

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17200

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の Np63 を介したEMTにおけるmiR-205の役割について

研究課題名(英文) A role of microRNA-205 associated with delta-Np63 in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

橋口 有真 (Hashiguchi, Yuma)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：80805268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、上皮間葉転換(EMT)が癌の浸潤・転移においても重要な役割を担うことが明らかとなっている。これまでにわれわれは、口腔扁平上皮癌(OSCC)において、Np63のスプライシングバリエントである Np63 がEMTの誘導に関与していることを明らかにしてきたが、その詳細なメカニズムは未だ不明であった。最近の知見において、そのメカニズムにマイクロRNA(miRNA)の関与が示唆されているため、われわれは中でもmiR-205に着目し、Np63の下流でEMTと関連するZEB1、ZEB2などの間葉系マーカーをターゲットとして発現を制御し、OSCCの浸潤・転移に関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は口腔扁平上皮癌における浸潤・転移の分子メカニズムの一部に Np63と関連してmicroRNA(miR-205)が関与している可能性を示した。癌の転移は生命予後を左右する重要な要素であり、口腔癌においても頸部リンパ節転移や他臓器への遠隔転移は予後に大きく関与し、やはりその制御は未だ十分ではない。本研究のように癌の浸潤・転移の分子メカニズムを部分的にでも明らかにしていくことにより、新たな標的として治療方法を確立することで、口腔癌の治療成績のさらなる向上へ役立てることが出来ると考えている。

研究成果の概要(英文)：Recently, epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the process of invasion and metastasis of cancer. We have shown that EMT is induced by Np63, a splicing variant of Np63, in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Furthermore, recent findings suggest that microRNA (miRNA) is involved in the molecular mechanism. We found that miR-205 plays an important role downstream of Np63 and regulates its expression by targeting mesenchymal markers such as ZEB1 and ZEB2, which are associated with EMT.

研究分野：口腔外科

キーワード：OSCC EMT microRNA miR-205 ZEB

1. 研究開始当初の背景

診断技術や手術手技の進歩により、近年の口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) に対する治療成績は向上してきているが、所属リンパ節である頸部リンパ節転移や肺などへの遠隔転移を伴う症例の生存率は依然として低いままである。つまり、頸部リンパ節転移および遠隔転移の制御が、OSCC 患者の生存率の向上に必要不可欠であることを意味している。そのため、転移の初期の段階に起こる癌細胞が組織へ浸潤するメカニズムを解明することは、OSCC 患者の生存率向上のためには極めて重要である。近年、癌の浸潤および転移には、上皮細胞が間葉系細胞のような形質を獲得する、いわゆる上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が関与していることが明らかとなってきた。本来、EMT は器官形成において必須の現象として広く知られており、EMT が誘導された上皮細胞は、線維芽細胞様の形態変化、上皮系マーカーの発現低下、間葉系マーカーの発現上昇、細胞接着の喪失、遊走能の亢進および増殖能の低下を示し、間葉系細胞様の形質を示すとされている。すなわち、癌細胞は進行の過程で EMT が誘導され、細胞間接着が喪失することにより原発巣から離脱し、遊走能が亢進することで間質への浸潤を容易にしているとされる。したがって、EMT の制御に関与している分子を明らかにすることは、癌の浸潤および転移の制御機構の解明につながり、癌の分子標的薬の開発や新たなバイオマーカーの確立に大きく貢献するものと推察される。

これまでに我々は、その分子の1つとして、癌抑制遺伝子 p53 のホモログの1つである Δ Np63 の、バリエーションの1つである Δ Np63 β が、EMT の誘導に関与していることを示してきた。しかし、その詳細な分子機構は不明であったが、最近の研究では、癌の EMT のプロセスに microRNA (miRNA) が関与している可能性が示されている (図1)。

