

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11886

研究課題名（和文）口腔癌のCXCR4システムを介した転移機構における分泌型miRNAの役割

研究課題名（英文）Role of secretory miRNA on the metastasis of oral cancer via CXCR4 system

研究代表者

内田 大亮（Uchida, Daisuke）

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20335798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：SDF-1による発現上昇があった分泌型miRNAとして、miR-4701-3p、miR-503-3p、miR-134などが、発現低下があったmiRNAとして、miR-4785、miR-378e、miR-362-5pなどが抽出された。また、並行研究として、経口投与可能なCXCR4特異的阻害剤であるAMD070が、口腔癌細胞のin vitroでのSDF-1依存性の足場非依存性増殖、細胞遊走とin vivoでの肺転移を有意に抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の予後不良因子は転移である。われわれは、口腔癌の転移にSDF-1/CXCR4システムが関与していることを報告してきたが、血清レベルで本システムの関与を検出できれば、将来的にはliquid biopsyによる転移診断や治療効果判定、さらには予後判定を実施できる可能性がある。本研究では、CXCR4シグナルの下流に存在する分泌型miRNAを同定することができたため、今後転移診断の早期診断に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We identified the several secretory miRNAs, such as miR-4701-3p, miR-503-3p and miR-134, upregulated by SDF-1, and miR-4785, miR-378e and miR-362-5p, downregulated by SDF-1. We also demonstrated that AMD070, an orally bioactive CXCR4 specific inhibitor, inhibited the SDF-1 dependent anchorage-independent growth and migration of the oral cancer cells in vitro, and that significantly suppressed the lung metastasis of the cells in vivo.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 転移 exosome

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の予後不良因子は転移である。そのため、当研究室では口腔癌の転移機構に関する研究を行ってきた。その中で、ケモカインレセプターCXCR4を発現する口腔癌細胞が、転移先臓器の産生するリガンドstromal-cell derived factor (SDF)-1に引き寄せられながら転移すること (Exp Cell Res 290:289, 2003, Lab Invest 84:1538, 2004, Int J Oncol 25:65, 2004, Mol Cancer Res 5:685, 2007)、この転移が CXCR4阻害剤により抑制できることを明らかにした (Mol Cancer 8:62, 2009, Eur J Cancer 47:452, 2011, Clin Exp Metastasis 30:133, 2013)。現在のところ、SDF-1/CXCR4 システムは癌細胞の走化性亢進により転移を惹起すると考えられているが、本システムが浸潤・脈管内侵入・血管外遊出・異所性発育などの癌微小環境への影響を伴う転移をどのように制御するかは不明である。われわれは、その解明に本システムの下流に存在する標的分子の解析が重要であると考え、様々な癌の進展過程への関与が明らかにされたマイクロRNA (miRNA) を miRNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、SDF-1/CXCR4 システムによって誘導される転移関連候補 miRNA として miR-518c-5p を同定し、miR-518c の強制発現が口腔癌細胞の遊走と肺転移を促進することを明らかにした (PLoS One 9:e115936, 2014)。

近年、miRNA は癌細胞を含む種々の細胞から細胞外小胞体である exosome 内に取り込まれた状態で細胞外へ分泌され、血液や尿などの体液中で安定した状態で循環することが明らかにされた (J Cell Biol, 200:373, 2013)。さらに、癌細胞より放出される exosome はそれぞれの癌種、あるいは腫瘍の悪性度に特異的な miRNA を内包しており、癌微小環境に作用することで、癌の進展に関与することも明らかにされた (Cancer Metastasis Rev. 32:623, 2013)。miR-518c-5p が局在する miRNA クラスター (C19MC) は分泌型 miRNA を多く含むことから、癌微小環境への作用を期待したが、exosome 分画より抽出された内因性 miR-518c-5p の含有量は一般的な分泌型 miRNA より 2 オーダー低く、癌細胞への直接的作用が主体であることが示唆された (基盤研究 C、課題番号 26463046)。この結果は、細胞抽出物にて発現上昇があっても分泌型 miRNA として作用するとは限らず、分泌型 miRNA の同定には培養上清からのアプローチが必要であることを示唆している。実際、CXCR4 シグナルが恒常的活性化した口腔癌細胞の培養上清は血管内皮細胞の増殖と管腔形成を促進するが、その効果は CXCR4 阻害薬 AMD3100 によりブロックされる。CXCR4 シグナルの下流に存在する分泌型 miRNA を同定することができれば、癌微小環境への影響を明らかにするのみならず、将来的には liquid biopsy による転移診断や治療効果判定、さらには予後判定を実施できる可能性がある。

