

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09773

研究課題名（和文）口腔癌擦過細胞のマイクロRNA解析による後発頸部リンパ節転移予測マーカーの確立

研究課題名（英文）Revealing the prognostic marker microRNA of delayed regional lymph node metastasis in oral cancer via the oral brush biopsy system

研究代表者

新崎 章 (Arasaki, Akira)

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：00175960

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮がん(OSCC)にかかわる可能性のあるマイクロRNA(miR)とその標的遺伝子を報告した。近年、*in silico*解析を中心とした研究報告は増加しており、*in vitro*解析、*in vivo*解析による十分な確認により、新たな知見が得られることは明確である。今後も研究を入念に計画し、一つずつ形にしてゆきたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんは、適切に治療しても、後になって再発・転移をしやすいため、死亡率の高いがんといわれます。その再発・転移の機序を解明することが、診断・治療の発展につながり、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、口腔がんに関係するマイクロRNAという核酸を対象としています。このマイクロRNAの更なる研究により、口腔がんの制御のヒントを探索してゆきます。

研究成果の概要（英文）：Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common malignancies with a high mortality rate. Delayed regional lymph node metastasis is the reason for the high mortality rate of OSCC. To evaluate the mechanism of OSCC, we analyzed human oral epithelium cells and *in vitro* cell lines and subsequently published an article on OSCC-related microRNA and the target gene.

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 brush biopsy

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

口腔がんの世界の年間発生者数は 275,000 名である(Sinevici et al. Oral Oncol., 2016)。その発症数と死亡者数は年々増加しており、死亡の多くは転移が原因である(Siegel et al. CA Cancer J Clin., 2016)。特に後発頸部リンパ節転移(DLNM) は臨床的に症状が見られず、がんの治療後に遅れて出現するため、術前の臨床的診断が難しい(Luksic et al. Head Neck., 2017)。その関連因子と予測マーカーの研究報告は多いが、これまで臨床に広く応用されているものは無い。miR-196a-5p は、申請者らが DLNM の予測マーカー候補として見出したマイクロ RNA (miR) である(Maruyama et al. Oncol Lett., 2018)。miR は 18 から 25 塩基長の機能性核酸分子で、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/抑制に関わるとされる。申請者らは口腔がんの中でも頻度の高い、小さい段階の早期舌扁平上皮がん(SCC) に対象を絞り、同 miR が癌組織に高発現する症例には、DLNM が有意に多く発症することを見出し、miR-196-5p が DLNM に関連していることを明らかにした。同 miR はすでに頭頸部領域のがんの頸部転移への影響が報告されており、がん転移研究の対象として信頼できる。そこでその次段階として、本研究では同 miR と標的遺伝子の、転移予測マーカーとしての可能性を評価したいと考えた。

口腔細胞擦過(Brush biopsy: BB) は歴史の古い診断手技だが、近年、発現解析の手段として注目され始め、その精度が評価されている(Adami et al. Oral Oncol., 2017; Zhou et al. Cancer Med., 2017)。BB はレーザーマイクロダイセクションと同様に純粋な上皮細胞のみを回収できる共通の利点があるにもかかわらず、当初、口腔がん細胞の遺伝子解析を目的とした BB のプロトコールは確立されていなかった。そこで、もし生命予後に大きくかわる DLNM の予測診断が、非侵襲的で術前に行える BB により可能になり、医薬治療が miR-196a-5p ならびに標的遺伝子機能の制御により可能になれば、患者負担を軽減できる一方、リスクの高い群への予防的補足治療の確立、口腔がん患者の QOL 向上と生命予後の改善に繋がると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、miR-196a-5p と関連遺伝子の発現ならびに機能解析に焦点を絞り、

- (1) BB による口腔擦過細胞を用いた遺伝子発現解析法の確立。
 - (2) miR-196a-5p の DLNM 制御機構の解明: miR-196a-5p 標的遺伝子の選抜。
 - (3) 口腔擦過細胞を用いた口腔がん遺伝子発現診断法の確立。
- 以上による、口腔がん術後にみられる DLNM の機序解明ならびに新診断法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

下記4. に記す。

4. 研究成果

本研究の目的は、口腔がん術後にみられる DLNM の機序解明ならびに新診断法の確立であった。機序解明にあたり、細胞レベル(in vitro)において、口腔 SCC を促進もしくは抑制する miR の評価ならびに、miR 標的遺伝子の選定が重要課題であった。

まず、ヒト試料を用いた解析を行った。BB の要領で回収したヒト口腔擦過細胞を用いて、発現解析を行ったところ、ウェスタンブロット法での miR 標的遺伝子解析よりも、miR-196a-5p の qPCR 解析が新規診断法として適切と思われた(論文未発表)。しかし miR-196a-5p の標的遺伝子は既に多く報告されていたため、新規標的遺伝子の検索に難渋した。そこで、口腔がん DLNM の関連 miR を更に検索すべく、複数のヒト舌 SCC 細胞株を対象とした miR マイクロアレイ解析を行った。その結果をもとに関連文献検索・通読、ならびに in silico 解析を行うことで、miR-196a-5p 以上に有意な発現を示し、新規性のある miR を選定することができた。続いて、in silico 解析の信頼性を in vitro 解析で確認すべく、導入試験を行った。プラスミド構築、ルシフェラーゼレポーターアッセイなど、高度な技術を用いた同研究により、LNM などの転移能への関連が示唆される miR ならびにその標的遺伝子を報告することができた(業績欄参照)。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できていたが、アテロコラーゲンを用いた miR 投与の効果が期待できておらず、本邦で使用できるその他の投与方法の模索に難渋した。

