

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06435

研究課題名(和文) 犬口腔内扁平上皮癌の浸潤・転移に関わるエピジェネティクス機構

研究課題名(英文) The epigenetic mechanisms of the invasion and metastasis in canine oral squamous cell carcinoma

研究代表者

野口 俊助 (Noguchi, Shunsuke)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科・客員研究員

研究者番号：10701295

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)：犬口腔扁平上皮癌細胞組織および細胞株を用いて、浸潤や転移に深くかかわる上皮間葉転換のメカニズムの一端を解明した。上皮間葉転換を惹起するタンパク質であるSLUGやFascin1は口腔扁平上皮癌で高発現しており、これらのタンパク質が口腔扁平上皮癌の悪性化に関与していることが考えられた。また、SLUGを標的とするmiR-203とFascin1を標的とするmiR-145はともに口腔扁平上皮癌で発現低下しており、これらのmicroRNAの発現異常が上皮間葉転換の根底にあることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生が多いにもかかわらず治療が難しく、進行した場合には罹患犬の生活の質を大幅に低下させる口腔扁平上皮癌に対して、本研究で明らかとなった上皮間葉転換を抑制するmiRNAは治療標的となりうる。効果的なドラッグデリバリーシステムが開発できれば上皮間葉転換を標的とする核酸治療が可能となり、口腔扁平上皮癌の新たな治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：I partly validated the mechanisms of epithelial mesenchymal transition (EMT), which leads to cell invasion and metastasis, by using canine oral squamous cell carcinoma (SCC) tissues and cell lines. As a result, SLUG and Fascin1, which can induce EMT, were upregulated in canine oral SCC, suggesting that these proteins contribute to the progression of canine oral SCC. Also, miR-203 targeting SLUG and miR-145 targeting Fascin1 were downregulated in canine oral SCC. In conclusion, it was considered that these dysregulated miRNAs play a pivotal role for EMT of canine oral SCC cells.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌 上皮間葉転換 microRNA SLUG Fascin1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イヌの口腔内扁平上皮癌はメラノーマに次いで発生が多い口腔がんであり、歯肉など口腔粘膜から発生する非扁桃扁平上皮癌と扁桃に発生する扁桃扁平上皮癌に大きく分類される。前者は高度な浸潤性を示す一方転移率は比較的低いため、いかに局所制御するかが予後に大きくかわる。対して後者は転移能が高く、非扁桃扁平上皮癌と比較して予後が悪い。口腔内扁平上皮癌の治療は外科手術や放射線治療など主に局所コントロールに主眼を置いた治療法が現在の主流であるが、非扁桃扁平上皮癌に対しても進行した状態では十分な quality of life を維持することは難しく、扁桃扁平上皮癌に対しては有効な治療法が存在しないのが現状である。

ヒトの多くの癌種において、浸潤・転移メカニズムには上皮間葉転換が関与することが分かっている。上皮間葉転換は、SNAIL や SLUG といった間葉系転写因子の発現により上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得することで起こり、細胞の周囲組織への浸潤を可能にする。また、これとは別に細胞遊走に重要な働きを担う糸状仮足の形成に重要な Fascin1 も上皮細胞の浸潤に深く関与することが知られている。

しかしながら、イヌ扁平上皮癌においては浸潤や転移のメカニズムは解明されておらず、新たな治療戦略のためにはこれらの分子メカニズムの解明が必要である。

### 2. 研究の目的

非扁桃扁平上皮癌細胞の浸潤メカニズムと扁桃扁平上皮癌細胞の転移メカニズムを、上皮間葉転換とそれを制御する microRNA に着目して解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

イヌ口腔扁平上皮癌組織およびイヌ口腔扁平上皮癌細胞株からトータル RNA を抽出し、発現異常を示す microRNA を microRNA microarray とリアルタイム PCR により同定するとともに microRNA の標的遺伝子の mRNA 発現量もリアルタイム PCR で解析した。また、イヌ口腔扁平上皮癌のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて、上皮間葉転換に関連するタンパク質発現を免疫組織化学により検証した。

発現低下を示す一部の microRNA に対しては発現低下メカニズムを検証するため、Luciferase assay によるプロモーター領域の同定と CpG アイランドにおけるメチル化状態の検証のための bisulfite sequencing を行った。

