

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20591

研究課題名(和文) 難治性口腔癌の分泌型microRNAによる腫瘍微小環境構築の理解と新規治療法開発

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of regulating tumor microenvironment by secreted micro RNA from intractable oral cancer, and development a new treatment strategy

研究代表者

吉田 遼司 (YOHSIDA, RYOJI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：10632458

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)：本研究ではエクソソームmiRNAを中心とする新たな口腔扁平上皮癌(OSCC)の悪性形質制御ネットワークを解明し、新規診断・治療法の確立を目指した。

難治性OSCCに特徴的な分泌型miRNAを明らかにするために、化学放射線療法が奏功したOSCC患者と無効であった患者の血漿中miRNAの発現を比較した。その結果、miR-223、miR-659、miR-1290の発現に有意な変化を認め、患者血漿中におけるmiRNAの発現は転移、再発、化学放射線療法に対する反応性および患者予後と相関した。本研究によって高悪性OSCC特異的な循環miRNA発現が明らかとなり、新規診断、治療法の標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the mechanism of tumor microenvironment regulating secreted micro RNA from intractable oral cancer and development a new diagnosis/treatment strategy.

We compared the miRNA expression profile between the good-responder and poor-response for chemoradiotherapy by using plasma obtained from OSCC patient's. We found that the expression of miR-223, miR-659 and miR-1290 showed significant change among two groups. The expression status of these miRNA in plasma correlated with metastasis, recurrence and response to chemoradiotherapy of advanced OSCC. Moreover, the expression status of miRNA also correlated with patient's survival. These results suggest that circulating miRNA which is distinctive in intractable OSCC may be a promising target for new diagnostic modality and treatment strategy.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 micro RNA 腫瘍微小環境 循環miRNA 治療抵抗性 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は世界的にみても腫瘍な悪性腫瘍の1つであり、その80%以上をOSCCが占めている。近年、OSCCの診断・治療法の選択肢は広がっているが、その5年生存率に大きな改善はみられない(Siegel et al. CA Cancer J Clin 2012, Gupta et al. Int J Cancer 2009)。その原因として、腫瘍組織中に高浸潤・転移能あるいは治療抵抗性をもつ高悪性腫瘍細胞が存在していることが挙げられる(Hanahan & Weinberg. Cell 2011)。近年、そのような腫瘍細胞の一部は“癌幹細胞”と位置付けられ、OSCCでもその存在が示唆されている(Prince et al. J Clin Oncol 2008)。一方、癌幹細胞の悪性形質獲得・維持には腫瘍細胞自身の形質変化のみならず、腫瘍細胞を取り巻く腫瘍間質が非常に重要であることが見出され、いわゆる“腫瘍微小環境”の理解が難治性癌克服に不可欠であると考えられている(Meads et al. Nat Rev Cancer 2009, Brock et al. Nat Rev Cancer 2015)。これらの背景から、高転移性、治療抵抗性を有するOSCC癌幹細胞の成立・維持に関わる腫瘍微小環境調節の分子メカニズムの解明は難治性OSCCの診断法や治療法の開発に重要であると考えられる。そのような視点から申請者はこれまでOSCCにおける腫瘍間質と悪性形質との関連について発現検討や機能解析を行い、腫瘍間質がOSCCの転移や治療抵抗性に関与することを報告してきた(Nakagawa et al. Int J Oncol 2014, Matsuoka et al. APMIS 2015)。近年、癌研究においてmiRNAが注目を集めている。miRNAは蛋白質をコードしない18-24塩基程度の内在性small RNAとして発見され(Pasquinelli et al. Nature 2000)、標的遺伝子の転写阻害や転写後の翻訳阻害を介して癌においても重要な役割を担っていることが明らかにされた(Calin et al. Nat Rev Cancer 2006)(図1A)。更に、腫瘍細胞から周囲に分泌されるエクソソームmiRNAが腫瘍細胞同士あるいは間質細胞とのクロストークに重要な役割を果たしていることが見い出され、新たな治療標的や診断ツールとして注目を集めている(Kohlhapp et al. Oncogene 2015)(図1B)。しかし、OSCCにおいて高悪性形質を有する腫瘍細胞におけるエクソソームmiRNAの発現プロファイル、腫瘍間質細胞に与える影響、OSCC癌幹細胞の形成・維持に果たす役割について、未だその詳細は不明である。

他癌腫においてエクソソームmiRNAを標的とした治療法の有用性が示唆されつつある現在(Tominaga et al. Nat Commun 2015)、OSCCにおけるエクソソームmiRNAの機能を解明することはOSCCやOSCC癌幹細胞に対する理解を深め、新たな治療法を創出する為の新たな知見をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

