

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19204

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌におけるtRNAチオメチル化修飾を標的とした機能解析と治療法の開発

研究課題名（英文）Functional analysis and therapeutic development targeting tRNA methylthiolation in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

高橋 望 (Takahashi, Nozomu)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：60779172

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）：本研究では口腔扁平上皮癌（OSCC）においてミトコンドリアtRNA（mt-tRNA）のチオメチル化修飾（ms2修飾）が与える影響を解明することを目的とした。OSCC患者の臨床検体を用いた解析により、腫瘍部において周囲正常組織と比較して有意にms2修飾が増加していることがわかった。またOSCC細胞株SASにおいてms2修飾酵素であるCDK5RAP1の発現を抑制したところ、腫瘍増殖能の低下を認めた。さらに抗癌剤耐性細胞株において親株と比較して有意にms2修飾が増加していることがわかった。以上より、mt-tRNAのms2修飾はOSCCの悪性度、特に抗癌剤耐性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は世界的にみても主要な悪性腫瘍の一つでありその80%以上をOSCCが占めている。近年の診断・治療法の進歩にも関わらず、5年生存率に大きな改善はみられていない。その原因として、高転移能、治療抵抗性など腫瘍制御の障壁となる悪性形質をもつ腫瘍細胞が存在していることが挙げられる。tRNA修飾は、迅速かつ正確なタンパク質翻訳に寄与していることが示唆されており、近年様々な疾患との関連性が示唆されている。しかしながら、tRNA修飾とOSCCの発生・進展との関わりについては未解明なままであり、新たな知見を得ることは現在まで大きな改善を認めていない治療成績の向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the effect of methylthiolation (ms2 modification) of mitochondrial tRNA (mt-tRNA) in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Analysis using clinical specimens from OSCC patients revealed that ms2 modification was significantly increased in the tumor area compared to the surrounding normal tissue. In addition, when the expression of CDK5RAP1, which is ms2 modifying enzyme, was suppressed in the OSCC cell line SAS, the tumor growth ability decreased. Furthermore, it was found that the ms2 modification was significantly increased in the anticancer drug-resistant cell line as compared with the parent strain. From the above, it was suggested that ms2 modification of mt-tRNA may be involved in the malignancy of OSCC, especially anticancer drug resistance.

研究分野：歯科口腔外科学分野

キーワード：tRNA修飾 口腔扁平上皮癌 SAS 質量分析 抗癌剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は世界的にみても主要な悪性腫瘍の1つでありその80%以上を口腔扁平上皮癌(Oral Squamous cell carcinoma:OSCC)が占めている。近年の診断・治療法の進歩にも関わらず、数十年の間、5年生存率に大きな改善はみられていない(Siegel et al. CA Cancer J Clin 2012)。その原因として、高転移能、治療抵抗性など腫瘍制御の障壁となる悪性形質をもつ腫瘍細胞が存在していることが挙げられる(Hanahan & Weinberg. Cell 2011)。近年、そのような高悪性腫瘍細胞の生物学的特徴の理解が多面的に行われ、新たな知見が示されている。

Transfer RNA(tRNA)は73-93塩基の小さなRNAであり、34-36位の塩基はアンチコドンと呼ばれDNAから転写された messenger RNA(mRNA)のコドン配列を認識し結合させることで対応するアミノ酸を運搬し、タンパク質を生成する。tRNAは多彩な翻訳後修飾を受けることが明らかになっており、これまでに100種類以上の修飾がtRNAの塩基に見出されている(Machnicka et al. Nucleic Acids Res. 2013)。tRNA修飾は特にアンチコドン内及びその近傍に多く見られ、迅速かつ正確なタンパク質翻訳に寄与していることが示唆されている。中でもイオウを含む修飾は翻訳の質およびその下流の細胞機能に重要であり、同修飾の破綻が糖尿病やミトコンドリア病発症に関与することを申請者らは明らかとした(Wei et al. J. Clin. Invest. 2011, Wei, Takahashi et al. Cell Metab. 2015)。また、他領域ではあるが子宮頸癌細胞において一部のtRNA修飾と抗癌剤感受性との関連性の報告も認めている(Okamoto et al. PLOS Gen. 2014)。申請者は現在までにtRNA修飾の中でもチオメチル化( $ms^2$ )修飾の解析を行ってきた(Wei, Takahashi et al. Cell Metab. 2015, Takahashi et al. Nucleic Acids Res. 2017)。Cdk5 regulatory subunit-associated protein 1 (CDK5RAP1)はミトコンドリア tRNA(mt-tRNA)のうち、mt-tRNA<sup>Trp</sup>、mt-tRNA<sup>Phe</sup>、mt-tRNA<sup>Tyr</sup> および mt-tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>においてアンチコドン近傍の37位のアデニンをチオメチル化する酵素であることを見出し、同修飾の欠失によりミトコンドリア翻訳異常による機能低下を来し、ミトコンドリア病を発症することを申請者らは報告した(Wei, Takahashi et al. Cell Metab. 2015)。

