

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293411

研究課題名(和文) NF- $\kappa$ BとCXCR4関連miRNAを標的とした口腔癌に対する複合的治療法の開発研究課題名(英文) Development of combination therapy, targeting NF- $\kappa$ B and CXCR4-related miRNA in oral cancer

研究代表者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：20200214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：miR-146aは、転移促進分子であるCXCR4と増殖促進因子であるEGFRの発現およびNF- $\kappa$ Bの活性化を負に制御することにより、増殖転移抑制に主眼をおいた口腔癌の複合的治療の標的になる可能性が示唆された。しかしながら、培養細胞においてはその効果は細胞種特異的であり、今後、患者由来組織の移植モデルを用いた解析や培養細胞を用いた新規miRNAカスケードの探求の必要である。

研究成果の概要(英文)：miR-146a negatively regulated the expression of CXCR4, a metastasis-related molecule, and the expression of EGFR and the activation of NF- $\kappa$ B, stimulators for cell growth. These results indicating that miR-146a may be a target of combination therapy for prevention of the growth and metastasis in oral cancer. However, this phenomenon occurred in vitro cell-type specific effect, in the future, it is necessary for the analysis of patient-derived xenograft model and/or for the investigation of the new miRNA cascade(s).

研究分野：口腔外科

キーワード：CXCR4 NF- $\kappa$ B 口腔癌 miRNA 複合的治療法

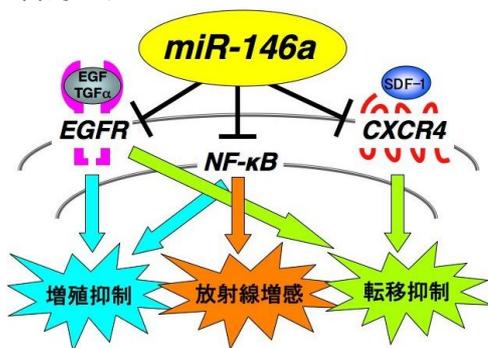
1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療成績は集学的治療の進歩により向上しているが、化学・放射線療法の副作用や外科治療後の機能障害によるQOLの低下、後発転移および再発時の薬剤耐性等が問題である。これらの解決のために分子標的治療が注目されている。

申請者は、原発巣における腫瘍増殖と転移とを分けて、各々に対する分子標的治療を併用する必要があると考え、口腔癌に対する複合的治療の開発を目指してきた。申請者らは、口腔癌の分子標的治療として、原発腫瘍には NF- $\kappa$ B 阻害剤が、転移抑制には CXCR4 阻害剤が著効することを明らかにし、これらを組合わせた複合的治療の開発を目指している。近年、低分子 RNA である マイクロ RNA (miRNA) が多くの mRNA の分解あるいは翻訳を調節していることが明らかにされた。miRNA は、安定性が高く合成が容易な上、内因性分子であることから、廉価で副作用の少ない核酸医薬品として期待されている。最近、miR-146a が NF- $\kappa$ B の活性化や CXCR4 の発現、さらには多くの癌の進展に関与している上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現をも制御する癌抑制型 miRNA である可能性が報告された。EGFR は、FDA が認可した口腔癌における唯一の治療標的分子であり、NF- $\kappa$ B および CXCR4 と同時にノックダウンすることができれば、口腔癌の増殖と転移を効果的に抑制できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では miR-146a を用いた口腔癌における複合的治療の可能性を探求することを目的とする。



3. 研究の方法

(1) 口腔癌細胞株における miR-146a, EGFR, CXCR4 の発現

対数増殖期あるいは合成 miR-146a を導入後の口腔癌細胞株 B88, CAL27, BHY, IH, HSC-2, 唾液腺癌細胞株 ACC-M より Trizol により total RNA を回収し, random primer あるいは TaqMan™ MicroRNA RT Kit で逆転写後、TaqMan™ Gene Expression Assay を使用し、ABI StepOnePlus Real-Time PCR System によ

り定量性 PCR を行った。

(2) 細胞増殖能の検討

細胞を 96 ウェルプレートに播種後、1, 10 nM の合成 miR-146a である miCENTURY OX siMature (B-Bridge), あるいは miR-146a 阻害剤である miRCURY LNA™ microRNA Inhibitor (Exiqon) を Lipofectamine RNAiMax により細胞に導入後、MTT 法にて検討した。

(3) 細胞遊走能の検討

上述の合成 miR-146a を細胞に導入後、Transwell の upper chamber に細胞を播種し、細胞遊走能に与える影響を検討した。

(4) miR-146a の過剰発現が NF- $\kappa$ B 活性に与える影響

細胞を 96-well プレートに播種後、NF- $\kappa$ B レポーターベクターである 3kB-luc と miR-146a オリゴを(2)と同様の条件で導入し、24時間後の luciferase 活性を設備備品として購入したマイクロプレートリーダー Infinite F200 (TECAN)を用い測定した。