2. 研究の目的

そこで、本研究では CXCR4 シグナルの下流に存在する分泌型 miRNA を同定し、CXCR4 シグナルの癌微小環境への作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) SDF-1 処理後の CXCR4 高発現株と SDF-1 強制発現株の培養上清より miRNA (ex-miR) を抽出し、miRNA マイクロアレイによりコントロールと比較検討する。
- (2) 発現変動のあった miRNA より、既存の転移関連 miRNA と上位 5 個の miRNA を抽出し、定量性 PCR にて再確認する。
- (3) (2) で再現した miRNA の阻害剤を SDF-1 強制発現株に導入し、癌微小環境因子に与える影響を検討する。
- (4) 本実験と並行して CXCR4 特異的経口阻害剤 AMD070 の効果を in vitro, in vivo において検討する。
- (5) 本実験と並行して口腔癌細胞株で発現上昇のみられる miR-361-3p が口腔癌組織でも過剰発現しているか検討する。

4. 研究成果

(1) 平成 29 年度は CXCR4 高発現株である B88 をリガンド SDF-1 処理後、培養上清を回収し、exosome 中の miRNA (ex-miR) の抽出を試みた。exosome の回収を行うことはできたが、抽出した RNA の A260/280 比が 1.6 程度であり、miRNA アレイ解析に十分な RNA の品質を得ることができなかった。並行研究として、経口投与可能な CXCR4 特異的阻害剤である AMD070 が、口腔癌細胞に与える影響を検討した。その結果、AMD070 は口腔癌細胞の in vitro での SDF-

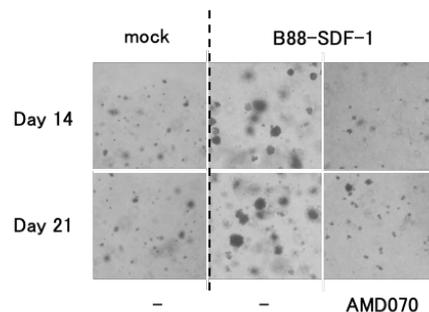


図1 AMD070による口腔癌細胞の足場非依存性増殖の抑制

1 依存性の足場非依存性増殖を抑制し (図1)、細胞遊走 (図2) とマウス転移モデルにおける肺転移 (図3) を有意に抑制した。

(2) 平成30年度は、抽出試薬を変更し、再度 ex-miR の抽出を試みたが、昨年同様抽出量が少なく、品質も前回と同程度のものしか得ることができなかった。また、愛媛大学への異動に伴い、他業務や実験のセットアップに時間を要し、実験が進行しなかった。なお、昨年度の研究結果が *Oncology Reports* に掲載された。

(3) 令和元年度は、試薬を Qiagen 社の exoRNeasy Serum/Plasma キットに変更し、再度抽出を試みたところ、miRNA 解析に使用可能な ex-miR の抽出に成功した。抽出した ex-miRNA を使用し、Agilent 社製 human miRNA マイクロアレイキット (V2) による miRNA マイクロアレイ解析を行った (図4)。その結果、SDF-1 による発現上昇があった miRNA として、miR-4701-3p、miR-503-3p、miR-134 などが、発現低下があった miRNA として、miR-4785、miR-378e、miR-362-5p などが抽出され、定量性 PCR でも同様の結果を得た。現在、これらの miRNA をノックダウンさせることで、SDF-1/CXCR4 システムの癌微小環境への確認実験を行っている。また、並行研究として、口腔癌細胞株で発現上昇のみられる miR-361-3p がすべての口腔癌組織において過剰発現していることを見出し (図5)、本研究結果は *Cancer Science* に受理された。

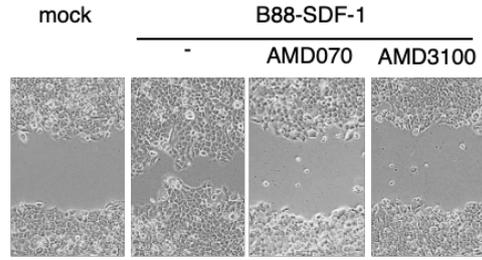


図2 AMD070による口腔癌細胞の細胞遊走能の抑制

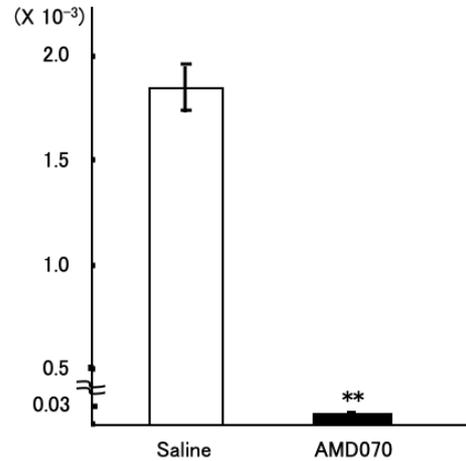


図3 AMD070による口腔癌細胞の肺転移の抑制

図4 培養上清中ex-miRNAに対するSDF-1/CXCR4システムの影響(miRNAマイクロアレイ)