### 2. 研究の目的

tRNA修飾と悪性腫瘍との関連については、未だにほとんどわかっていない。しかしながら、迅速かつ正確なタンパク質翻訳に寄与するというtRNA修飾の性質を考えると、悪性腫瘍にも影響を与えている可能性は十分に考えられる。tRNA修飾がOSCCの病態形成に与える影響を解明することは、従来と全く違うアプローチでOSCCと向き合うこととなり、新たな診断・治療法の創出をもたらすことにつながると考えられる。本研究を進めることにより、OSCCのみならず他領域の癌腫においても病態解明及び新規診断・治療法の開発の一翼を担うものに発展すると考えられる。

### 3. 研究の方法

OSCCにおけるmt-tRNAのチオメチル化修飾の臨床的意義の解明

申請者が行った予備実験において、質量分析装置を用いてOSCC患者より得られた臨床検体(腫瘍組織及び周囲正常組織)のmt-tRNAの $ms^2$ 修飾を測定したところ、大変興味深いことにOSCC腫瘍組織において周囲正常組織と比較して有意に修飾が増加していることがわかった(図1、2)。各患者の臨床データとmt-tRNAの $ms^2$ 修飾量との関連について統計学的に解析を行う。

mt-tRNAの $ms^2$ 修飾が癌細胞の性質に与える影響の解明

申請者らは現在までmt-tRNAの $ms^2$ 修飾が細胞内ATP産生やミトコンドリア機能、タンパク質翻訳などに影響を与えることを確認済みである(Wei, Takahashi et al. Cell Metab. 2015)そこでOSCCの細胞株を用いて修飾酵素のCDK5RAP1をノックダウンすることによって腫瘍形質や増殖能、転移能に変化が生じるかどうかを解析する。

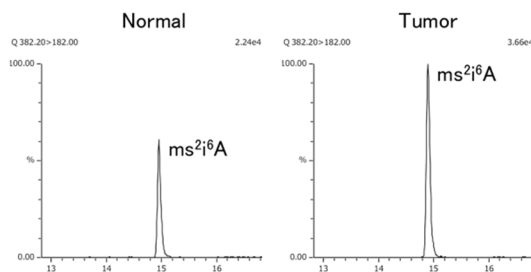


図1

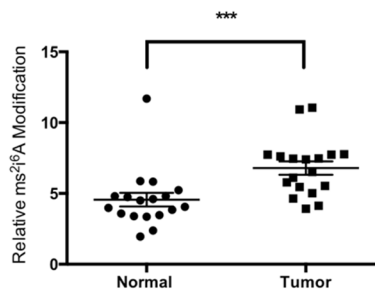


図2

#### 4. 研究成果

質量分析装置により得られた mt-tRNA の  $ms^2$  修飾量と患者ごとの臨床データを統計学的に解析したところ、T 分類 (図 3) stage 分類において有意な正の相関関係を認めた。また、有意差までは認めなかったが、リンパ節転移についても修飾量との関連が示唆された (図 4)。これらの結果は、mt-tRNA の  $ms^2$  修飾が OSCC の発生や進展に深く関与している可能性を示唆しており、tRNA 修飾が OSCC の病態形成に及ぼす影響を解明することは、新たな診断・治療法の創出をもたらすことにつながると考えられた。

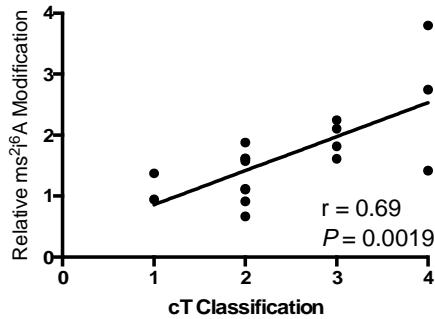


図 3

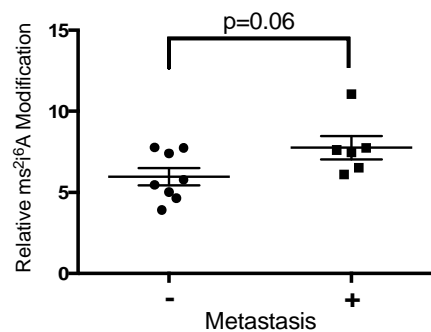


図 4

口腔癌細胞株 SAS を用いて、mt-tRNA の  $ms^2$  修飾酵素である CDK5RAP1 の抑制を行った。CDK5RAP1 の siRNA を形質導入したところ、CDK5RAP1 の mRNA 量の減少を認め、それに伴い  $ms^2$  修飾が有意に減少することが確認された (図 5、6)。さらに腫瘍の増殖能の低下が確認された (図 7)。

