

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17281

研究課題名(和文) 良性組織迷入に着目した口腔癌後発頸部リンパ節転移の解明

研究課題名(英文) A study to reveal the mechanisms of delayed regional lymph node metastasis in oral cancer through the benign inclusions

研究代表者

丸山 哲昇 (Maruyama, Tessho)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・協力研究員

研究者番号：60751493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮がん(OSCC)症例の頸部リンパ節から探索した希少な良性組織迷入(BI)を試料としたマイクロRNA(miR)マイクロアレイ解析によりmiRを数種類選定した。あるmiR導入in vitro機能解析により、有意な結果が確認できた(未発表)。また、in vivo試験においてOSCC細胞口腔同所移植ならびに頸部リンパ節・肺転移マウスモデル作成の手技を確立できた。OSCC細胞株ではHSC-3-M3が最も適切と判断できたが、in vivoでのmiR投与方法の模索に難渋したため、in vitroでの成果をまず報告し、今後もin vivoでの研究を継続していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口の中にできる悪性腫瘍である口腔がんは、死亡率が高い疾患です。適切な治療にもかかわらず、がんが後になって再発・転移をしやすいためです。その再発・転移の機序を解明することが、将来の新たな治療に繋がり、口腔がんによる死亡率を減らすことが期待できます。本研究では、口腔がんが転移しやすい頸部リンパ節にみられる良性組織迷入に着目しました。その中に目立って認められたマイクロRNAという核酸が見つかりました。このマイクロRNAの更なる研究により、口腔がんの機序と治療のヒントを探索してゆきます。

研究成果の概要(英文)：Benign inclusions (BIs) are foci of non-neoplastic ectopic tissue that can be present in the regional lymph nodes of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). Several microRNAs (miRs) significantly expressed in BI have been found using the laser microdissection method and the miR microarray. Subsequently, it was discovered that certain miR potentially regulate OSCC cells in vitro. In in vivo tests on orthotopic nude mouse models of OSCC, lymph node and lung metastases were also found. Of the several OSCC cell lines, HSC-3-M3 is the most useful both in vitro and in vivo. However, the present challenge lies in how to inject the miR into the mice. I am ready to further this research hereafter.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔がん 扁平上皮癌 マイクロRNA マイクロアレイ 良性組織迷入 同所移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、世界全体で新たに発症する口腔がん(口唇がんを含む)者数は年間約 30 万人で、うち約 13 万人がこのがんにより死亡している。がんの術後、口腔内に再発が無いにもかかわらず、頸部リンパ節に遅れて出現する後発頸部リンパ節転移(後発転移)は、ほとんどの場合、術前には症状が無いため予測ができない。また、後発転移した患者の生命予後は悪く、最近では早期段階の小さい口腔がんに対しても切除と同時に予防的頸部郭清術を行う方が良好な予後が得られることが報告されている(Cruz et al. N Engl J Med 2015)。しかし、この郭清術は患者にとって侵襲が大きく機能障害をきたすため、精度の高い後発転移の予測・診断法の開発が、今日においても国内外で期待されている。

本研究で着目した良性組織迷入: Benign inclusions (BI) は、がんが原因とされ、その所属リンパ節に特異的にみられる稀な疾患である(Maiorano et al. Am J Surg Pathol 2003)。その発生機序は明らかになっていないが、がんの所属リンパ節郭清術において、同じリンパ節内で BI と転移がんの混在を示す報告は多い(Abrahamsen et al. Cancer 2004)。そのため、BI と後発転移との関連が強く示唆される。しかし、BI から転移がんが発生するのか、転移がんが制御され BI に変わるのか、もしくは転移がんが組織の細胞になんらかの影響を及ぼした結果なのか不明である。

