

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17110

研究課題名(和文) 口腔癌幹細胞における形質獲得制御miRNAの探索

研究課題名(英文) Investigation of miRNAs for regulation of malignant transformation on OSCC stem cells

研究代表者

長崎 正寛 (Nagasaki, Masahiro)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：30782015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、口腔癌細胞のシスプラチン(CDDP)耐性に関与するmiRを同定し、同時にその役割を検討した。その結果、miR-629-3pは有意にCDDPへの耐性を示し、アポトーシスの抑制と細胞遊走の促進に関与していることが確認された。q-PCRとWestern Blotを用いた探索の結果、多くの遺伝子発現が抑制されることが示された。さらに、異種移植性モデルマウスにおいても、miR-629-3pはCDDPに耐性を獲得することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、miR-629-3pは口腔癌細胞においてCDDPの耐性獲得に関与し、アポトーシスの抑制と細胞遊走能の促進に関与していることが明らかとなった。さらに、本研究結果はCDDP耐性の克服に貢献するだけでなく、術後のQOLの改善にもつながることが期待される。したがって本研究結果は、口腔外科領域における癌治療の成績および患者の予後の飛躍的な向上に重要な役割を果たすことが可能と示唆される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed at identification of miRNAs on resistance of CDDP in OSCC cells, and the pathological roles of those. Subsequently, it is shown that miR-629-3p plays an important role not only on CDDP resistance, but also on repression of apoptosis and promotion of cell migration. The results of q-PCR and western blotting analysis show that this miRNA inhibits a number of gene expressions. Moreover, in a xenograft mouse experiment, miR-629-3p is shown to be involved in the acquired resistance of CDDP.

研究分野：口腔外科学

キーワード：エクソソーム miRNA 扁平上皮癌 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な癌種において、抗癌剤耐性と造腫瘍性がともに亢進している細胞集団の存在が明らかにされ、“癌幹細胞”として定義されている。またそのような細胞集団に特異的に発現している表面マーカーも多く同定されてきた。また、頭頸部癌においても、CD44の発現が亢進した癌幹細胞集団が存在することが既に報告されている。さらに現在では難治性癌の本態を理解するうえで、癌幹細胞集団を同定するだけでなくその形質獲得機構を解明することが重要な課題の1つとなりつつある。これまでに、乳癌細胞株において、癌の浸潤に関与することが知られているEMTが癌幹細胞集団(CD44+/CD24-)の形成が強く誘導することが報告され癌幹細胞形質の獲得機構の一端が明らかにされた。またmiRNAとよばれる約22塩基の非常に小さいnon-coding RNAが癌幹細胞においてニッチ環境による休止状態の維持・多分化能・自己複製などの癌幹細胞形質を維持・制御する因子であることが報告されている。しかしその一方で口腔扁平上皮癌においては、癌幹細胞の同定およびその形質獲得機構の解明は未だ十分に行われておらず、口腔癌治療の領域における大きな課題の1つとなっている。

これまでに申請者らのグループは口腔扁平上皮癌細胞株であるSAS細胞株を用いて、CDDP耐性の細胞株を樹立している。この細胞株においてEMTが誘導されているかどうかを検討するために、上皮系のマーカーの1つであるE-cadherinと間葉系のマーカーの1つであるVimentinの発現を解析した(図3)。イムノプロットングの結果から3.4 $\mu$ Mより高い濃度のCDDPに耐性を示すSAS-3.4細胞株においては、間葉系マーカーであるVimentinの発現が亢進し、上皮系マーカーのE-cadherinの発現が著しく低下していることが明らかとなった。これらの結果は、申請者らが樹立した細胞株においてはCDDP耐性の獲得に伴ってEMTが誘導されていることを示唆している。さらに申請者らはより高濃度の5.1 $\mu$ MのCDDPに耐性を示すSAS-5.1細胞ではEMTに伴い癌幹細胞マーカーの1つであるCD44のスプライシングパターンがvariant formからstandard formへと移行することも見出しており、このCD44 standard form(CD44s)陽性の細胞集団に癌幹細胞画分が含まれていると考えている。

## 2. 研究の目的

上記の様に申請者らは既に癌幹細胞形質を獲得した口腔扁平上皮癌細胞株を樹立しており、さらに、その形質獲得前後での比較が可能となっている。本研究ではこれらの細胞株を用いて癌幹細胞形質を制御するmiRNAを探索し形質獲得機構の解明を目指した。