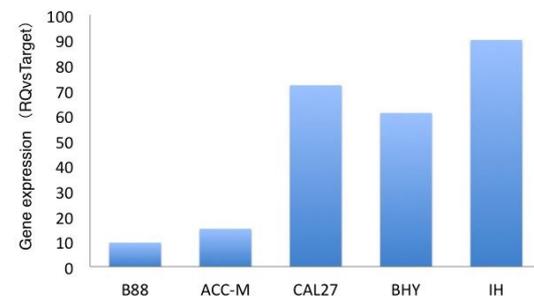
(5) 免疫組織化学染色

初診時の生検材料あるいは未治療の手術材料から得られた組織をホルマリンで固定後、パラフィン包埋を行い、切片を作製した。一次抗体として抗 p65 抗体 (Abcam) と VECTASTAIN Avidin-Biotinylated enzyme complex kit (Vector Laboratories, Inc.) を用いて染色し、ヘマトキシリンにて対比染色を行い封入した。試料は顕微鏡を用いて検鏡し、切片中の陽性の癌細胞が 10%以上を陽性(+) と判定した。

4. 研究成果

(1) 口腔癌細胞株における miR-146a の発現

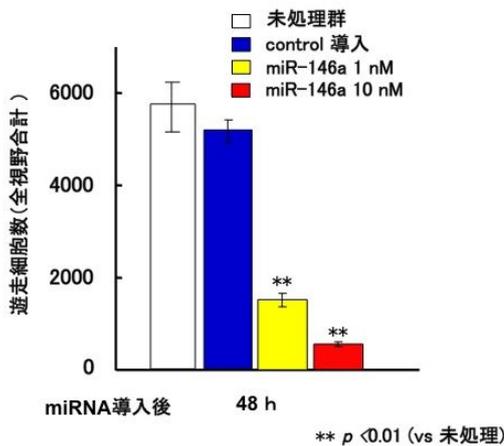
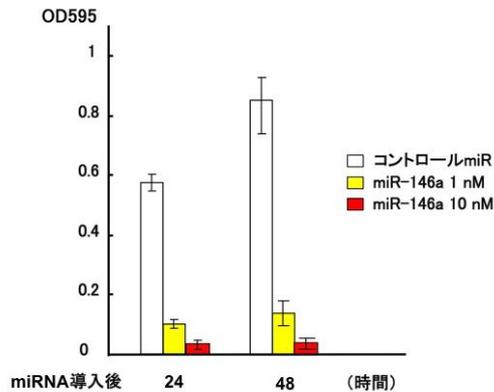
NF- $\kappa$ B の恒常的活性化と CXCR4 の高発現、および EGFR の発現を有する B88 細胞、ACC-M 細胞では miR-146a の発現は低レベルであった。一方、CXCR4 の発現が低く、EGFR の発現が高い CAL27, BHY, IH 細胞では B88, ACC-M 細胞に比較して miR-146a の発現は高い傾向にあった。



(2) miR-146a の過剰発現が miR-146a 低発現株の増殖・細胞遊走に及ぼす影響

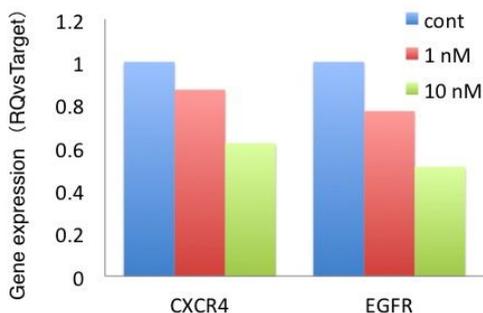
miR-146a の合成 miRNA を 1, 10 nM の濃度で B88 細胞に導入したところ、いずれの濃度でも細胞死が観察されたが、10 nM において顕著に認められた (95%以上)。また、細胞遊走も 10 nM で強く抑制されたが、細

胞死の関与を否定できない結果であった。ただし、10 nM という導入濃度は一般的にそれほど高いわけではなく、miR-146a が癌抑制型 miRNA である可能性は示唆された。



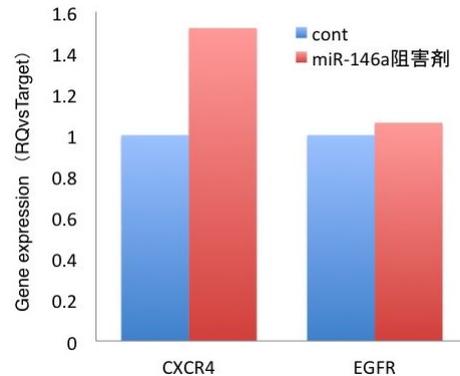
### (3) miR-146a の過剰発現が CXCR4 と EGFR の発現に及ぼす影響