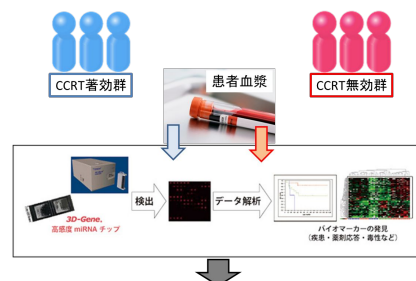
口腔扁平上皮癌(Oral squamous cell carcinoma: OSCC)は口腔癌の80%を占める疾患で、医療技術の進歩にも関わらず治療成績の劇的な向上には至っていない。その原因として腫瘍が有する浸潤・転移能や抗癌剤・放射線抵抗性の存在があり、その制御機構に腫瘍微小環境が関与することが明らかとなっている。近年、その腫瘍微小環境の調節に細胞外分泌小胞に内包されたmicroRNA(エクソソームmiRNA)が関わり、癌の転移・治療抵抗性の獲得・維持に寄与することが明らかとなってきた。しかし、エクソソームmiRNAによるOSCCの腫瘍微小環境調節機構や悪性形質の獲得・維持との関連は不明な点が多い。そこで本研究ではエクソソームmiRNAを中心とする新たなOSCC悪性形質制御ネットワークを解明し、口腔扁平上皮癌の新規診断・治療法の確立を目指すこととした。

3. 研究の方法

(a) 高悪性OSCCに特徴的なエクソソームmiRNAプロファイルの同定

当科で実施した化学放射線療法に対する治療効果によって患者を分け、両群の血漿中miRNA発現をマイクロアレイ(3D-Gene Human miRNA Oligo chip - 4 plex)で解析し、普遍的なmiRNAプロファイルを同定した(図1)。

図1



治療効果や予後予測マーカーとなる血中の分泌型miRNAの探索

(b) アレイ解析において発現変動のあったエクソソームmiRNAの臨床的意義の検討

アレイ解析で発現変動を認めたエクソソームmiRNAは高悪性OSCCの病態に深く関わる可能性が示唆される。しかし、あくまで患者血漿中における変動であることから、アレイ解析で候補となったmiRNAがOSCC患者の臨床データと相関を示すか否かを、臨床サンプルを用いたリアルタイムPCR法で解析し、各種臨床情報との関連を統計学的に検討した。

【対象】

当科でS-1併用術前化学放射線療法(CCRT)施行後の根治手術を施行した進行OSCC患者55名

【対象としたmiRNA】

miR-223, miR-659, miR-1290 CCRT無効群で発現が変動していたmiRNA

【方法】

保存されていた治療開始前の患者血漿中の miRNA を real-time qRT-PCR で測定

4. 研究成果

(a) 高悪性 OSCC における血漿中 miRNA 発現プロファイル

化学放射線療法が奏功した OSCC 患者と無効であった OSCC 患者（各群 5 名ずつ）から採取した血漿中の miRNA 発現を比較したところ、奏功群と比して無効群で 234 個の miRNA が 2 倍以上の発現亢進を示し、143 個の miRNA が 1/2 以下の発現低下を認めた（下図 2）

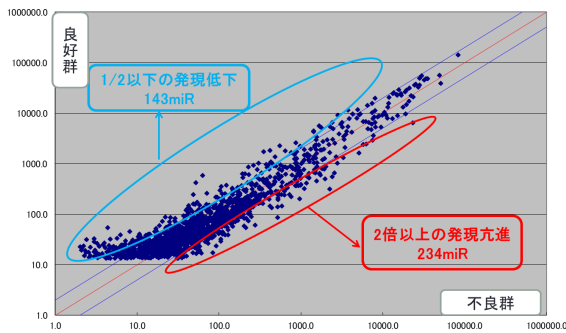


図 2

更に、発現変動がより大きく統計学的に有意差を示す miRNA を抽出したところ、下表に示すように 9 種類の miRNA に絞り込まれた（表 1）

表 1

miR	不良群	良好群	不良/良好
hsa-miR-2467-3p	63.0	581.3	0.11
hsa-miR-486-5p	353.3	1706.9	0.21
hsa-miR-614	52.4	416.9	0.13
hsa-miR-1260b	552.8	2215.0	0.25
hsa-miR-223-3p	971.6	198.9	4.88
hsa-miR-659-3p	278.6	59.4	4.69
hsa-miR-1202	1980.4	491.1	4.03
hsa-miR-1290	520.8	85.5	6.10
hsa-miR-1246	2248.2	313.5	7.18

