

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592967

研究課題名(和文) マイクロRNA解析による口腔癌の薬剤耐性化機構の解明と新規診断治療法への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms underlying drug resistance of oral cancer based on microRNA analysis and applications of the findings to novel diagnostic and therapeutic strategy

研究代表者

中山 秀樹 (Nakayama, Hideki)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70381001

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)：5-FU耐性の口腔扁平上皮癌細胞株は、親株である5-FU感受性株と比べてmiR-30aが有意に発現上昇しており、そのことはG1アレスト細胞の増加と関連していた。また、ルシフェラーゼアッセイより、miR-30aがcyclin E2の翻訳抑制に関与していることが明らかとなった。さらに、miR-30aの発現を抑制することで、cyclin E2の発現上昇によりG1アレスト細胞が減少し、5-FU感受性が有意に上昇した。以上より、miR-30aは、OSCCの5-FU耐性克服のための標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Five-FU-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines expressed more miR-30a than the parent cells, thus resulting in increased G1-arrested cells. Luciferase assay revealed that miR-30a suppresses the translation of cyclin E2. MiR-30a targeting significantly increased the sensitivity to 5-FU of OSCC cells with upregulation of cyclin E2 and downregulation of G1-arrested cells. These results suggest that miR-30a could be a useful target for overcoming 5-FU resistance of OSCC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：マイクロRNA 薬剤耐性 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA (miRNA) の異常発現が癌細胞の悪性形質の進展に関与することが報告されている。しかしながらこれまで、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) の miRNA 発現異常と抗癌剤耐性についての報告は少なく、中でも 5-FU 耐性との関連性を示した報告は全くない。

2. 研究の目的

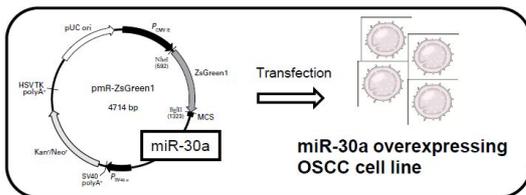
OSCC の 5-FU 耐性に関わる特定の miRNA を同定し、その役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

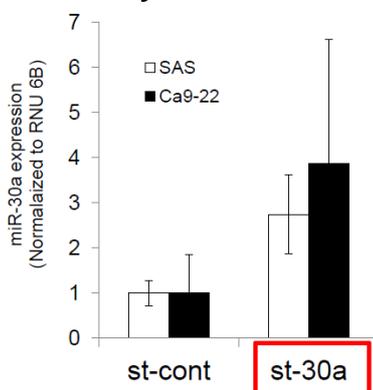
OSCC 細胞株 SAS および Ca9-22 と、それらより樹立した 5-FU 耐性株 (SAS/FR2、Ca9-22/FR2) を用いて実験を行った。親株と耐性株による miRNA マイクロアレイ解析の結果、miR-30a が有意に発現上昇していたため、miR-30a の機能解析のための in vitro の研究を行った。具体的には、miR-30a の恒常的過剰発現株を樹立し、5-FU 感受性やアポトーシスの変化の解析、細胞周期解析、ルシフェラーゼアッセイによる miR-30a の標的確認実験などを行った。

A comparison of miR-30a by a miRNA microarray analysis

	Ratio	Z-score
SAS vs FR2	2.33	3.24
Ca9-22 vs FR2	1.92	3.26



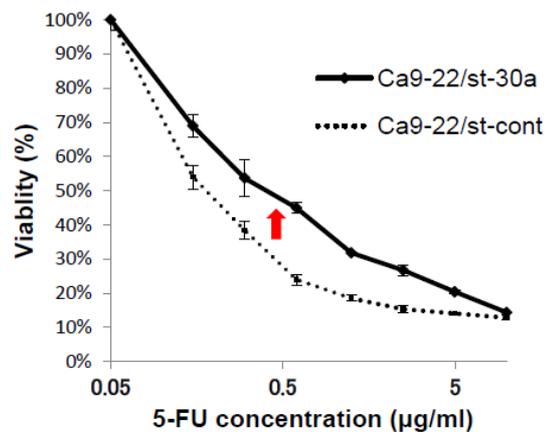
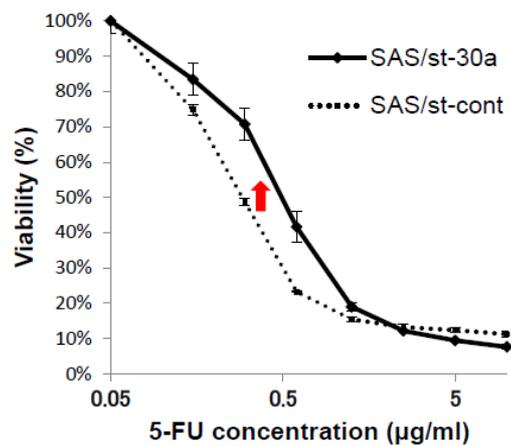
A comparison of miR-30a by a real-time PCR