そこで、本研究では、 Δ Np63 β を介した EMT に関与する miRNA を同定し、その miRNA に着目して研究を行った。

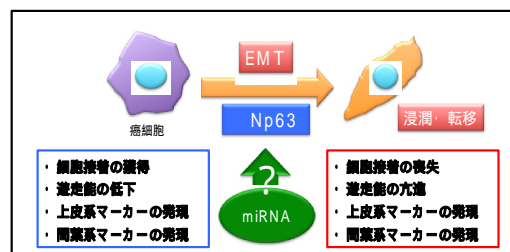


図1: EMT 形質を獲得した癌細胞の特徴

2. 研究の目的

癌治療における予後を大きく左右する癌の「浸潤・転移」の分子機構を解明することで、治療の標的として新たな治療薬の開発に役立てることを目的として行った研究である。また、その上で実際に核酸医薬として急速に研究が進められている miRNA に今回着目したことが本研究の特色である。miRNA は 20~23 塩基からなるタンパクをコードしない noncoding RNA であり、標的遺伝子の mRNA の 3'末端非翻訳領域に位置する、自身の持つ配列と相補的な配列部位に結合し、mRNA の翻訳の阻害や mRNA 自体の分解に関与することで、標的遺伝子の発現を制御していることがわかってきている。がんにおける miRNA 研究は非常に精力的に進められてきたが、OSCC における、特に Np63 に関連した miRNA の研究は未だ報告がなかった。また、 Δ Np63 を発現せず、EMT を獲得した細胞株と考えられる高転移株の SQUU-B 細胞は前研究室で樹立したもので (Morifuji M., et al.: Am. J. Pathol., 156(4):1317-1326, 2000) 本研究を遂行する上でも有利であった。本研究により、 Δ Np63 β と miRNA を介した浸潤・転移の分子機構が解明され、miRNA を用いた治療方法の開発が進行すれば、生命予後を悪化させる頸部リンパ節・遠隔転移の制御に大きく貢献できるものと思われ、新たな分子標的薬の開発やバイオマーカーの確立にもつながる有意義な研究であると考えている。

3. 研究の方法

本研究は以下の方法で研究を進めた。

1. Np63 過剰発現により生じる miRNA の発現変動を miRNA マイクロアレイを用いてプロファイリングし、OSCC における Np63 を介した浸潤・転移に關与する miRNA を同定する。
2. 目的となる miRNA を同定したのち in vitro における機能解析実験を行い、OSCC における浸潤・転移における影響を検討した。
3. ZEB1 および ZEB2 以外の miR-205 の標的遺伝子の発現を検索し、 Δ Np63 β を介した EMT における miR-205 の役割をさらに詳細に検討する。

4. 研究成果

1. miRNA マイクロアレイを用いたプロファイリング
 口腔扁平上皮癌細胞株において、 Δ Np63 を発現していない高転移株 SQUU-B 細胞に対して、 Δ Np63 β ベクターを導入した強制発現株 SQUU-BO 細胞と、コントロールとして空ベクターを導入した SQUU-BC 細胞の 2 つを用いて miRNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、最も発現変動幅が大きかった miRNA は miR-205 であった (図 2)。OSCC 細胞株の中での発現を比較したところ、Np63 の発現と同様の発現様式を示す傾向にあったため、miR-205 に着目しその後の研究を進めた (図 3)。

