

令和元年6月20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17259

研究課題名(和文) CD82特異的miRNAを介した腺様嚢胞癌Dormancy Therapyの開発

研究課題名(英文) Development of Dormancy Therapy for adenoid cyst cancer through CD82-specific miRNA

研究代表者

千北 さとみ (Chigita, Satomi)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：10711179

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)：KAI1/CD82(CD82)の制御に関わるWntシグナル系上流で働くmiRNAに着目し、anti-oncomiRと考えられるmiR-203を腺様嚢胞癌細胞に導入させ、悪性形質の変化を解析した。腺様嚢胞癌由来のACCS(低悪性)、ACCS-M(高悪性、高転移性)細胞とそれらにmiR203 mimic及びmiR203 inhibitorの導入を行い、CD82が細胞増殖能と細胞浸潤能に影響を与え、また腺様嚢胞癌細胞のヌードマウス接種にて、miR203 mimic及びmiR203 inhibitor等が発現抑制に影響を与える可能性が示唆され、Drug delivery systemを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺悪性腫瘍の一つである腺様嚢胞癌は、強い局所浸潤能と遠隔転移能を有するが、発育が緩慢なものも多い。よって、担癌状態で比較的長期に生存する患者も少なくないが、やはり現在の所、その治療は外科的切除に頼るしかなく、他にエビデンスが確立された治療法は無い。これは、強い局所浸潤能や遠隔転移能を制御できれば10年、20年といった長期の生存の可能性を意味し、口腔癌の中ではそれが可能な唯一の癌腫であるとも言える。そこで本研究ではテトラスパニンCD82/KAI1(CD82)やその関連microRNA(miRNA)を用い、長期担癌生存、いわゆる『Dormancyを目指した腺様嚢胞癌治療の開発』を目的とした。

研究成果の概要(英文)：miR-203 thought to be anti-oncomiR regulates KAI1/CD82(CD82) through Wnt signaling pathway, and adenoid cystic carcinoma cells transfection with miR-203 mimics analyzed a change of the malignant character. We previously isolated the highly metastatic and tumorigenic ACC subline ACCS-M from nonmetastatic (0% incidence) and low tumorigenic (22.2% incidence) parental ACCS cells. ACCS-M exhibited high tumorigenicity (100% incidence), high frequency of spontaneous metastasis to submandibular lymph nodes (100% incidence). Transfection with miR-203 and miR-203 inhibitor to the ACCS and ACCS-M suggests controlling cellular proliferation and cellular infiltration ability. We examined clinical drug delivery system to apply the mechanism.

研究分野：口腔外科

キーワード：腺様嚢胞癌 miRNA

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

### 1. 研究開始当初の背景

癌治療において原発巣の制御と転移の有無は、極めて大きな予後因子である。そこには癌細胞の原発巣からの浸潤、血管内へ侵襲、遠隔臓器への着床、そして転移巣形成といった多段階のステップを経ることは言うまでもない。これまでの研究から研究代表者らは以下のことを明らかにしている。

#### (1) CD82 による Wnt シグナル経路を介した癌浸潤転移抑制メカニズムの解明

CD82 低発現細胞株であるヒト非小細胞性肺癌細胞株 h1299 を用い、CD82 遺伝子導入にて樹立した細胞株を用いその制御機構を明らかにした(CD82 inhibits canonical Wnt signalling by controlling the cellular distribution of  $\beta$ -catenin in carcinoma cells. Chigita S et al. International Journal of Oncology 41(6): 2021-8, 2012)。

