管などの、いわゆる転写後調節によって、その発現を巧みに制御されている。mRNA は単独では存在せず、RNA 結合タンパク (以下、RBP) と複合体を形成し、そのタンパクの機能に応じた制御を受けている。このように RBP は遺伝子発現制御の主力因子であるが、近年の多くの研究では、がんにおける RBP の関与が明らかとなり、そのメカニズム解明と治療ターゲットとしての検討が進められている。我々はこれまでに、ある種の RBP による mRNA 安定化が細胞のがん化に寄与することを明らかにした<sup>1</sup>。

さらに RBP は、細胞がストレスに暴露されると細胞質において顆粒状構造物を形成することが知られている。その一つが Stress granules (SG) である。我々はこれまでに、ウイルス感染細胞における SG および SG 構成タンパクの特異的挙動を解明した<sup>2, 3</sup>。がん細胞とウイルス感染細胞は、自身の増殖に有利な遺伝子発現機構を細胞内に構築するという共通点をもつため、がん細胞でも SG や SG 構成タンパクが特異的な挙動を示す可能性が考えられる。

そこで我々は SG 構成タンパクのひとつである RBP (Sam68) に関して予備実験を行ったところ、口腔扁平上皮癌における悪性形質との関連が示唆されたため、本研究を計画するに至った。

### 参考文献)

1. Kuroshima T., Aoyagi M., Higashino F. et al. Viral mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA can induce cell transformation. *Oncogene*, 30, 2912-2920 (2011).
2. 黒嶋雄志. アデノウイルス感染による RNA 結合タンパク HuR の制御. *北海道歯学雑誌*, 33, 3-9 (2012)
3. 黒嶋雄志, 東野史裕, 他. アデノウイルスによる mRNA 代謝機構の制御. 第 14 回日本アデノウイルス研究会 proceedings, 6-7 (2013)

### 2. 研究の目的

口腔がんは頭頸部がんの約半数を占め、その大多数は扁平上皮癌である。進行した口腔がんはいまだに予後が不良であることも多く、特に頸部リンパ節への転移は予後を左右する重要な因子である。画像検査で検出できない潜在的な転移は発見と治療が遅れやすく、常に問題となる。症例それぞれのがんの生物学的性質、特に転移能について早い段階で診断できれば、それを裏付けとした治療選択が可能になると考えられ、口腔がん患者の予後改善につながると考えられる。

そこで本研究は、Sam68 という RBP の口腔扁平上皮癌における機能解析を行い、転移や予後を予測する新規バイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とした。また、口腔扁平上皮癌における Sam68 の機能において正常細胞との相違を見出し、これを標的とした新しいがんの治療法開発の基盤構築を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1). Sam68 発現様式の検討

Sam68 の免疫組織染色を行い、正常口腔粘膜ならびに口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma, 以下 OSCC) 組織における Sam68 の発現様式を検討した。下記の基準に従って核と細胞質それぞれについて染色性を評価し、点数化した。

A) 腫瘍細胞全体における染色陽性細胞の割合を点数化  
0%: 0, 0~10%: 1, 10~30%: 2, 30~70%: 3, 70~100%: 4

B) 染色陽性細胞における平均的染色強度を点数化 (右図)

No stain: 0, Weak: 1, Moderate: 2, Strong: 3

核内スコア: 核における A と B の積

細胞質内スコア: 細胞質における A と B の積

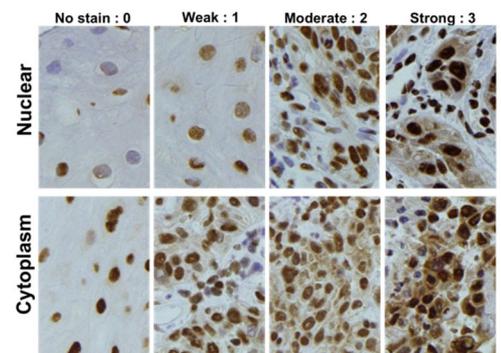


図 1 Sam68 の染色性評価基準

#### (2). 正常細胞とがん細胞における SG の挙動解析

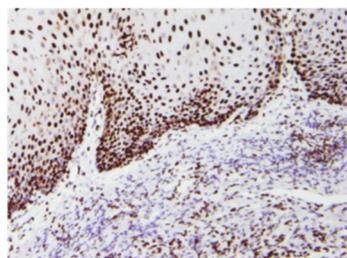
正常細胞とがん細胞株にストレス (ヒ素) を与え、代表的な SG マーカー (HuR, TIA-1, G3BP など) を蛍光免疫染色し、SG の挙動を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。一定条件で撮影した顕微鏡画像を用いて、SG の個数や大きさなどを比較した。

## 4. 研究成果

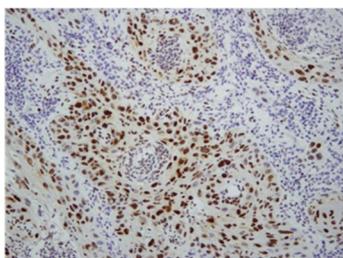
### (1). Sam68 の発現様式の検討

正常口腔粘膜組織と OSCC 組織での Sam68 発現様式の比較

OSCC 組織における細胞質内の Sam68 の発現は、正常口腔粘膜に比較して増加していることが明らかとなった(図 2, 3)。これに対し、核内の Sam68 の発現は有意差を認めなかったため、OSCC の悪性形質には Sam68 の細胞質内発現が関与していることが示唆された。