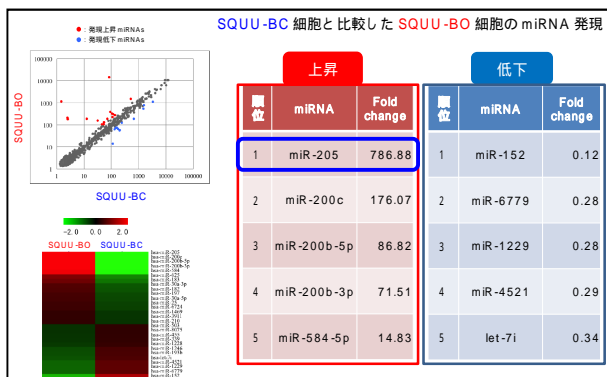


図 2 : miRNA マイクロアレイ解析結果

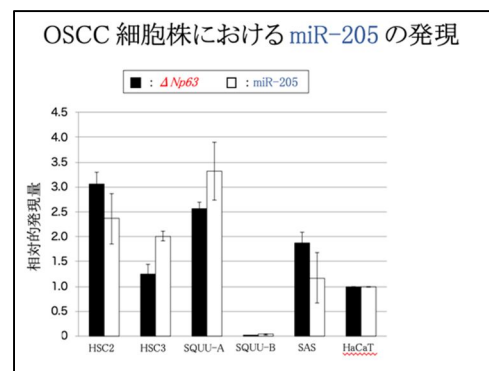


図 3 : OSCC 細胞株における miRNA の発現量

2. miR-205 の機能解析

miR-205 の標的となりうる遺伝子の中でも、今回は細胞接着分子である E-cadherin の発現を抑制することで EMT のプロセスに關与する遺伝子である ZEB1 および ZEB2 に着目した。miR-205 の発現量の高い細胞 (SQUU-A、SQUU-BO) と低い細胞 (SQUU-B、SQUU-BC) でそれぞれの発現量を比較してみると、ZEB1 および ZEB2 の発現は、mRNA レベル・タンパクレベルともに miR-205 の発現と逆相関していた (図 4)。また、miR-205 を発現していない SQUU-B 細胞に miR-205 の強制発現 (mimic) を行うと、ZEB1 と ZEB2 の発現低下と、E-cadherin を含む上皮系マーカーの発現亢進、間葉系マーカーの発現低下、遊走能および浸潤能の低下を認め、EMT 形質を失う傾向にあった (図 5、図 6)。また、miR-205 を高発現している細胞に miR-205 のノックダウンを行うと、これと逆の結果となった。

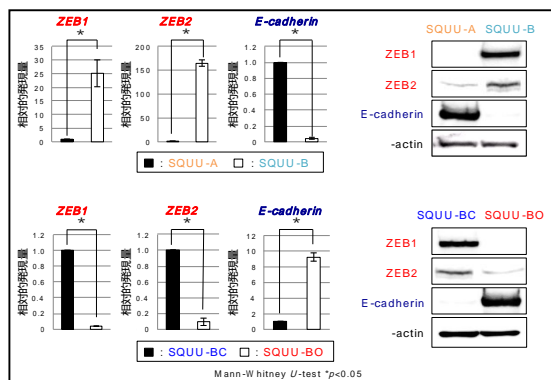


図4：miR-205とZEB1・ZEB2・E-cadherinの発現との関係

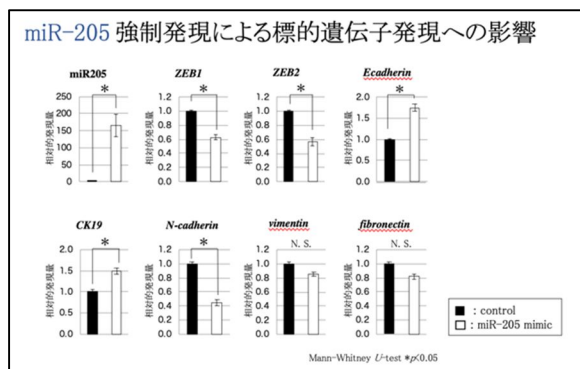


図5：miR-205強制発現による標的遺伝子発現への影響

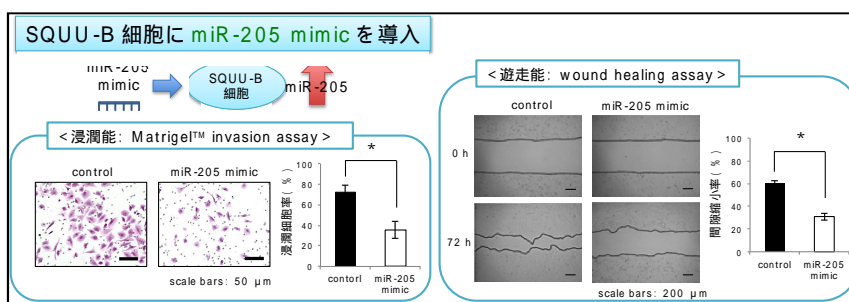


図6：miR-205強制発現がOSCC細胞の機能に与える影響

以上の結果は J Cell Physiol 誌に Tumor-suppressive roles of Np63-miR-205 axis in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma via targeting ZEB1 and ZEB2. として掲載された。(2018 Oct;233(10):6565-6577. doi: 10.1002/jcp.26267. Epub 2018 May 10.)