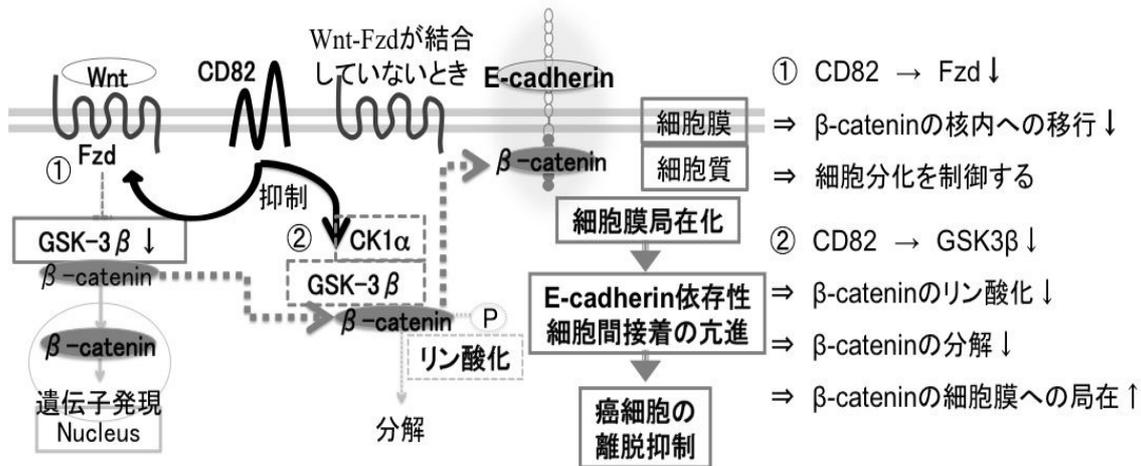
具体的には、CD82 が Fzd、CK1、GSK3 といった Wnt シグナル系因子を介して  $\beta$ -catenin のリン酸化と細胞膜への局在を促進し E-cadherin/ $\beta$ -catenin 複合体を安定化させ癌細胞同士の間細胞間接着を促進することを示した。

#### (2) CD82 遺伝子導入細胞から癌転移機構に関する microRNA(miRNA)の同定

さらに、明らかにした CD82 と Wnt シグナル伝達系に着目し、更に研究を進め、CD82 遺伝子導入 h1299 細胞にて Wnt シグナル系因子 Fzd2, 3, 5, 7, 9 に共通して関与する miRNA を同定した (miR-203 Inhibits Frizzled-2 Expression via CD82/KAI1 Expression in Human Lung Carcinoma Cells. Mine M, Chigita S, et al. PLoS One. 2015 10(7):e0131350.)。

具体的には前述した Wnt シグナル系因子の中の Fzd2 に着目し、miRanda アルゴリズムを用いて Fzd の配列から予測される miRNA を検索した。結果、11 配列の miRNA が候補に挙がり、中でも miR203 と miR338 に有意な発現変化が確認された。

唾液腺腫瘍細胞株は世界的に見ても少数であるが、我々の研究室では腺様嚢胞癌の親株 (ACCS) と、浸潤転移能が異なり 100% の他臓器転移能を持つよう in vivo selection された亜株 (ACCS-M) の樹立に成功している (Involvement of epithelial-mesenchymal transition in adenoid cystic carcinoma metastasis. Ishii K, Shimoda M, Sugiura T, Seki K, Takahashi M, Abe M, Matsuki R, Inoue Y, Shirasuna K. Int J Oncol. 38(4):921-31, 2011)。この両者を用いることで、バイアスの少ない比較実験が可能となる。



### 2. 研究の目的

(1), (2) の背景から腺様嚢胞癌細胞においても、特に miR203 は Fzd を介して Wnt シグナル系に関与し E-cadherin/ $\beta$ -catenin 複合体を安定化させ癌細胞同士の間細胞間接着を促進することが予想されると共に、当研究室で樹立した浸潤転移能の異なる腺様嚢胞癌細胞株 (ACCS, ACCS-M) を研究対象に用いることにより、Tumor Dormancy を目指した腺様嚢胞癌治療の開発の可能性を着想するに至った。