近年、in silico 解析を中心とした研究報告は増加しており、in vitro 解析、in vivo 解析による

十分な確認により、新たな知見が得られることは明確である。今後も研究を入念に計画し、一つずつ形にしてゆきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件/うち国際共著 11件/うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 MARUYAMA NOBUYUKI, UMIKAWA MASATO, MATSUMOTO HIROFUMI, MARUYAMA TESSHO, NISHIHARA KAZUHIDE, NAKASONE TOSHIYUKI, MATAYOSHI AKIRA, GOTO TAKAHIRO, HIRANO FUSAHIRO, ARASAKI AKIRA, NAKAMURA HIROYUKI, MATSUZAKI GORO, TAKAESU GIICHI	4. 巻 40
2. 論文標題 miR-935 Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma and Targets Inositol Polyphosphate-4-phosphatase Type 1A (INPP4A)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6101 ~ 6113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14631	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 Nobuyuki, Okubo Yuko, Umikawa Masato, Matsuzaki Akiko, Hokama Akira, Hirano Fusahiro, Maruyama Tessho, Nishihara Kazuhide, Nakasone Toshiyuki, Makishi Shoko, Nakamura Hiroyuki, Yoshimi Naoki	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 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 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 Kataoka Keiichi, Fujita Hironori, Isa Mutsumi, Gotoh Shimpei, Arasaki Akira, Ishida Hajime, Kimura Ryosuke	4. 巻 11
2. 論文標題 The human EDAR 370V/A polymorphism affects tooth root morphology potentially through the modification of a reaction-diffusion system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84653-4	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 Somphone Phanthavong, Daisuke Nonaka, Thongsavanh Phonaphone, Kyoko Kanda, Phouphachanh Sombouaphan, Norie Wake, Sangvane Sayavong, Toshiyuki Nakasone, Khampe Phongsavath, Akira Arasaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Oral health behavior of children and guardians' beliefs about children's dental caries in Vientiane, Lao People's Democratic Republic (Lao PDR)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211257	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 Nobuyuki, Sasaki Takano, Arasaki Akira, Matsuzaki Akiko, Nakasone Toshiyuki, Teruya Takao, Matayoshi Akira, Maruyama Tessho, Karube Kennosuke, Fujita Jiro, Yoshimi Naoki, Kuniyoshi Yukio, Nishihara Kazuhide	4. 巻 3
2. 論文標題 Thymoma appearing 9 years after the resection of squamous cell carcinoma of the lip: 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, Yoshimi N, Arasaki A.	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 Ayumi Tamanaha-Nakasone, Karina Uehara, Yasuka Tanabe, Haruna Ishikawa, Natsuko Yamakawa, Zensei Toyoda, Kiyoto Kurima, Shinichiro Kina, Masayuki Tsuneki, Yuko Okubo, Sayaka Yamaguchi, Daisuke Utsumi, Kenzo Takahashi, Hirofumi Arakawa, Akira Arasaki, Takao Kinjo.	4. 巻 9
2. 論文標題 K1 gene transformation activities in AIDS-related and classic type Kaposi's sarcoma: Correlation with clinical presentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 6416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42763-0	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 NAKASONE Toshiyuki, MATAYOSHI Akira, MURAHASHI Makoto, GOTO Shimpei, MARUYAMA Nobuyuki, ARASAKI Akira	4. 巻 65
2. 論文標題 A case of multiple bone metastases developing from clear cell odontogenic carcinoma of the mandible	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 780 ~ 785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5794/jjoms.65.780	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 Maruyama Nobuyuki, Nakasone Toshiyuki, Arakaki Osao, Matsumoto Hirofumi, Maruyama Tessho, Matayoshi Akira, Goto Takahiro, Saito Seiichi, Yoshimi Naoki, Arasaki Akira, Nishihara Kazuhide	4. 巻 4
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 Nobuyuki, Nishihara Kazuhide, Nakasone Toshiyuki, Saio Masanao, Maruyama Tessho, Tedokon Iori, Ohira Tetsuya, Nimura Fumikazu, Matayoshi Akira, Karube Ken-Nosuke, Yoshimi Naoki, Arasaki Akira	4. 巻 6
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: A case report	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 Kina Shinichiro, Nakasone Toshiyuki, Kinjo Takao, Nimura Fumikazu, Sunagawa Nao, Arasaki Akira	4. 巻 23
2. 論文標題 Outcomes after up-front surgery and metronomic neoadjuvant chemotherapy with S-1 or UFT for early tongue squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 2593 ~ 2598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-018-2689-2	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 仁村文和, 丸山哲昇, 村橋信, 丸山修幸, 新崎章.	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) 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 Kina Shinichiro, Kinjo Takao, Liang Feixin, Nakasone Toshiyuki, Yamamoto Hideyuki, Arasaki Akira	4. 巻 840
2. 論文標題 Targeting EphA4 abrogates intrinsic resistance to chemotherapy in well-differentiated cervical cancer cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 70~78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2018.09.031	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

〔学会発表〕 計1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, 仲宗根敏幸, 仁村文和, 又吉 亮, 新崎 章
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 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018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	海川 正人 (Umikawa Masato) (00325838)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (18001)	

6. 研究組織（つづき）

	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	丸山 哲昇 (Maruyama Tessho) (60751493)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・協力研究員 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関