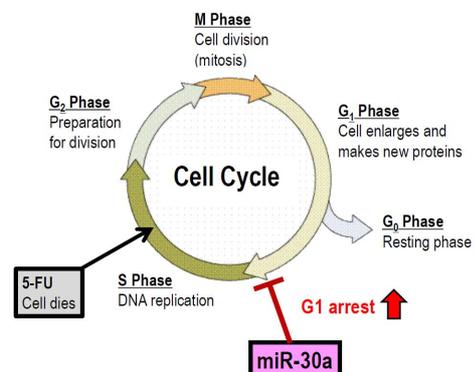
4. 研究成果

in vitro での miR-30a の機能解析において、G1 アレスト細胞の増加を認めた。また、ルシフェラーゼアッセイより、miR-30a が cyclin E2 の翻訳抑制に関与していることが明らかとなった。さらに、miR-30a の発現を抑制することで、cyclin E2 の発現上昇により G1 アレスト細胞が減少し、5-FU 感受性が有意に上昇した。以上より、miR-30a は、OSCC の 5-FU 耐性克服のための標的となりうる可能性が示唆された。

下図は、miR-30a 強発現 OSCC 株の 5-FU 耐性度の上昇を示している。



Schematic diagram of miR-30a-mediated drug resistance



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8件)

Kawahara K\*, Nakayama H\*, Nagata M, Yoshida R, Hirosue A, Tanaka T, Nakagawa Y, Matsuoka Y, Kojima T, Takamune Y, Yoshitake Y, Hiraki A, and Shinohara M. (\* Contributed equally)

A low Dicer expression is associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a shorter overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma.

J Oral Pathol Med. 43(5):350-6, 2014. doi: 10.1111/jop.12140. 査読あり

Nakagawa Y\*, Nakayama H\*, Nagata M, Yoshida R, Kawahara K, Hirosue A, Tanaka T, Yuno A, Matsuoka Y, Kojima T, Yoshitake Y, Hiraki A, and Shinohara M. (\* Contributed equally)

Overexpression of fibronectin confers cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) against 5-FU in oral squamous cell carcinoma cells.

Int J Oncol. 44(4):1376-84, 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2265. 査読あり

Shinriki S, Jono H, Ueda M, Obayashi K, Nakamura T, Ota K, Ota T, Sueyoshi T, Guo J, Hayashi M, Hiraki A, Nakayama H, Yamashita S, Shinohara M, Ando Y.

Stromal Expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Correlates with Poor Differentiation and Adverse Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma.

Histopathology. 64(3):356-64, 2014 査読あり

Yoshida R, Nagata M, Nakayama H, Niimori-Kita K, Hassan W, Tanaka T, Shinohara M, Ito T.

The pathological significance of Notch1 in oral squamous cell carcinoma.

Lab Invest. 93(10):1068-81, 2013 査読あり

Hanaoka Y, Soejima H, Yasuda O, Nakayama H, Nagata M, Matsuo K, Shinohara M, Izumi Y, Ogawa H.

Level of serum antibody against a periodontal pathogen is associated with atherosclerosis and hypertension.

Hypertens Res. 36(9):829-33, 2013 査読あり

Ikebe T, Yamasaki K, Takamune Y, Nakayama H, Shinohara M.

Reduced expression of nuclear factor κB in oral mucosa undergoing preoperative chemoradiotherapy.

Oral Science International. 9(2):33-7, 2012 査読

あり

Teshima K, Murakami R, Yoshida R, Nakayama H, Hiraki A, Hirai T, Nakaguchi Y, Tsujita N, Tomitaka E, Furusawa M, Yamashita Y, Shinohara M.

Histopathological changes in parotid and submandibular glands of patients treated with preoperative chemoradiation therapy for oral cancer.

J Radiat Res. 53(3):492-6, 2012 査読あり

Tanaka T, Nakayama H, Yoshitake Y, Irie A, Nagata M, Kawahara K, Takamune Y, Yoshida R, Nakagawa Y, Ogi H, Shinriki S, Ota K, Hiraki A, Ikebe T, Nishimura Y, Shinohara M.

Selective inhibition of nuclear factor-κB by nuclear factor-κB essential modulator-binding domain peptide suppresses the metastasis of highly metastatic oral squamous cell carcinoma.

Cancer Sci. 103(3):455-63, 2012 査読あり

[学会発表](計3件)

The antiapoptotic mechanism underlying drug resistance of oral squamous cell carcinoma  
Nakayama H, Nagata M, Kawahara K, Nakagawa Y, and Shinohara M  
21ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY  
October 21-24, 2013, Barcelona, Spain

Overexpression of miR-30a confers 5-FU resistance by inhibiting cell proliferation via G1 phase arrest through targeting cyclin E2 in oral squamous cell carcinoma

Kenta Kawahara, Hideki Nakayama, Masashi Nagata, Ryoji Yoshida, Takuya Tanaka, Yoshihiro Nakagawa, Akiyuki Hirosue, Yuichiro Matsuoka, Yoshihiro Yoshitake, Akimitsu Hiraki, and Masanori Shinohara

第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、横浜

Overexpressed fibronectin contributes to cell adhesion-mediated drug resistance in oral squamous cell carcinoma

Yoshihiro Nakagawa, Hideki Nakayama, Ryoji Yoshida, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Takuya Tanaka, Akiyuki Hirosue, Yuichiro Matsuoka, Yasuo Takamune, Yoshihiro Yoshitake, Akimitsu Hiraki, and Masanori Shinohara

第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日、横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/oralsurgery/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中山 秀樹（NAKAYAMA Hideki）

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70381001

### (2)研究分担者

篠原 正徳（SHINOHARA Masanori）

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：90117127