期間内にどこまで明らかにしようとするか

上記に示したとおり、miR203 が Wnt シグナル伝達系を介して癌の浸潤転移と CD82 発現の逆相関に関与することをこれまで明らかにしてきた。これらのことを腺様嚢胞癌細胞を応用し、in vitro 及び in vivo において証明することが最大の目的である。

期間内に、先に述べた ACCS, ACCS-M 細胞を用いて

1) in vitro における、miR203 mimic 及び miR203 inhibitor 導入後の CD82 の発現比較、増殖浸潤能の比較を行う。

続いて

2) in vivo において、ヌードマウスにそれぞれの細胞を接種 (tail vein および lateral flank) し、miR203 mimic 及び miR203 inhibitor 導入後の肺転移巣の比較、腫瘍の体積や重量や各種免疫染色、および生存期間の比較を行う。

### 3. 研究の方法

研究者は、癌細胞の浸潤転移抑制分子である CD82 の役割を一貫して研究し、癌の悪性形質に関与する様々な因子を特定してきた。本研究では、先に述べた中から、CD82 の制御に関わる Wnt シグナル系上流で働く miRNA に着目した。この中で anti-oncomiR と考えられる miR-203 を腺様嚢胞癌細胞に導入させ、悪性形質の変化を解析することを計画した。

研究の根幹は、大きく下の 2 つを検証することから組み立てた。

in vitro における miR-203 強制発現腺様嚢胞癌細胞の増殖、浸潤能への影響の確認。

in vivo での miR-203 delivery による腺様嚢胞癌細胞移植腫瘍の悪性形質変化や生存期間の確認。

### 4. 研究成果

【in vitro における miR-203 強制発現腺様嚢胞癌細胞の増殖、浸潤能への影響の確認】

miR203 mimic 及び miR203 inhibitor 等の遺伝子材料や細胞株は既に研究室にて所有しているものを使用した。腺様嚢胞癌細胞での悪性形質に与える影響を in vitro にて確認する必要があった。

1) 実験に用いる腺様嚢胞癌由来の ACCS(低悪性), ACCS-M(高悪性、高転移性)細胞の CD82 タンパク発現を Western blotting にて確認した(ベースとなる発現レベルの確認)。

2) 上記 2 つの細胞株に miR203 mimic 及び miR203 inhibitor の transfection を行い、細胞増殖能を MTT assay、細胞浸潤能はゼラチンをはじめとした各種基質を用いた Boyden chamber invasion assay にて変化を確認した。

【in vivo での miR203 delivery による腺様嚢胞癌細胞移植腫瘍の悪性形質変化や生存期間の確認】

腺様嚢胞癌細胞がヌードマウス接種にて腫瘍を作ることは分かっているが、発現抑制のための Drug delivery をどのように行うかを検討した。in vivo での核酸導入に特化された試薬(in vivo-jetPEI など)を用いて、1) 局所での増殖、浸潤は lateral flank への腫瘍細胞注入モデルで解析した。腫瘍細胞をヌードマウスの両側 lateral flank へ接種し腫瘍巣を形成した後、in vivo-jetPEI にて miR203 mimic 及び miR203 inhibitor 等を tail vein より注入した。腫瘍を摘出し、特に ACCS-M 細胞において、浸潤先端の浸潤様式確認や、形成腫瘍の体積や、重量の比較検討をコントロール群に対し行った。ここでは腫瘍の大きさを考え、各種免疫染色や western blotting よりも免疫染色を優先して行った。別の実験系で、生存曲線を作った。2) 転移巣における解析は、腺様嚢胞癌の肺転移傾向の多さに着目し、ACCS, ACCS-M 細胞を tail vein より注入した。肺転移巣を作った後、1)と同様に in vivo-jetPEI にて miR203 mimic 及び miR203 inhibitor 等の delivery を行い、インディアインクを摘出肺に気管より注入し、転移巣の数をはかることで評価すると共に、別の実験系で、生存曲線を作った。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 特記事項なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

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 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。