

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592935

研究課題名(和文)新規MIA gene familyによる口腔癌の血管新生・リンパ管新生機構の解明

研究課題名(英文)The elucidation of angiogenic and lymphangiogenic mechanism of the oral cancer by novel MIA gene family

研究代表者

笹平 智則 (SASAHIRA, TOMONORI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90405374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは口腔扁平上皮癌のリンパ管新生・血管新生因子として melanoma inhibitory activity (MIA) を見出した。近年、新規MIA gene familyとしてMIA2、TANGOが同定され、これらは、大腸癌、肝細胞癌、悪性黒色腫等では、いずれも腫瘍抑制的に作用する因子である。しかしながら悪性腫瘍におけるMIA gene familyの詳細な役割と機能はいまだ不明である。我々は口腔扁平上皮癌におけるTANGOとMIA2の役割を詳細に検討した。その結果、MIA2、TANGOともに口腔扁平上皮癌では腫瘍促進的に作用することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We revealed that melanoma inhibitory activity (MIA) is newly angiogenic and lymphangiogenic factor in oral squamous cell carcinoma. More recently, MIA2 and TANGO genes were identified as novel MIA gene family. MIA2 and TANGO act as tumor suppressor gene in colorectal cancer, hepatocellular carcinoma, malignant melanoma, and so on. However, functional role of MIA gene family in malignancies are still unknown. We investigated more detailed functions of MIA2 and TANGO in oral squamous cell carcinoma. Our results suggested that MIA2 and TANGO have oncogenic function in oral cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔癌 MIA MIA2 TANGO

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、口腔癌における新規腫瘍血管新生・リンパ管新生マーカーとして MIA gene family を同定した。これらは腫瘍血管新生・リンパ管新生を誘導することで口腔癌の進展、リンパ節転移ならびに予後と密接に関係する。本研究は、申請者らが見出した口腔癌における新規血管新生・リンパ管新生マーカーを標的とした、新たな頭頸部癌治療の可能性を模索するものである。

### 2. 研究の目的

口腔癌においては核内 HMGB1-NFkB p65 転写因子複合体が MIA のプロモーター領域に結合することで VEGF-C/D を介したリンパ管新生・リンパ節転移を促進し、その際に MAPK p38 のリン酸化ならびに ERK1/2 の脱リン酸化が誘導されるが、その後の研究により VEGF-A を活性化することにより腫瘍血管新生も誘導することが明らかとなった。近年、新規 MIA gene family として MIA2、TANGO、OTOR が同定された。OTOR は蝸牛にのみ発現が限局されるが、MIA2、TANGO とともに大腸癌、悪性黒色腫において癌抑制的に作用する。しかしながら MIA2、TANGO、OTOR の 3 遺伝子とも MIA と 50%近い相同性を有しており、oncogene としての側面も期待される。今回、口腔癌における MIA gene family 関連シグナルを検索することにより、新たな口腔癌の分子標的診断・治療の可能性を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ・ マイクロアレイ、遺伝子解析

MIA2 ならびに TANGO の発現が確認済である口腔癌細胞株を用い、MIA2/TANGO siRNA 処理後、マイクロアレイならびに microRNA アレイによる網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、コントロールと比較してそれぞれの処理で発現変化される遺伝子群をピックアップし MIA2、TANGO 関連シグナルを明らかにする。さらにマイクロアレイより得られた知見をもとに、

随時遺伝子導入や遺伝子ノックダウンテクニックの手法を用いた *in vitro* での検討を加え対比することで、真の MIA gene 関連シグナルとその意義を解明する予定である。

- ・ microRNA 発現解析、レポーターアッセイ  
MIA2、TANGO と発現が逆相関し、microRNA の活性化処理により MIA2、TANGO の発現が下降し、さらにルシフェラーゼレポーターアッセイで MIA2、TANGO の 3' -UTR にダイレクトに結合するという 3 つの条件全てを満たしたものを、MIA2、TANGO 発現調節 microRNA として同定する。また real-time RT-PCR および *in situ* hybridization の手法により臨床検体を用いた microRNA 発現解析を行う
- ・ 免疫組織化学、real-time RT-PCR  
口腔癌患者、および対照健常者の臨床検体を用いた免疫組織化学、*in situ* hybridization、real-time RT-PCR により MIA2、TANGO の発現レベルを測定する。
- ・ 変異解析、メチレーション解析  
Direct sequence による MIA2、TANGO の変異解析、ならびにメチレーション解析による MIA gene 関連シグナルのメチル化の有無を確認する。  
能が抑制されるかを確認する。

