

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10133

研究課題名(和文) 口腔がんにおけるRBPとmRNP granulesによるmRNA制御機構の解明

研究課題名(英文) The function of RNA binding proteins and messenger ribonucleoprotein granules in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

黒嶋 雄志 (Kuroshima, Takeshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00610669

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)：1. RNA結合タンパク質のひとつであるSam68について、口腔扁平上皮癌(OSCC)における機能解析を行なった。Sam68は、舌扁平上皮癌におけるVimentinの発現に関与してEMTを制御し、頸部リンパ節転移に寄与することを初めて見出した。2. シスプラチン感受性OSCC細胞株とシスプラチン抵抗性OSCC細胞株よりタンパク質を抽出し、プロテオーム解析を行なった。Ribonucleoprotein(RBP) granules構成タンパク質のうち、有意に発現変動を示す151種類のRBPを同定した。enrichment解析の結果、mRNAのプロセッシングやスプライシングとの深い関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 本研究の成果は、Sam68が口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移の新たな予測マーカーや、新規治療法の標的となる可能性を示している。
2. 本研究の結果は、口腔扁平上皮癌におけるシスプラチン抵抗性に関与するRNPおよびRNP granulesの機能解明の基盤となる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：1. We analyzed the biological function of Sam68, which is one of the RNA binding proteins (RBP), in oral squamous cell carcinoma. Results suggests that Sam68 may contribute to cervical lymph node metastasis due to the regulation of epithelial mesenchymal transition via modulating Vimentin expression. 2. Proteome analysis using cisplatin sensitive and resistant OSCC cells was performed. One hundred fifty-one RBPs were profiled in differentially expressed proteins between two groups. These RBPs were concentrated in the process of RNA processing and splicing in the enrichment analysis result.

研究分野：外科系歯学、病態科学系歯学

キーワード：口腔がん 扁平上皮癌 頸部リンパ節転移 Sam68 RNA結合タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌(OSCC)の重要な予後因子は頸部リンパ節転移である。潜在的な転移を見出す臨床病理学的因子やバイオマーカーの研究は世界中で行われているが、未だ決定的な因子は発見されていない。一方、局所進展した腫瘍の術後補助療法や切除不能な進行・再発がんの治療においては、抗がん剤が必須となる。OSCCの局所制御と予後における抗がん剤の果たす役割は大きく、抗がん剤抵抗性は患者の生命へ直結する問題であるが、実臨床におけるOSCCの抗がん剤抵抗性は未解決のままである。

RNA結合タンパク(RNA binding protein: RBP)は、常にmRNAと複合体(messenger ribonucleoprotein: mRNP)を形成し、mRNAの代謝を司って遺伝子発現を制御する。また、細胞がストレスに暴露されると多数のmRNPが凝集して細胞質内に顆粒状構造物(mRNP granules)が形成され、ストレスに応じたmRNAの保管や分解が行われる。申請者らは、RBP(HuR)によるmRNA代謝機構の破綻が発がんに寄与することを突き止め1、またRBP(HuR)がOSCC細胞の悪性形質に関与することを明らかにしてきた2-5。他の研究者によって複数のがんにおけるRBPの関与が解析され、mRNP granulesと転移やアポトーシスとの関連性が少数で報告6されているが、OSCCにおいてRBPを網羅的に解析し、さらにmRNP granulesを含めた多角的な解析は行われておらず、RBPとmRNP granulesがOSCCの転移能や抗がん剤抵抗性の獲得にどのように寄与しているかは、未解明である。

### 《参考文献》

1) Kuroshima T, Kitamura T, Higashino F et al. Oncogene. 2011, 2) Kakuguchi W, Kuroshima T et al. Mol Cancer Res. 2010. 3) Hasegawa H, Kuroshima T et al. Br J Cancer. 2009. 4) Habiba U, Kuroshima T, Kitamura T, Higashino F. et al. Exp Cell Res. 2018. 5) Jehung JP, Kitamura T, Kuroshima T, Higashino F et al. Biochem Biophys Res Commun. 2018.

## 2. 研究の目的

本課題の目的を、以下のように定めた。

目的1: OSCCの転移能・抗がん剤抵抗性に関与するRBPとmRNP granulesによるmRNA制御機構を解明する。

目的2: 目的1で解明した事象を標的とした、OSCCの転移能と抗がん剤抵抗性に対する新規診断技術の開発と、これらをOSCCから奪取する革新的治療法開発の基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

### 【転移能に関連するRBPの解析について】

当初の研究計画では、正常口腔細胞、口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞、抗がん剤(シスプラチン:CDDP)抵抗性OSCC細胞のプロテオーム解析を行い、OSCCの悪性形質に関わるRBPの候補を選定する計画であった。しかし、研究代表者が以前から着目していたRBPのひとつ、Sam68gの免疫組織化学染色(舌扁平上皮癌77例の手術標本を用いて実施)を行い、臨床病理学的データとの関連性を解析したところ、Sam68の高発現が頸部リンパ節転移と有意に関連していることが明らかとなった。そのため、転移能関連RBPに関する網羅的解析は行わず、Sam68の詳細な解析を行う計画に変更した。