申請者はこれまでに、転移がんとの鑑別に有用な病理学的診断法の構築を行い、BI の構成成分が、上皮系および間葉系細胞(扁平上皮、唾液腺・甲状腺・内皮系組織および母斑細胞など)の様々な細胞から成ることを明らかにした(Maruyama et al. IJCEP, 2016)。BI の発生には、細胞の「多分化能の獲得」や「上皮間葉転換(EMT)」の関わりが示唆されており(Manskikh VN et al. Biochemistry (Mosc) 2013)、BI は転移がん細胞が所属リンパ節へ移動し、何らかの因子が転移がん自身、あるいは周辺細胞に働いた結果として生じると考えられた。その何らかの因子とは頸部リンパ節転移を促進/抑制する働きと関係している可能性がある。

マイクロRNA(miR)はゲノムから転写され、20 から 25 塩基長程度の非翻訳1本鎖RNA からなる機能的核酸分子である。標的遺伝子の発現制御を行い様々な機能を果たし、がんの発生や進行・転移の促進/抑制にも関わっている。BI は稀な病態であることから、BI と術後の後発転移発症との関連を明らかにするためには、病理組織学的後ろ向き検索が有用である。そのため、本研究ではホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料でも正確な発現解析が可能な miR に注目した。

2. 研究の目的

本研究では、BI の miR の発現解析に焦点を絞り、

- (1) BI に高/低発現する miR を選定する。
 - (2) 選定した miR の細胞レベル (in vitro)での解析による miR の作用評価。
 - (3) 作用が確認できた miR において、動物レベル(in vivo)での miR 解析。
- 以上による、OSCC の後発転移機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

上記2.に対し、以下の方法を行った。

- (1) 新たに病理組織学的に診断しえた試料を含め、FFPE 試料に対しレーザーマイクロダイセクション法を用いて試料を回収し、得られた全 RNA の質的評価の上、miR マイクロアレイを行った。比較対象はヒト頸部リンパ節転移がんと比較した。BI に有意に高発現もしくは低発現する miR を多く検出できた。in silico 解析を行い、OSCC に対する作用が期待できそうな遺伝子を多く標的とする miR を選抜した。
- (2) in vitro で OSCC における効果が確認できた miR を対象に、in vivo での導入法を検討した。また、複数の OSCC 細胞株の口腔同所移植による OSCC 担がんマウスモデル、その頸部リンパ節転移マウスモデル、ならびに肺転移マウスモデルの作成とその手技構築を行った。

4. 研究成果

口腔がん症例の頸部リンパ節から探索した BI を試料としたレーザーマイクロダイセクション法ならびに miR マイクロアレイ解析により、数種類の miR を選定した。BI は希少疾患であり、アレイ解析結果の十分な validation サンプル探索が困難であったため、in vitro 解析には予定以上のアッセイを用いる必要があった。miR を導入/抑制する手法(リポフェクション法、エレクトロポーション法)、増殖能アッセイ(MTS assay, EdU assay)、遊走能アッセイ(引っ掻きアッセイ、Transwell を用いた解析)、浸潤能アッセイ(Transwell とマトリゲルを用いた解析)、アポトーシスアッセイ、ならびにフローサイトメトリー法を用いて、選定した miR が標的とする遺伝子について入念に in silico 解析を行い、それらの遺伝子をターゲットとしたウエスタンブロット法、siRNA によるノックダウン、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイならびに qPCR 法の手技を確立した。特にレポーターアッセイに関しては、プラスミドを構築するだけでなく、In-Fusion 法を用いた挿入および DNA シークエンシングでの配列確認を行い、プラスミドが問題なく構築できていることまでを確認できるようにした。また、いかなる遺伝子の予測 miR 結合部位を含む 3' UTR であっても同一のプロトコールでプラスミドを構築できるように手法を工夫した。選定 miR の導入/抑制による in vitro 解析を行ったところ、ある miR 導入において口腔がん細胞の制御が確認できた(未発表)。in vivo 試験においては免疫不全マウスの口腔に口腔がん細胞を移植することにより、頸部リンパ節転移および肺転移を起こすことが病理組織学的に診断でき、口腔同所移植モデルを確立することができた。複数の口腔がん細胞株を使用した移植試験において HSC-3-M3 が最も適切と判断できたが、アテロコラーゲンを用いた miR 投与の効果が期待できず、本邦で使用できるその他の投与方法の模索に難渋した。in vivo 試験の目標は、頸部リンパ節転移において投与した miR がどう影響するかを解明