1/2以下の発現低下

4倍以上の発現亢進

更に、過去の報告や体液中において発現変動雄を検出するという観点から、miR-223、miR-659、miR-1290 を以降の実験に用いた。

(b) OSCC における循環 miRNA の臨床的意義の検討

OSCC 患者 55 例を対象とし、血漿中 miRNA 発現と各種臨床項目との関連性を検討した。結果として、miR-223 の高値は局所再発、miR-659 の高値は pT-stage、pN-stage、遠隔転移の有無と有意な相関を示した（表 2、3）

表 2

Table. Correlation between the plasma miR-223 status and clinicopathological factors in 55 OSCC patients.

Characteristics	n	Plasma miR-223 status		P-value
		High	Low	
Loco-regional recurrence				
Yes	6	3 (50.0)	3 (50.0)	
No	45	7 (15.6)	38 (84.4)	0.046*

表 3

Table. Correlation between the plasma miR-659 status and clinicopathological factors in 55 OSCC patients.

Characteristics	n	Plasma miR-659 status		P-value
		High	Low	
pT-stage				
T2	18	4 (22.2)	14 (77.8)	
T3	17	3 (17.6)	14 (82.4)	
T4	16	11 (68.8)	5 (31.2)	0.003*
pN-stage				
N0	21	4 (19.0)	17 (81.0)	
≥ N1	30	14 (46.7)	16 (53.3)	0.042*
Distant metastasis				
Yes	7	5 (71.4)	2 (28.6)	
No	44	13 (29.5)	31 (70.5)	0.031*

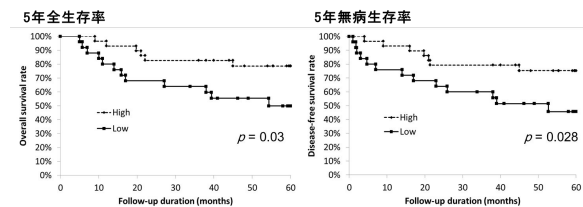
更に、血中 miR-1290 の発現量は、分化度、CCRT の病理学的治療効果、再発の有無と有意に相関した（表 4）

表 4

Table. Correlation between the plasma miR-1290 status and clinicopathological factors in 55 OSCC patients.

Characteristics	n	Plasma miR-1290 status		P-value
		High	Low	
Differentiation				
Well	43	26 (60.5)	17 (39.5)	0.030*
Moderate	12	3 (25)	9 (75)	
Pathological response				
Poor ~ partial response	12	3 (25)	9 (75)	0.030*
Complete response	43	26 (60.5)	17 (39.5)	
Loco-regional recurrence				
Yes	12	3 (25)	9 (75)	0.030*
No	43	26 (60.5)	17 (39.5)	

また、miR-1290 についてはその発現が患者予後とも相関した（図 3）



The results of a multivariate regression analysis for predicting the survival of 55 OSCC

Variables	OS		DFS	
	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
Plasma miR-1290 status				
High	2.820(0.91-10.4)	0.074	3.809(1.21-14.6)	0.021*
Low				

CI, confidence interval; *P < 0.05

図 3

本研究期間中に、治療抵抗性を有する OSCC 患者特有の血中 miRNA プロファイルを明らかにするに至った。しかしながら、患者検体を用いた検証において、必ずしも抽出された miRNA 発現が化学放射線療法の治療効果や患者予後と相関しなかった。特に、miR-1290 については網羅的解析結果とは相反する結果となった。これには、候補 miRNA 探索に用いた臨床検体が 5 症例と少なかったことや、miRNA 発現の個人差に依るところが大きいと考えられた。このことから、真に有用なバイオマーカー探索の為にはより多検体での候補 miRNA 探索や検証実験が必要であると考えられた。

一方、本研究期間中、血漿中 miRNA の抽出方法や定量方法について、実験間誤差が比較の出やすいことが明らかとなった。このことから、循環 miRNA を臨床応用するには、検体収集から miRNA 抽出、定量までのプロセスを画一化していく必要があると考えられた。

また、本研究期間中には循環 miRNA がどのように腫瘍微小環境の構築に関わるかは明らかには出来なかったが、現在、miRNA の生物学的意義や腫瘍微小環境構築に与える影響について、解析準備を進めている。なお、本研究成果の一部は現在、国際学術雑誌へ投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Sakata J, Yamana K, Yoshida R, Matsuoka Y, Kawahara K, Arita H, Nakashima H, Nagata M, Hirosue A, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Hiraki A, Shinohara M, Toya R, Murakami R, Nakayama H.