正常口腔粘膜のSam68



OSCCのSam68

図 2 Sam68 発現様式の比較

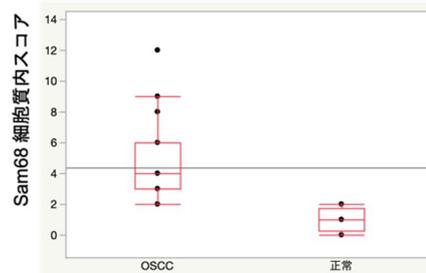


図 3 Sam68 細胞質内スコア

OSCC 組織における Sam68 発現様式と臨床病理学的因子の検討

OSCC の 27 症例を対象とし、Sam68 発現様式と臨床病理学的因子の関連性を検討した。頸部リンパ節転移をきたした症例では、細胞質内の Sam68 が高発現していることがわかった(表 1)。このことから、Sam68 の細胞質内発現の増加が OSCC の転移能に寄与していることが示唆され、転移能を反映するバイオマーカーとしての有用性が示された。

	核内スコア		P value	細胞質内スコア		P value
	低	高		低	高	
頸部リンパ節転移						
なし	16	0	0.019	14	2	< 0.01
あり	7	4		1	10	

Fisher exact probability

表 1 OSCC における Sam68 発現様式と臨床病理学的因子の関連性検討 ( $P < .01$  で有意差ありとした)

### (2). 正常細胞とがん細胞における Stress granules の挙動解析

正常細胞とがん細胞のいずれにおいても、ヒ素を付与した際にほぼ 100%の細胞で SG の形成が観察された。SG の形態と個数、分布を観察したところ、正常細胞では小さな granules が細胞質全体に数多く分布する傾向がみられた(図 4, 5)。一方、がん細胞の granules は正常細胞よりも大きく、しかし数は少ないという傾向があった。また、SG が核の近傍に局在するものも散見され、一つの特徴と思われた。(図 4, 5)。

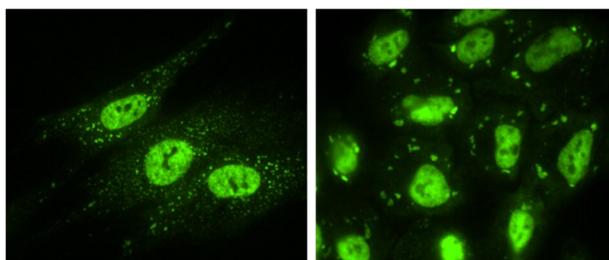


図 2 SG (左は正常細胞、右はがん細胞)

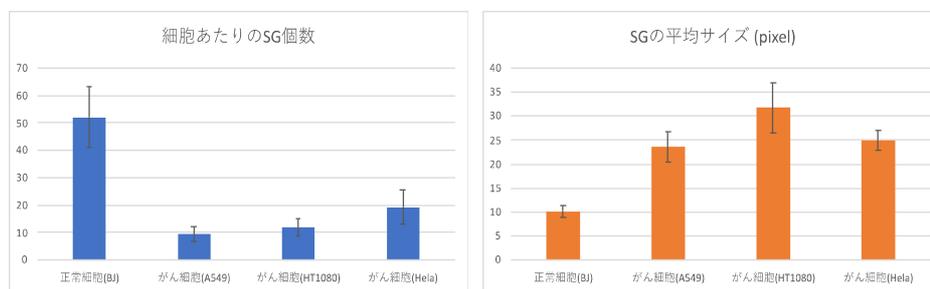


図 3 正常細胞とがん細胞での SG の個数・平均サイズの比較

これらの結果は、正常細胞とがん細胞ではストレスに対して形成される SG の挙動が異なり、ストレス下での mRNA 制御機構に違いがあることを示唆している。この詳細をさらに明らかにできれば、これを標的とした新規診断・治療方法へと繋がる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Habiba Umma, Kuroshima Takeshi, Yanagawa-Matsuda Aya, Kitamura Tetsuya, Chowdhury AFMA, Jehung Jumond P., Hossain Elora, Sano Hidehiko, Kitagawa Yoshimasa, Shindoh Masanobu, Higashino Fumihito	4. 巻 369
2. 論文標題 HuR translocation to the cytoplasm of cancer cells in actin-independent manner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 218 ~ 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2018.05.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jehung Jumond P., Kitamura Tetsuya, Yanagawa-Matsuda Aya, Kuroshima Takeshi, Towfik Alam, Yasuda Motoaki, Sano Hidehiko, Kitagawa Yoshimasa, Minowa Kazuyuki, Shindoh Masanobu, Higashino Fumihito	4. 巻 495
2. 論文標題 Adenovirus infection induces HuR relocalization to facilitate virus replication	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1795 ~ 1800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada Kaho, Kuroshima Takeshi, Shimamoto Hiroaki, Ohsako Toshimitsu, Kayamori Kou, Ikeda Tohru, Harada Hiroyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Metastasis of lower gingival squamous cell carcinoma to buccinator lymph node: case report and review of the literature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12957-019-1559-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田 彩, 黒嶋 雄志, 北村 哲也, 東野 史裕.
2. 発表標題 アデノウイルスの感染によるP-bodyの形態変化とARE-mRNAの安定化.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi KUROSHIMA, Yasuyuki MICHl, Hiroaki SHIMAMOTO, Hirofumi TOMIOKA, Hideaki HIRAI, Takuma KUGIMOTO, Yumi MOCHIZUKI, Kae TANAKA and Hiroyuki HARADA.
2. 発表標題 Contralateral cervical lymph node metastases in tongue squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 7th WORLD CONGRESS of the International Academy of Oral Oncology.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----