すなわち、申請者らは以下の3点を研究期間内に明らかにする。

- 1) CDDP耐性を示し、かつEMT形質を示すSAS細胞から造腫瘍性が亢進している細胞集団を動物実験より単離し同定する。また、この実験からSAS-5.1の亜株も樹立する。
- 2) 親株のSAS細胞とSAS-5.1細胞さらには、上記1)で樹立したSAS-5.1亜株を用いて発現解析を行い、癌細胞画分に特異的に発現しているmiRNA群を同定する。
- 3) 2)で同定したmiRNAが抗癌剤耐性・EMT形質を誘導するか過剰発現とノックダウンの実験により検討する。

## 3. 研究の方法

癌幹細胞マーカーであるCD44sをSAS細胞に遺伝子導入したSAS/CD44s細胞を樹立し、マイクロアレイを用いてmiRの発現量を網羅的に解析した。得られた結果をもとに、SAS/CD44s細胞で発現量が有意に上昇しているmiRをSAS細胞にそれぞれトランスフェクションし、細胞生存率、アポトーシス、遊走能を分析し、さらにmiRの標的となる遺伝子を探索した。

#### 4 . 研究成果

まず我々は、口腔扁平上皮癌細胞の SAS 細胞に CD44s を遺伝子導入することで、SAS/CD44s 細胞を樹立した。これらの口腔癌細胞に対し、マイクロアレイを用いて miR の発現量を網羅的に解析した結果、それぞれで発現量の異なる miR を同定した。得られた結果をもとに、SAS/CD44s 細胞で発現量が有意に上昇している 14 種類の miR を SAS 細胞にそれぞれトランスフェクションし、細胞生存率、アポトーシス、遊走能を分析した。その結果、miR-629-3p は CDDP 耐性を獲得し、アポトーシスの抑制と細胞遊走の促進に関与していることが明らかとなった。また、miR-629-3p により発現が低下している遺伝子群と miR-629-3p の標的遺伝子予測プログラムを用いた *in silico* 比較解析により、34 遺伝子を miR-629-3p の標的候補として選抜した。さらに、定量的 PCR と Western Blot を用いて miR-629-3p の標的遺伝子を *in vitro* で探索した結果、多くの遺伝子発現が抑制されることが示唆された。また、異種移植性モデルマウスにおいても、miR-629-3p が SAS 細胞に CDDP 耐性能を獲得することが確認された。さらに、Kaplan-Meier 法を用いた生存時間分析によると、miR-629-3p の発現量の増加は、頭頸部癌患者の生存率低下と関連する傾向にあることが示された。SAS 細胞以外の口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3, HSC-4) においても同様に分析した結果、miR-629-3p は CDDP 耐性を獲得させ、アポトーシスの抑制と細胞遊走の促進に関与していることが明らかとなった。すなわち、本研究において、miR-629-3p の発現増加が頭頸部癌における CDDP 抵抗性に関わる分子メカニズムの一端であることを明らかとなった。

本研究の詳細な成果は、学術論文に投稿し、既に掲載されている (Chikuda J, Otsuka K, Shimomura I, Ito K, Miyazaki H, Takahashi RU, Nagasaki M, Mukudai Y, Ochiya T, Shimane T, Shirota T, Yamamoto Y. CD44s Induces miR-629-3p Expression in Association with Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer Cells. **Cancers (Basel)** E856. 2020)。

今後はさらなる標的遺伝子の分析と、新規腫瘍マーカー確立のため臨床検体での検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Chikuda Junichiro, Otsuka Kurataka, Shimomura Iwao, Ito Kagenori, Miyazaki Hiroaki, Takahashi Ryou-u, Nagasaki Masahiro, Mukudai Yoshiki, Ochiya Takahiro, Shimane Toshikazu, Shirota Tatsuo, Yamamoto Yusuke	4. 巻 12
2. 論文標題 CD44s Induces miR-629-3p Expression in Association with Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 856 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12040856	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0件

〔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
研究協力者	代田 達夫  (Shirota Tatsuo)		
研究協力者	嶋根 俊和  (Toshikiazu Shimane)		
研究協力者	棕代 義樹  (Mukudai Yoshiki)		
研究協力者	筑田 洵一郎  (Chikuda Junichiro)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	落谷 孝広  (Ochiya Takahiro)		
研究協力者	山本 雄介  (Yamamoto Yusuke)		