### 4. 研究成果

メラノーマ、肝細胞癌、大腸癌、および口腔癌細胞株を用いて TANGO の発現を確認したところ、口腔癌細胞株において TANGO の高発現を認めた。口腔癌細胞株を TANGO siRNA 処理したところ増殖能、浸潤能が抑制され、アポトーシス誘導能の回復が確認された。また TANGO は口腔癌細胞株において PDGFB と Neuropilin2 を活性化させることが明らかとなった。さらに口腔癌細胞株と血管内皮細胞株である HUVEC ないしリンパ管内皮細胞株で

ある HLMVEC を共培養したところ、TANGO は内皮細胞株への遊走能と接着能を調節することが明らかとなった。凍結組織を用いた検討においてもメラノーマ、肝細胞癌、大腸癌と比較して口腔癌で TANGO の高発現を認めた。免疫組織化学的検討では、171 例中 34 例において口腔癌細胞の細胞質に TANGO の発現を認め、局所進展・ステージ進行症例、およびリンパ節転移症例ほど発現率が高かった。また TANGO 発現症例は非発現症例と比較して有意に予後不良であった。さらに TANGO は PDGFB や Neuropilin2 を活性化することで口腔癌の腫瘍血管新生・リンパ管新生を促進させることが明らかとなった。

一方、93 例の口腔癌材料を用いた免疫組織化学的な検討では局所進展症例およびリンパ節転移症例ほど MIA2 は高発現していた。また腫瘍におけるリンパ球浸潤を抑制することで腫瘍免疫を攪乱させる可能性が示唆された。細胞株による *in vitro* の検討では MIA2 は口腔癌の浸潤能の獲得とアポトーシス抵抗性に関与しており、口腔癌細胞株と T リンパ球細胞を共培養した系では MIA2 は癌細胞への T リンパ球の浸潤を調節することが明らかとなった。また MIA2 は MIA と相互作用することでそれぞれ MAPK p38 および ERK1/2 を介した VEGF-C ないし VEGF-D の活性化を制御していた。免疫沈降により integrin alpha4/5 が MIA2 の受容体の候補と考えられ、integrin alpha4 を介した場合は MAPK p38 の活性化によりアポトーシスが促進され、integrin alpha5 を介した場合は JNK の活性化によるアポトーシス抵抗性の獲得に関与することが明らかとなった。なお TANGO、MIA2 とともにメチル化や新たな遺伝子変異は確認されなかった。

さらにマイクロアレイにより MIA gene family は全く異なる下流シグナルを有していた。また MIA gene family の発現を調節するマイクロ RNA の候補や、MIA gene family

の新たな受容体も見出している。以上より新規 MIA gene family ならびに関連シグナルを標的とした口腔癌の診断・治療の可能性が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Bhawal UK, Sato F, Arakawa Y, Fujimoto K, Kawamoto T, Tanimoto K, Ito Y, Sasahira T, Sakurai T, Kobayashi M, Kashima I, Kijima H, Kuniyasu H, Abiko Y, Kato Y, Sato S; Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates cyclin D1. *J Pathol* 224(3): 420-429, 2011
2. Luo Y, Ohmori H, Shimomoto T, Fujii K, Sasahira T, Chihara Y, Kuniyasu H; Anti-Angiotensin and Hypoglycemic Treatments Suppress Liver Metastasis of Colon Cancer Cells. *Pathobiology* 78(5): 285-290, 2011
3. Ito Y, Bhawal UK, Sasahira T, Toyama T, Sato T, Matsuda D, Nishikiori H, Kobayashi M, Sugiyama M, Hamada N, Arakawa H, Kuniyasu H; Involvement of HMGB1 and RAGE in IL-1 -induced gingival inflammation. *Arch Oral Biol* 57(1): 73-80, 2012
4. Shimomoto T, Luo Y, Ohmori H, Chihara Y, Fujii K, Sasahira T, Denda A, Kuniyasu H; Advanced glycation end products (AGE) induce the receptor for AGE in the colonic mucosa of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet. *J Gastroenterol* 47(10): 1073-83, 2012
5. Shimomoto T, Ohmori H, Luo Y, Chihara Y, Denda A, Sasahira T, Tatsumoto N, Fujii K, Kuniyasu H; Diabetes-associated angiotensin activation enhances liver

metastasis of colon cancer. Clin Exp Metastasis 29(8): 915-25, 2012

6. Bhawal UK, Ito Y, Tanimoto K, Sato F, Fujimoto K, Kawamoto T, Sasahira T, Hamada N, Kuniyasu H, Arakawa H, Kato Y, Abiko Y; IL-1 -mediated up-regulation of DEC1 in human gingiva cells via the Akt pathway. J Cell Biochem 113(10): 3246-53, 2012

7. Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Ueda N, Shimomoto T, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H; Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer. Br J Cancer 107(4): 700-706, 2012

8. Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Bhawal UK, Kurihara M, Kirita T, Kuniyasu H; Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. Clin Exp Metastasis 30(2): 165-76, 2013

9. Sasahira T, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Ohmori H, Fujii K, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H; Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. Hum Pathol 44(6): 1098-106, 2013

10. Luo Y, Chihara Y, Fujimoto K, Sasahira T, Kuwada M, Fujiwara R, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H; High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. Eur J Cancer 49(3): 741-51, 2013

11. Kurihara M, Kirita T, Sasahira T, Ohmori H, Matsushima S, Yamamoto K, Bosserhoff AK, Kuniyasu H; Protumoral roles of melanoma inhibitory activity 2 in

oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer 108(7): 1460-9, 2013

12. Luo Y, Yoneda J, Ohmori H, Sasaki T, Shimbo K, Eto S, Kato Y, Miyano H, Kobayashi T, Sasahira T, Chihara Y, Kuniyasu H; Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. Cancer Res 74(1): 330-40, 2013

13. Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Kurihara M, Matsushima S, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H; Prox1 and FOXC2 act as regulators of lymphangiogenesis and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. PLoS One 9(3): e92534, 2014

14. Sasahira T, Kirita T, Kuniyasu H; Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. Int J Clin Oncol, in press

15. Sasahira T, Kirita T, Yamamoto K, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Bhawal UK, Bosserhoff AK, Kuniyasu H; TANGO is a novel tumor progressive factor in oral squamous cell carcinoma  
Eur J Cancer, in press

〔学会発表〕(計 34 件)

1. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、上田順宏、パワール・ウジャール、桐田忠昭、國安弘基. RUNX3 は唾液腺腫瘍の進展、発生に関与する. 第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011.4.28-30

2. 藤井 澄、笹平智則、大森 斉、松吉ひろ子、高木 都、國安弘基. セロトニン 4 型受容体アゴニストの腸管吻合部神経再生への影響. 第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011.4.28-30

3. 國安弘基、Luo Yi、北台靖彦、笹平智則、丸山博司、大森 斉. HMGB1 の間葉系細胞への影響. 第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011.4.28-30

4. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、パワ

- ル・ウジャー、桐田忠昭、國安弘基。ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現。第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011.4.28-30
5. 笹平智則、山本一彦、栗原 都、上田順宏、パワール・ウジャー、桐田忠昭、國安弘基。口腔扁平上皮癌における miR-126 の発現と役割。第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011.4.28-30
6. 千原良友、Luo Yi、パワール・ウジャー、笹平智則、藤井 澄、國安弘基。大腸癌先進部の CD133 陽性間質細胞は肝転移と相関する。第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011.4.28-30
7. 笹平智則、Luo Yi、大森 斉、下元貴澄、千原良友、國安弘基。高血糖の大腸癌肝転移に及ぼす影響。第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011.4.28-30
8. 笹平智則、栗原都、桐田忠昭、國安弘基。唾液腺腫瘍における RUNX3 の発現とメチル化。第 30 回分子病理学研究会、瀬戸内シンポジウム、岡山、2011.7.22-24
9. 笹平智則、上田順宏、栗原都、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔癌における Trk family の役割。第 22 回日本臨床口腔病理学会総会、福岡、2011.8.23-25
10. 栗原都、山本一彦、笹平智則、桐田忠昭、國安弘基。ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現。第 22 回日本臨床口腔病理学会総会、福岡、2011.8.23-25
11. 大森 斉、Luo Yi、千原良友、傳田阿由美、笹平智則、國安弘基。糖尿病はアンギオテンシン系を活性化し大腸癌肝転移を促進する。第 70 回日本癌学会総会、名古屋、2011.10.3-5
12. 笹平智則、栗原 都、パワール・ウジャー、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔扁平上皮癌における miR-126 の機能解析。第 70 回日本癌学会総会、名古屋、2011.10.3-5
13. 栗原 都、山本一彦、笹平智則、桐田忠昭、國安弘基。ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現。第 70 回日本癌学会総会、名古屋、2011.10.3-5
14. パワール・ウジャー、佐藤冬樹、笹平智則、伊藤由美、國安弘基、鬼島 宏、安孫子宣光。bHLH 転写因子 DEC1 が E-box を介して Cyclin D1 を制御する。第 70 回日本癌学会総会、名古屋、2011.10.3-5
15. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔扁平上皮癌における miR29b-1 の働き。第 22 回日本消化器癌発生学会総会、佐賀、2011.11.25-26
16. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔癌における miR-126 の役割。第 22 回日本消化器癌発生学会総会、佐賀、2011.11.25-26
17. 笹平智則、桐田忠昭、國安弘基。RegIV と RUNX3 は腺様嚢胞癌の新規予後不良因子である。第 56 回日本唾液腺学会総会、東京、2011.12.3
18. 笹平智則、上田順宏、栗原 都、山本一彦、國安弘基、桐田忠昭。Trk family は口腔癌の血管・リンパ管新生を誘導する。第 30 回日本口腔腫瘍学会総会、大宮、2012.1.26-27
19. 笹平智則、栗原 都、上田順宏、パワール・ウジャー、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔癌における Prox1 の発現と役割。第 101 回日本病理学会総会、東京、2012.4.26-28
20. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、パワール・ウジャー、桐田忠昭、國安弘基。ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現。第 101 回日本病理学会総会、東京、2012.4.26-28
21. 笹平智則、栗原 都、パワール・ウジャー、上田順宏、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。FOXC2 が口腔癌に及ぼす影響についての検討。第 101 回日本病理学会総会、東京、