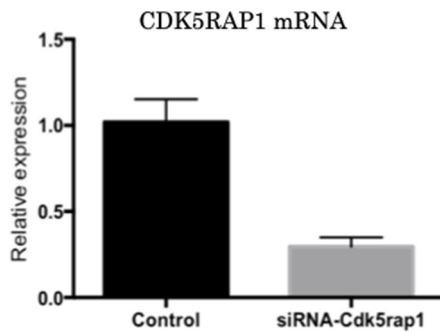


図 5

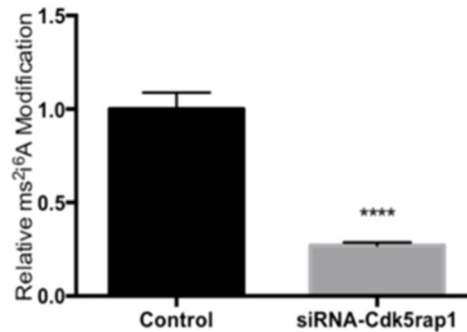


図 6

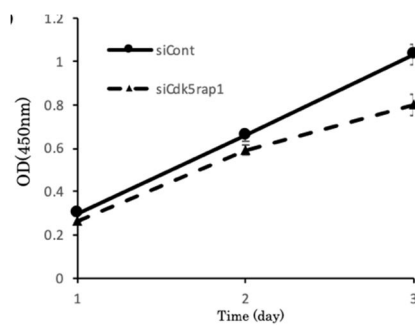


図 7

さらにミトコンドリア機能を調べるため、呼吸鎖複合体のタンパク量を調べたところ、CDK5RAP1 の抑制により、ミトコンドリア機能が障害を受けていることがわかった (図 8)。さらにアポトーシス関連タンパクの解析を行ったところ、リン酸化 JNK 及び caspase-3 の増加を認めた (図 9)。

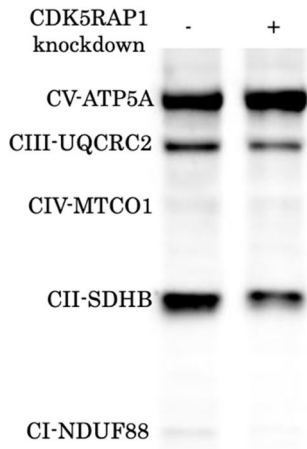


図 8

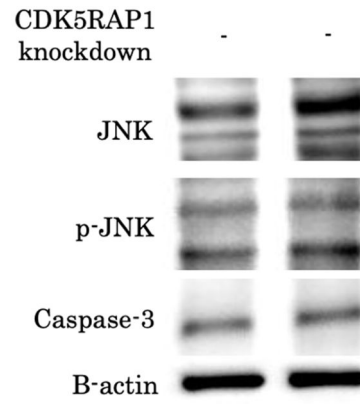


図 9

以上の結果より、mt-tRNA の  $ms^2$  修飾は OSCC における悪性度へ影響及ぼしている可能性が示唆され、 $ms^2$  修飾を制御することにより OSCC の予後改善に貢献できることが期待できると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakata Junki, Hirose Akiyuki, Yoshida Ryoji, Kawahara Kenta, Matsuoka Yuichiro, Yamamoto Tatsuro, Nakamoto Masafumi, Hirayama Masatoshi, Takahashi Nozomu, Nakamura Takuya, Arita Hidetaka, Nakashima Hikaru, Nagata Masashi, Hiraki Akimitsu, Shinohara Masanori, Nakayama Hideki	4. 巻 20(10)
2. 論文標題 HMGA2 Contributes to Distant Metastasis and Poor Prognosis by Promoting Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20102473	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 Mayumi Hirayama, Fan-YanWei, Takeshi Chujo, Shinya Oki, Maya Yakita, Daiki Kobayashi, Norie Araki, Nozomu Takahashi, Ryoji Yoshida, Hideki Nakayama, Kazuhito Tomizawa	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 FTO Demethylates Cyclin D1 mRNA and Controls Cell-Cycle Progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.028.	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 Yoshida R, Nagata M, Hirose A, Kawahara K, Nakamoto M, Hirayama M, Takahashi N, Matsuoka Y, Sakata J, Nakashima H, Arita H, Hiraki A, Shinohara M, Kikuchi K, Nakayama H.	4. 巻 15(4)
2. 論文標題 Efficacy of adjuvant chemotherapy with S-1 in stage II oral squamous cell carcinoma patients: A comparative study using the propensity score matching method.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0231656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231656.	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 Tatsuro Yamamoto, Akiyuki Hirose, Masafumi Nakamoto, Ryoji Yoshida, Junki Sakata, Yuichiro Matsuoka, Kenta Kawahara, Yuka Nagao, Masashi Nagata, Nozomu Takahashi, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara, Mitsuyoshi Nakao, Noriko Saitoh and Hideki Nakayama	4. 巻 123(4)
2. 論文標題 BRD4 promotes metastatic potential in oral squamous cell carcinoma through the epigenetic regulation of the MMP2 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 580-590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0907-6.	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 Nozomu Takahashi, Akimitsu Hiraki, Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Takuya Tanaka, Yuko Obayashi, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Hidetaka Arita, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Postoperative delirium in patients undergoing tumor resection with reconstructive surgery for oral cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2021.2222.	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋望、八木田麻耶、平山真弓、中山秀樹
2. 発表標題 ミトコンドリアtRNAのms2修飾は口腔扁平上皮癌の抗がん剤耐性獲得に寄与する
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

〔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
---------	---------