

令和元年5月27日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20602

研究課題名(和文) 口腔癌転移巣の微小環境を規定する新規マーカーの探索

研究課題名(英文) Search for novel marker for defining microenvironment of metastasis of oral cancer

研究代表者

栗原 都 (Kurihara, Mlyako)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：40453170

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)：申請者らは口腔癌の微小環境を規定する因子としてPAUFとZFAND4を見いだした。口腔癌においてPAUFの発現はリンパ節転移と予後不良に密接に関連していた。また口腔癌細胞の増殖・浸潤能とアポトーシス抵抗性の獲得に関連しており、さらに抗がん剤であるシスプラチンに対する耐性能の獲得にも関与することが明らかとなった。

一方でZFAND4の発現は口腔癌のリンパ節転移ならびに遠隔転移と関連していた。ZFAND4を高いレベルで発現する症例はそうでない症例と比較して有意に予後不良であり、多変量解析でZFAND4の発現レベルは独立した予後不良因子となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAUFとZFAND4の機能を抑制することでがんにとって好ましい微小環境を破壊できる可能性があり、口腔癌の診断・治療におけるあらたな分子標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found PAUF and ZFAND4 for defining microenvironment of oral cancer. PAUF expression was significantly associated with nodal metastasis and poor prognosis of oral cancer. PAUF was also involved in acquisition of proliferation and invasion ability and cisplatin resistance in oral cancer cells.

Furthermore, expression of ZFAND4 was strongly related to nodal and distant metastasis of oral cancer. Cases with high expression of ZFAND4 had a significantly unfavourable prognosis compared with patients with low expression of ZFAND4. Moreover, ZFAND4 overexpression was an independent poor prognostic factor for oral cancer as determined by multivariate analysis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 転移 微小環境

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

1. 研究開始当初の背景

がんの浸潤・転移には複雑な数多くのステップが必要である。近年、がん細胞と周囲の間質に存在する細胞との相互作用で形成される「微小環境」が、癌の浸潤・転移に重要な役割を担うことが明らかとなってきた。口腔癌の転移形式はリンパ行性転移が主であるが、転移先の頸部リンパ節に癌の生息に好ましい「微小環境」が形成されていると、よりリンパ節転移が成立しやすくなることは想像に難くない。しかしながら、口腔癌の微小環境を規定する key molecule はいまだに不明である。

2. 研究の目的

口腔癌の微小環境の成立を規定する新規分子マーカーおよび関連シグナルの詳細な機能解析を行い、口腔癌における新たな診断マーカーおよび治療標的としての有用性を模索することを目的としている。

3. 研究の方法

<パラフィン切片からの発現解析>

口腔癌患者の原発巣ならびにリンパ節転移巣のパラフィン切片や凍結材料を用い、新規バイオマーカーならびに関連シグナルの発現を免疫組織化学ないし in situ hybridization で解析し、臨床病理学的な意義を検討する。あわせてパラフィン切片から laser-capture microdissection により分離した癌細胞を用いて total RNA を抽出し、real-time RT-PCR による遺伝子発現解析を行う。

<変異解析>

次世代 sequencer による関連シグナルの変異解析を行う。癌細胞における変異やメチル化の有無等を解明することで、実際の治療ターゲットとなり得るかどうかの判別が可能と考える。また新規マーカーの発現調節機構を明らかにするために microRNA 解析による解析を行う。

<in vitro での検討>

microRNA アレイ、レポーターアッセイ：複数の口腔癌細胞株を siRNA にて遺伝子発現抑制後、microRNA アレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、コントロールと比較してそれぞれの処理で発現変化する microRNA 群をピックアップする。

microRNA 発現解析：口腔癌患者、および対照健常者のパラフィン切片を用い real-time RT-PCR により microRNA 発現レベルを測定し、臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析する。なお癌周囲の間質に発現している microRNA の影響を避けるため、laser-capture microdissection (LCM) により癌細胞のみを分離後に RNA を抽出する。