することである。そのため、in vitro での成果をまず報告したうえで、今後も in vivo での研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Maruyama N, Okubo Y, Umikawa M, Matsuzaki A, Hokama A, Hirano F, Maruyama T*, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Quadruple multiple primary malignancies: early detection of second primary malignancy by esophagogastroduodenoscopy/colonoscopy is crucial for patients with classic Kaposi's sarcoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3390/diagnostics10040218	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 該当する
1. 著者名 Maruyama N, Sasaki T, Arasaki A, Matsuzaki A, Nakasone T, Teruya T, Matayoshi A, Maruyama T*, et al.	4. 巻 18
2. 論文標題 Thymoma appearing 9 years after resection of lip squamous cell carcinoma: a case report of triple primary tumors and literature review.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2777-2788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） : 10.3892/ol.2019.10675	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 該当する
1. 著者名 Maruyama N, Shimizu Y, Nakaema M, Nishihara K, Nakasone T, Matsumoto H, Kusada T, Nimura F, Matayoshi A, Maruyama T*, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Early computed tomography for detection of internal jugular vein thrombosis after neck dissection and/or reconstruction surgery for head and neck cancer patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical and Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 6258-6266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する
1. 著者名 Maruyama N, Nakasone T, Arakaki O, Matsumoto H, Maruyama T*, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Triple primary cancer of the head and neck, skin and prostate: A case report and literature review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 5249-5256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） : 10.3892/ol.2018.9294	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 該当する

1. 著者名 Maruyama N, Nishihara K, Nakasone T, Saio M, Maruyama T*, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Triple primary malignancies of surface osteosarcoma of jaw, myelodysplastic syndrome, and colorectal cancer as a second primary cancer detected by PET2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 9901-9907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) : 10.3892/ol.2018.8594	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 該当する

1. 著者名 Nimura F, Nakasone T, Matsumoto H, Maruyama T*, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Dedifferentiated liposarcoma of the oral floor: A case study and literature review of 50 cases of head and neck neoplasm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 7681-7688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) : 10.3892/ol.2018.8274	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 該当する

1. 著者名 Goto T, Nishihara K, Kataoka K, Goto S, Maruyama T, et al.	4. 巻 58
2. 論文標題 Outcomes of an International Volunteer Surgical Project for Patients with Cleft Lip and/or Cleft Palate: A Mission in Developing Laos.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 112-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) : 10.1111/cga.12255	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 該当する

1. 著者名 Maruyama T, Nishihara K, Umikawa M, Arasaki A, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 MicroRNA-196a-5p is a potential prognostic marker of delayed lymph node metastasis in early-stage tongue squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2349-2363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) : 10.3892/ol.2017.7562	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 該当する

1. 著者名 Maruyama T, Saio M, Arasaki A, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Sarcoidosis of mediastinal lymph nodes mimicking distant metastasis of oral squamous cell carcinoma: a case report and review of literature.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical and Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2698-2708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 仁村文和, 丸山哲昇, 他.	4. 巻 31
2. 論文標題 進行舌癌治療後に発症した治療関連骨髄異形成症候群の1例.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔腫瘍学会誌	6. 最初と最後の頁 91-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5843/jsot.31.91	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 -

1. 著者名 後藤新平, 仁村文和, 後藤尊広, 丸山哲昇, 他.	4. 巻 64
2. 論文標題 舌に発生した軟骨を伴う類皮嚢胞の1例.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 270-273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5794/jjoms.64.270	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山修幸, 丸山哲昇, 他.
2. 発表標題 舌癌細胞におけるmiR-196a-5pの機能解析
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山修幸、仲宗根敏幸、片岡恵一、河野俊広、喜名振一郎、喜名美香、仁村文和、又吉 亮、丸山哲昇、他.
2. 発表標題 沖縄県における口腔がんの現状
3. 学会等名 沖縄県歯科医学会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----