Tumor budding as a novel predictor of occult metastasis in cT2N0 tongue squamous cell carcinoma.

Hum Pathol. S0046-8177(17), 30492-6 (2018)

査読有り

doi: 10.1016/j.humphath.2017.12.021.

2. Shinriki S, Jono H, Maeshiro M, Nakamura T, Guo J, Li JD, Ueda M, Yoshida R, Shinohara M, Nakayama H, Matsui H, Ando Y. Loss of CYLD promotes cell invasion via ALK5 stabilization in oral squamous cell carcinoma.

J Pathol. 244(3), 367-379 (2018)

査読有り

doi: 10.1002/path.5019.

3. Arita H, Nagata M, Yoshida R, Matsuoka Y, Hirosue A, Kawahara K, Sakata J, Nakashima H, Kojima T, Toya R, Murakami R, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H.

FBXW7 expression affects the response to chemoradiotherapy and overall survival among patients with oral squamous cell carcinoma: A single-center retrospective study.

Tumour Biol. 39(10):10 (2018)

査読有り

doi: 10.1177/1010428317731771.

4. Sakata J., Yoshida R., Matsuoka Y., Nagata M., Hirosue A., Kawahara K., Nakamura T., Nakamoto M., Hirayama M., Takahashi N., Nakashima H., Arita H., Ogi H., Hiraki A., Shinohara M. and Nakayama H.

Predictive value of the combination of SMAD4 expression and lymphocyte infiltration in malignant transformation of oral leukoplakia.

Cancer Med. 6(4), 730-738 (2017)

査読有り

doi: 10.1002/cam4.1005.

5. Tanaka T., Imamura T., Yoneda M., Irie A., Ogi H., Nagata M., Yoshida R., Fukuma D., Kawahara K., Shinohara M. and Nakayama H.

Enhancement of active MMP release and invasive activity of lymph node metastatic tongue cancer cells by elevated signaling via the TNF- α -TNFR1-NF- κ B pathway and a possible involvement of angiopoietin-like 4 in lung metastasis.

Int J Oncol. 49(4), 1377-84 (2016)

査読有り

doi: 10.3892/ijo.2016.3653.

6. Matsuoka Y., Nakayama H., Yoshida R., Hirosue A., Nagata M., Tanaka T., Kawahara K., Sakata J., Arita H., Nakashima H., Shinriki S., Fukuma D., Ogi H., Hiraki A., Shinohara M., Toya R. and Murakami R.

IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma.

Br J Cancer. 115(10), 1234-1244 (2016)

査読有り

doi: 10.1038/bjc.2016.327.

[学会発表](計 4 件)

Hikaru Nakashima, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirosue, Kenta Kawahara, Jyunki Sakata, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara and Hideki Nakayama

Investigation of the clinical significance of circulating miRNA-1290 in oral squamous cell carcinoma

第 30 回 台湾口腔顎顔面外科学会年次総会、2017 年 3 月 4-5 日

台北市国際会議中心、台湾、ポスター、優秀ポスター賞

Investigation of the clinical significance of circulating miRNA-1290 in oral squamous cell carcinoma.

Hikaru Nakashima, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirosue, Kenta Kawahara, Jyunki Sakata, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki and Hideki Nakayama
第 75 回日本癌学会学術大会、2016 年 10 月 6-8 日

パシフィコ横浜、神奈川、ポスター

Tumor-suppressive microRNA-X regulates cancer cell migration, invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma by targeting metastasis-related molecule.

Ryoji Yoshida, Junki Sakata, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Kenta Kawahara, Hikaru Nakashima, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara and Hideki Nakayama
第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016 年 8 月 10-12 日
広島大学 応仁会館、広島、ポスター

口腔扁平上皮癌患者における循環 miRNA の発現に関する臨床的検討

中嶋光, 吉田遼司, 廣末晃之, 有田英生, 坂田純基, 松岡祐一郎, 川原健太, 中川純泰, 永田将士, 中山秀樹

第 40 回日本頭頸部癌学会、2016 年 6 月 9-10 日

大宮ソニックシティ、埼玉、ポスター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 遼司 (YOSHIDA Ryoji)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：10632458

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

伊藤 隆明 (ITO Takaaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70168392

中山 秀樹 (NAKAYAMA Hideki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70381001

(4) 研究協力者

()