4. 研究成果

申請者らは口腔癌の微小環境を形成する可能性のある因子として PAUF を見いだした。PAUF は腺癌等において腫瘍促進性に作用することが知られているが、口腔癌における機能は明らかでない。口腔癌材料を用いた免疫組織化学において、PAUF の発現はリンパ節転移と予後不良に密接に関与していた。細胞株を用いた検討では、口腔癌細胞の増殖・浸潤能とアポトーシス抵抗性の獲得に関与しており、さらに抗がん剤であるシスプラチンに対する耐性能の獲得にも関わることが明らかとなった。PAUF は口腔癌における新たな分子標的となる可能性が期待される。

さらに NIPAL1 も微小環境にの成立に寄与することが明らかとなった。NIPAL1 の発現は癌の脈管内侵襲に関与することで予後不良に関与していた。口腔癌細胞を用いた検討では、NIPAL1 は口腔癌細胞の増殖ならびに口腔癌細胞と血管・リンパ管内皮細胞の相互作用を促進させることを見いだした。

また、網羅的遺伝子発現解析により、口腔癌の進展に関与する新規因子として zinc finger AN1-type containing 4 (ZFAND4) を見いだした。臨床検体を用いた免疫組織化学において、ZFAND4 は口腔癌細胞の細胞質に発現することでリンパ節転移ならびに遠隔転移を促進することが明らかとなった。さらに ZFAND4 を高いレベルで発現する症例はそうでない症例と比較して有意に予後不良であり、多変量解析で ZFAND4 の発現レベルは独立した予後不良因子となった。細胞株を用いた in vitro の検討では、ZFAND4 は種々の分子の発現や活性化を制御することで口腔癌細胞にとって好ましい微小環境をつくりだし、浸潤ならびに転移を促進することを見いだした。ZFAND4 の機能を抑えることで口腔癌細胞にとって好ましい微小環境を破壊できる可能性があり、診断・治療におけるあらたな分子標的となることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Nakamura H, Nakashima C, Kuniyasu H, Kirita T
Zinc finger AN1-type containing 4 is a novel marker for predicting metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. J Clin Pathol 71(5): 436-441, 2018
Sasahira T, Nishiguchi Y, Kurihara-Shimomura M, Nakashima C, Kuniyasu H, Kirita T

NIPA-like domain containing 1 is a novel tumor-promoting factor in oral squamous cell Carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 144(5): 875-882, 2018

Sasahira T, Kurihara M, Nishiguchi Y, Nakashima C, Kirita T, Kuniyasu H

Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor has oncogenic functions in oral squamous cell carcinoma. Histopathology 70(4):539-48, 2017

Sasahira T, Kurihara M, Nakashima C, Kirita T, Kuniyasu H

LEM domain containing 1 promotes oral squamous cell carcinoma invasion and endothelial Transmigration. Br J Cancer 115(1):52-8, 2016

Sasahira T, Kurihara M, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Kirita T, Kuniyasu H

NEDD 4 binding protein 2-like 1 promotes cancer cell invasion in oral squamous cell Carcinoma. Virchows Archiv 469(2):163-72, 2016

Sasahira T, Kirita T, Nishiguchi Y, Kurihara M, Nakashima C, Bosserhoff AK, Kuniyasu H,

A comprehensive expression analysis of the MIA gene family in malignancies: MIA gene family members are novel, useful markers of esophageal, lung, and cervical squamous cell carcinoma. Oncotarget 7(21): 31137-52, 2016

Sasahira T, Nishiguchi Y, Fuiwara R, Kurihara M, Kirita T, Bosserhoff AK, Kuniyasu H, Storkhead Box 2 and melanoma inhibitory activity promote oral squamous cell carcinoma Progression. Oncotarget 7(18):26751-64, 2016

〔学会発表〕(計 1 件)

中嶋千恵、栗原 都、山本一彦、パワー ル ウジャール、笹平智則、桐田忠昭、國安弘基

Malic enzyme 1 による口腔扁平上皮癌促進作用

第 76 回日本癌学会総会、2018

〔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 :

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 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：笹平智則

ローマ字氏名：Tomonori Sasahira

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。