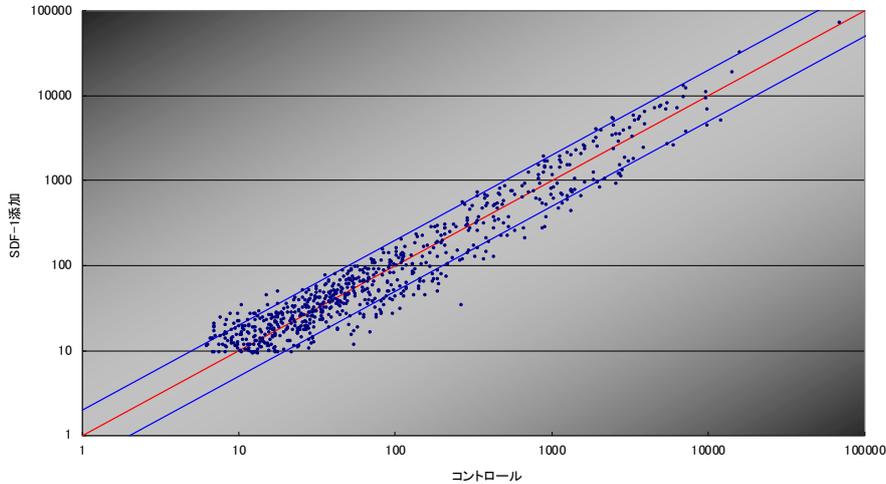
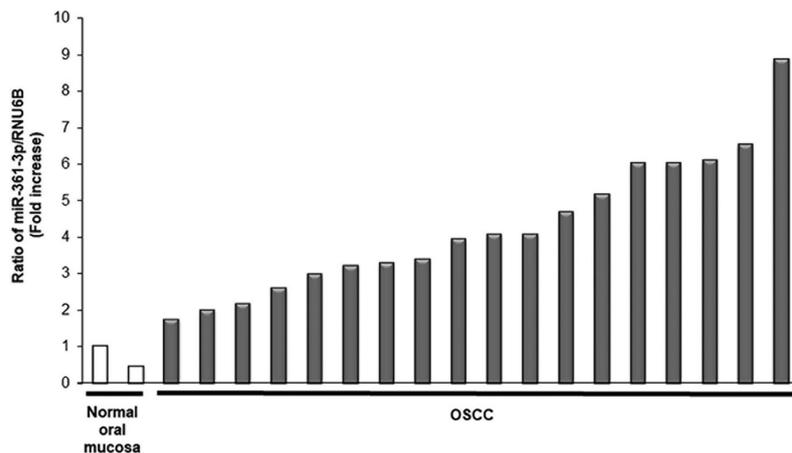


図5 口腔癌組織における miR-361-3p の過剰発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Daisuke Uchida, Nobuyuki Kuribayashi, Makoto Kinouchi, Yuta Sawatani, Michiko Shimura, Toshimitsu Mori, Tomonori Hasegawa, Youji Miyamoto, Hitoshi Kawamata	4. 巻 40
2. 論文標題 Effect of a novel orally bioavailable CXCR4 inhibitor, AMD070, on the metastasis of oral cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 303-308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2018.6400	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 Himiko Ogawa, Koh ichi Nakashiro, Norihiko Tokuzen, Nobuyuki Kuribayashi, Hiroyuki Goda, Daisuke Uchida	4. 巻 -
2. 論文標題 MicroRNA 361 3p is a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14359	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 内田大亮, 川又 均
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の発生母細胞を考える
3. 学会等名 第36回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Uchida, Hitoshi Kawamata
2. 発表標題 Consideration of the biological malignancy from originating cells in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida, Makoto Kinouchi, Sayaka Izumi, Kyoko Kuribayashi, Hitoshi Kawamata
2. 発表標題 Mechanism of transcriptional regulation of metabotropic glutamate receptor-5 induced by the CXCR4 signaling pathway
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makoto Kinouchi, Daisuke Uchida, Nobuyuki Kuribayashi, Yuske Komiyama, Shuji Tsuchida, Hitoshi Kawamata
2. 発表標題 MicroRNA-518c-5p promotes the metastasis of oral cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makoto Kinouchi, Daisuke Uchida, Nobuyuki Kuribayashi, Hitoshi Kawamata
2. 発表標題 Role of microRNA-518c-5p on the metastasis of oral cancer cells
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内田大亮、小宮山雄介、栗林伸行、土田修史、木内 誠、長谷川智則、澤谷祐大、志村美智子、和久井崇大、川又 均
2. 発表標題 骨髓由来幹細胞より扁平上皮癌が発生しうる
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 徳善紀彦, 中城公一, 栗林伸行, 合田啓之, 内田大亮
2. 発表標題 Detection of gene mutations from exosomal RNA in human oral squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihiro Tokuzen, Koh-ichi Nakashiro, Himiko Ogawa, Hiroyuki Goda, Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida
2. 発表標題 MicroRNA-361-3p is a potential therapeutic target for oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 7th WORLD CONGRESS of the International Academy of Oral Oncology (国際学会)
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
研究分担者	木内 誠 (Kinouchi Makoto) (00759483)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	削除：平成31年3月31日
研究分担者	川又 均 (Kawamata Hitoshi) (70224847)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	削除：平成31年4月1日
研究分担者	栗林 伸行 (Kuribayashi Nobuyuki) (80617332)	愛媛大学・医学系研究科・助教 (16301)	