さらに、イヌ口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、上記で発現を検証した microRNA やタンパク質の細胞遊走・浸潤に対する機能を、*in vitro* で検証した。具体的には、microRNA の mimic を lipofectamine を用いて培養細胞に導入し、形質の変化をウェスタンブロットティングや創傷治癒アッセイ、トランスウェルを用いた浸潤アッセイで検証した。また、microRNA の標的遺伝子をルシフェラーゼアッセイで同定し、その標的遺伝子に対しては siRNA を用いたノックダウンと発現ベクターを用いた強制発現による形質の変化を検証することで機能を解析した。

### 4. 研究成果

イヌ口腔扁平上皮癌組織において、間葉系転写因子である SLUG のタンパク質発現は正常口腔粘膜と比較して発現亢進しており、siRNA によるノックダウンやプラスミドベクターを用いた SLUG の強制発現による実験で SLUG はイヌ口腔扁平上皮癌細胞の遊走・浸潤に中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。(Vet Comp Oncol. 2022)。この成果は同誌の 2022~2023 年の top cited article に選ばれた。

microRNA 発現解析により、miR-145 がイヌ口腔扁平上皮癌において発現低下していることが明らかとなった。miR-145 の標的遺伝子として *Fascin1* に着目した。miR-145 と *Fascin1* の発現には逆相関がみられ、イヌ口腔扁平上皮癌組織では *Fascin1* の高発現がみられた。各種 *in vitro* 実験により、miR-145 は *Fascin1* の抑制を介してイヌ口腔扁平上皮癌細胞の遊走・浸潤を抑制していることが明らかとなった。さらに、miR-145 は DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine の培養液への添加により細胞内で発現が増加することと bisulfite sequencing によりメチル化シトシンが存在することから、miR-145 の発現低下メカニズムには、プロモーター領域のメチル化が関与していることも明らかとなった (Oral Dis. 2023)。

前述のように、イヌ口腔扁平上皮癌では SLUG が高発現していたことから、SLUG を標的とする microRNA を *in silico* で検索し、miR-203 に着目した。実際、ルシフェラーゼアッセイにより SLUG は miR-203 の標的遺伝子であることを確認した。miR-203 はイヌ口腔扁平上皮癌組織ならびに細胞株で発現低下していたが、miR-203 の培養細胞への導入では、扁桃扁平上皮癌細胞では

SLUG の発現低下がみられたが、非扁桃扁平上皮癌細胞においては SLUG の発現低下はみられなかった。さらに、細胞遊走・浸潤についても miR-203 は扁桃扁平上皮癌細胞では抑制したが、非扁桃扁平上皮癌細胞では明らかな抑制効果は示さなかった。これらのことから、miR-203 は扁桃扁平上皮癌細胞の転移メカニズムに関与している可能性が示唆された (Front Vet Sci. 2023)。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shunsuke Noguchi, Nanami Tanimoto, Ruisa Nishida, Asuka Matsui	4. 巻 29
2. 論文標題 Functional analysis of the miR 145/Fascin1 cascade in canine oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1495 ~ 1504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.14143	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 -

1. 著者名 Noguchi Shunsuke, Hirano Kazuya, Tanimoto Nanami, Shimada Terumasa, Akiyoshi Hideo	4. 巻 20
2. 論文標題 <scp>SLUG</scp> is upregulated and induces epithelial mesenchymal transition in canine oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 134 ~ 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/vco.12755	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 -

1. 著者名 Noguchi Shunsuke, Matsui Asuka	4. 巻 10
2. 論文標題 microRNA-203 inhibits migration and invasion of canine tonsillar squamous cell carcinoma cells by targeting SLUG	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	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） 10.3389/fvets.2023.1239224	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 岡本奈菜子、野口俊助
2. 発表標題 Metastatic mechanisms of canine tonsillar squamous cell carcinoma focusing on microRNA expression
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本七海、野口俊助
2. 発表標題 miR-145/FSCN1 cascade regulates EMT in canine oral squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 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
研究分担者	森 崇  (Mori Takashi)  (40402218)	岐阜大学・応用生物科学部・教授    (13701)	

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