3. ZEB1 および ZEB2 以外の miR-205 の標的遺伝子の検索

専用のデータベースをもとに、塩基配列から算出したmiR-205の標的となりうる遺伝子は数百にのぼる(594遺伝子: TargetScan version7.2)。その中でも、塩基配列における相同性などからEMTに関連する遺伝子として、これまではZEB1およびZEB2に着目したが、これら以外にもEMTに関連する遺伝子をmiR-205が制御し、プロセスに関与している可能性がある。そのため、miRNAマイクロアレイと同様に、ΔNp63Bを強制発現させた細胞株(SQUU-BO細胞)とコントロール株(SQUU-BC細胞)を用いたDNAマイクロアレイ解析結果を統合し、標的遺伝子を検索した。その結果、Np63の強制発現に伴って発現が変動した遺伝子の中で、さきほどのmiR-205の標的となる遺伝子と合致したものは、ZEB1・ZEB2以外にもBMPERなど26の遺伝子がそれに該当することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hashiguchi Yuma, Kawano Shintaro, Goto Yuichi, Yasuda Kaori, Kaneko Naoki, Sakamoto Taiki, Matsubara Ryota, Jinno Teppei, Maruse Yasuyuki, Tanaka Hideaki, Morioka Masahiko, Hattori Taichi, Tanaka Shoichi, Kiyoshima Tamotsu, Nakamura Seiji	4. 巻 233
2. 論文標題 Tumor-suppressive roles of Np63 -miR-205 axis in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma via targeting ZEB1 and ZEB2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 6565 ~ 6577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.26267	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 Tanaka Shoichi, Kawano Shintaro, Hattori Taichi, Matsubara Ryota, Sakamoto Taiki, Hashiguchi Yuma, Kaneko Naoki, Mikami Yurie, Morioka Masahiko, Maruse Yasuyuki, Kitamura Ryoji, Hamada Eiki, Hiwatashi Megumi, Oobu Kazunari, Kiyoshima Tamotsu, Nakamura Seiji	4. 巻 32
2. 論文標題 Cytokeratin 19 as a biomarker of highly invasive oral squamous cell carcinoma with metastatic potential	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2019.10.007	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 Hattori T., Kawano S., Tanaka S., Matsubara R., Sakamoto T., Hashiguchi Y., Kaneko N., Mikami Y., Morioka M., Maruse Y., Kitamura R., Hamada E., Hiwatashi M., Oobu K., Kiyoshima T., Nakamura S.	4. 巻 50
2. 論文標題 Elevated expression of protease-activated receptor 1 via Np63 down-regulation contributes to nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 163 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijom.2020.04.021	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中翔一、川野真太郎、松原良太、坂本泰基、金子直樹、橋口有真、服部多市、大部一成、中村誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるKRT19の発現に関する研究～上皮-間葉転換における Np63との関わりについて～
3. 学会等名 第37回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 服部 多市・川野 真太郎・松原 良太・坂本 泰基・橋口 有真・金子 直樹・田中 翔一・大部 一成・中村 誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における Np63を介したkallikrein related peptidase (KLK) 5の発現と機能について
3. 学会等名 第73回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 服部 多市・川野 真太郎・金子 直樹・田中 翔一・坂本 泰基・橋口 有真・丸瀬 靖之・森岡 政彦・濱田 栄樹・中村 誠司
2. 発表標題 Np63を介した口腔扁平上皮癌の上皮間葉転換におけるprotease-activated receptor 1の関与
3. 学会等名 第64回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Shoichi Tanaka, Shintaro Kawano, Taichi Hattori, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Naoki Kaneko, Yurie Mikami, Masahiko Morioka, Yasuyuki Maruse, Ryoji Kitamura, Eiki Hamada, Megumi Hiwatashi, Kazunari Oobu, Tamotsu Kiyoshima, and Seiji Nakamura
2. 発表標題 Involvement of increased cytokeratin 19 expression via down-regulation of Np63 in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 7th World Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 田中翔一・川野真太郎・服部多市・坂本泰基・金子直樹・橋口有真・大部一成・中村誠司
2. 発表標題 cytokeratin 19の発現亢進が口腔扁平上皮癌の浸潤・遊走能に与える影響～ Np63との関わりについて～
3. 学会等名 第29回 日本口腔内科学会
4. 発表年 2019年～2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------