2012.4.26-28

22. 笹平智則、桐田忠昭、上田順宏、今西麻衣子、栗原 都、國安弘基。TANGO は口腔癌の新規腫瘍進展因子である。第 21 回日本がん転移学会総会、広島、2012.7.12-13

23. 上田順宏、笹平智則、桐田忠昭、國安弘基。口腔癌におけるHuDの発現と意義。第21回日本がん転移学会総会、広島、2012.7.12-13

24. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現。第21回日本がん転移学会総会、広島、2012.7.12-13

25. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔扁平上皮癌におけるhsa-miR29b-1の発現とc-metおよびEMTとの関連。第21回日本がん転移学会総会、広島、2012.7.12-13

26. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現。第71回日本癌学会総会、札幌、2012.9.19-21

27. 笹平智則、パワーール・ウジャール、栗原都、上田順宏、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔癌におけるTANGOの発現。第71回日本癌学会総会、札幌、2012.9.19-21

28. 笹平智則、栗原 都、上田順宏、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔癌と大腸癌におけるTrkの役割の差異。第31回日本口腔腫瘍学会総会、東京、2013.1.23-25

29. 笹平智則、山本一彦、パワーール・ウジャール、栗原 都、桐田忠昭、國安弘基。口腔癌と大腸癌におけるTrkの役割の差異。第102回日本病理学会総会、札幌、2013.6.6-8

30. 笹平智則、栗原 都、パワーール・ウジャール、國安弘基。大腸癌におけるTrkの発現と意義。第102回日本病理学会総会、札幌、2013.6.6-8

31. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、國安弘

基、桐田忠昭。口腔扁平上皮癌におけるMIA2の発現。第37回日本頭頸部癌学会総会、東京、2013.6.13-14

32. 笹平智則、栗原 都、桐田忠昭、國安弘基。新規MIA gefe familyであるMIA2の口腔癌における機能解析。第24回日本臨床口腔病理学会総会、東京、2013.8.28-30

33. 笹平智則、栗原 都、パワーール・ウジャール、桐田忠昭、國安弘基。Prox1とFOXC2は口腔癌の脈管新生因子である。第72回日本癌学会総会、横浜、2013.10.3-5

34. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。口腔扁平上皮癌におけるMIA2の役割。第72回日本癌学会総会、横浜、2013.10.3-5

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笹平 智則 (SASAHIRA Tomonori)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90405374

### (2) 研究分担者

國安 弘基 (KUNIYASU Hiroki)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00253055

### (3) 連携研究者

桐田 忠昭 (KIRITA Tadaaki)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70201465

山本 一彦 (YAMAMOTO Kazuhiko)  
奈良県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20243842

パワーール ウジャール (BHAWAI Ujjal)  
日本大学・歯学部・助教  
研究者番号：50433339