- Sam68の免疫組織化学染色: 舌扁平上皮癌77例の手術標本を用いて行なった。Sam68の発現は核および細胞質に認められるため、それぞれの発現を点数化して評価した。ROC曲線を用いて低・高発現の閾値を設定し、高発現を定義した。
- Sam68の発現と臨床病理学的因子の関連性検討: 上記にてSam68の発現状況を調べ、これと臨床病理学的因子(年齢、性別、T分類、組織学的分化度、浸潤様式(YK分類)、脈管侵襲、神経周囲浸潤、病理学的頸部リンパ節転移の有無、再発の有無)との関連性を検討した(単変量解析・多変量解析)。
- OSCC細胞株におけるSam68の発現抑制がもたらす遺伝子発現変動の網羅的解析: OSCC細胞株・HO-1-N-1において、siRNA法でSam68をノックダウンした。RNAを抽出し、mRNA sequence法を実施し、control細胞との遺伝子発現の違いを、網羅的に比較検討した(発現変動遺伝子の抽出)。
- GO enrichment 解析: c)で抽出された発現変動遺伝子群を対象として実施した。The Metascape tool (<https://metascape.org/gp/index.htmls/main/step1>)を用いた。これにより、発現変動遺伝子がどのような生物学的プロセスに関与するかを検討した。
- Sam68がOSCC細胞の運動能に与える影響の検討: siRNA法によりSam68をノックダウンし、細胞運動能の変化を評価した(Wound healing assayおよびChamber migration assay)。
- 上皮間葉移行(EMT)に関連する遺伝子群の発現解析: d)のGO enrichment解析において、Sam68が関与する発現変動遺伝子が上皮間葉移行に関与する可能性が示唆された。また、

EMTの代表的間葉系マーカーであるVimentinがc)の解析により発現変動遺伝子として抽出されていた。EMTの代表的マーカーの発現状況をRT-qPCRで検証した。

- g) Vimentinの免疫組織化学染色：舌扁平上皮癌77例の手術標本を用いて実施した。Vimentinの発現様式とSam68の発現様式との関連性を検討した。

【抗がん剤（シスプラチン）抵抗性に関するRBPの解析について】

我々が以前に樹立したシスプラチン感受性OSCC細胞株とシスプラチン抵抗性OSCC細胞株よりタンパク質を抽出し、プロテオーム解析を行なった。これにより、それぞれの細胞において発現するタンパク質を網羅的に比較解析した。有意に発現が変動しているタンパク質を抽出し、これらのタンパク質の相互関係を、解析ソフト（KeyMolnet®）を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

【転移能に関連するRBPの解析について】

- 舌扁平上皮癌におけるSam68の高発現は、T分類、脈管侵襲、頸部リンパ節転移に有意に関連していた。特に、多変量解析の結果より、頸部リンパ節転移の独立した関連因子であることが示された。
- Sam68をノックダウンしたOSCC細胞株における遺伝子発現状況の変化をmRNA sequencing法により解析したところ、150の発現変動遺伝子が同定された。
- Gene Ontology解析の結果、Sam68のノックダウンにて発現が亢進した20の遺伝子群では、何らかの生物学的プロセスへの有意な関与は示されなかったが、発現が抑制された130の遺伝子群は、上皮間葉移行(EMT)に関与する生物学的プロセスに集中していることがわかった。
- EMTは癌が上皮系の特性を失って間葉系としての特性(運動能や浸潤能)を獲得するプロセスである。Sam68をノックダウンしたOSCC細胞での運動能を検討した結果、有意に運動能が低下した。
- EMTおよび運動能に関与することが知られているVimentinが、Sam68により特異的に制御されていることが示された。
- 舌扁平上皮癌の手術標本を用いてVimentinの免疫組織化学染色を行ったところ、VimentinとSam68の発現様相に関連性が示唆された。
- 以上より、RBPのひとつであるSam68は、舌扁平上皮癌におけるVimentinの発現に関与してEMTを制御し、ひいては頸部リンパ節転移に関連していることを初めて見出した。
- これらの結果は、Sam68が頸部リンパ節転移の新たな予測マーカーや治療標的となる可能性を示している。

【抗がん剤（シスプラチン）抵抗性に関するRBPの解析について】

- Unique peptideが2以上、発現変動が0.667以下または1.5以上、t-testで $p < 0.05$ を満たしたタンパク質を有意な発現変動と定義した。
- 抽出された発現変動タンパク質を対象として、上記の解析ソフトウェアを用いて、各タンパク質の相互関係を検索したところ、EMTやアポトーシス制御などの生物学的プロセスとの関与が示唆された。
- さらに、抽出された発現変動タンパク質から、RNP granules構成タンパク質のデータベースを照合してプロファイリングを行なった。これにより有意に発現変動を示す151種類のRBPが抽出された。enrichment解析の結果、mRNAのプロセッシングやスプライシングとの深い関与が示唆された。
- 抽出されたRBPのなかで、シスプラチン抵抗性における中心的な役割を担うRBPの特定とRNP granulesとしての機能解明には至らなかったため、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Komiyama Takuya, Kuroshima Takeshi, Sugasawa Takehito, Fujita Shin-Ichiro, Ikami Yuta, Hirai Hideaki, Tsushima Fumihiko, Michi Yasuyuki, Kayamori Kou, Higashino Fumihiro, Harada Hiroyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 High expression of Sam68 contributes to metastasis by regulating vimentin expression and a motile phenotype in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2022.8398	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 込山拓也、黒嶋雄志、原田浩之
2. 発表標題 舌扁平上皮癌におけるSam68の役割
3. 学会等名 第75回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 込山拓也、黒嶋雄志、栢森 高、原田浩之
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移におけるSam68の役割
3. 学会等名 第87回 口腔病学会学術大会
4. 発表年 2022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	東野 史裕  (Higashino Fumihiro)  (50301891)	北海道大学・歯学研究院・准教授    (10101)	
研究分担者	北村 哲也  (Kitamura Tetsuya)  (00451451)	北海道大学・医学研究院・客員研究員    (10101)	

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