上述(2)の 10 nM の miR-146a を B88 細胞に導入したところ、CXCR4 と EGFR の発現は低下した。細胞死に由来した mRNA の非特異的分解の可能性を除外する目的で、1 nM の合成 miR-146a を導入したが、10 nM に比較して若干劣るものの、CXCR4 と EGFR の発現低下を認めた。一方、CXCR4 の発現がなく、EGFR の中等量の発現を認める BHY、IH、HSC-2 細胞に合成 miR-146a を導入したが、CXCR4 と EGFR の発現に影響を与えなかった(データは示していない)。以上より、miR-146a は CXCR4 と EGFR の発現調節に関与はするが、その作用は細胞特異的である可能性が示唆された。



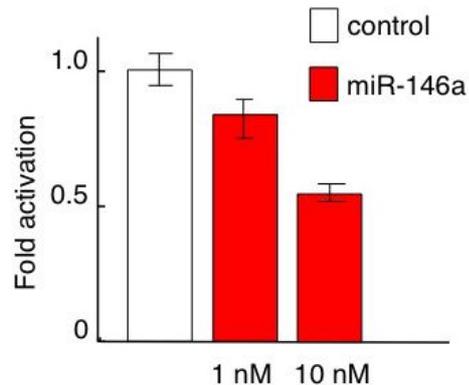
### (4) miR-146a 高発現株における miR-146a 阻害剤の影響

miR-146a を高発現している CAL27 細胞に miR-146a の LNA 阻害剤を導入したところ、CXCR4 の発現は低レベルではあるが誘導されたのに対し、EGFR の発現はもとのレベルが高いためかほとんど影響を受けなかった。



### (5) miR-146a が NF-κB 活性に与える影響

miR-146a による CXCR4 と EGFR の発現は、細胞特異的であることが予想されたため、上述の B88 細胞を用い、miR-146a の導入が NF-κB 活性化に与える影響を検討した。その結果、miR-146a の導入は、レポーターアッセイにて NF-κB 活性を抑制した。



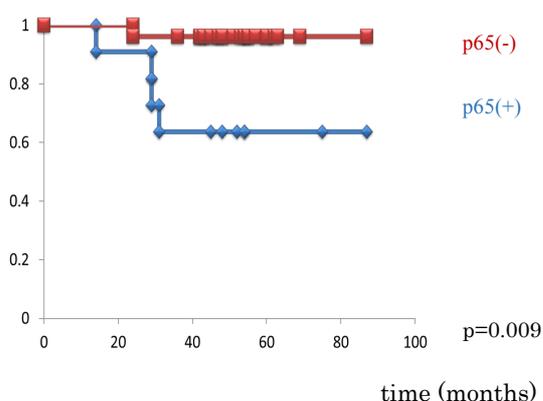
### (6) 臨床材料における NF-κB サブユニット p65 の核での発現

次に臨床材料を用い、すでに検討済みであった CXCR4、EGFR を除き、NF-κB サブユニットである p65 の核での発現を 78 例の口腔癌組織を用い、免疫組織化学染色にて検討した。その結果、p65 の核での発現は 24% で陽性を示した。しかしながら、miR-146a の発現を in situ hybridization にて検討したが、バックグラウンドが強く、パラフィン切片を用いた検出は困難であり、p65、CXCR4、EGFR の発現との関連を証明することができなかった。p65 の核で発現は癌細胞の分化度、頸部リンパ節転移、生存率と相関関係を示した。

核 p65 発現と口腔癌の臨床病理学的因子との検討結果

T 分類	患者数		
	核 p65 陽性	陰性	
T1	1	13	NS
T2	12	33	
T3	1	4	
T4	5	9	
分化度			
高分化	5	34	p<0.05
中分化	8	22	
低分化	6	3	
YK 分類			
YK1	1	5	NS
YK2	2	16	
YK3	6	27	
YK4C	2	4	
YK4D	5	3	
頸部リンパ節転移			
N(+)	13	6	p<0.01
N(-)	6	53	

Disease-free survival for patients (T1 and T2) with nuclear p65 expression



以上より, miR-146a は, 転移促進分子である CXCR4 と増殖促進因子である EGFR の発現および NF- $\kappa$ B の活性化を負に制御することより, 増殖転移抑制に主眼をおいた口腔癌の複合的治療の標的になる可能性が示唆された。しかしながら, 培養細胞においては, その効果は細胞種特異的であり, 今後, 患者由来組織の移植モデルを用いた解析や培養細胞を用いた新規 miRNA カスケードの探求の必要である。

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 6 件)

Makoto Kinouchi, Daisuke Uchida,

Nobuyuki Kuribayashi, Tetsuya Tamatani, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto. Involvement of miR-518c-5p to Growth and Metastasis in Oral Cancer. PLoS One 9(12). E115936 2014(査読有). Nagai H, Fujioka-Kobayashi M, Ohe G, Hara K, Takamaru N, Uchida D, Tamatani T, Fujisawa K, Miyamoto Y. Antitumour effect of valproic acid against salivary gland cancer in vitro and in vivo. Oncol Rep. 31(3):1453-1458, 2014(査読有). Uchida D, Kuribayashi N, Kinouchi M, Ohe G, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: Expression and function of CXCR4 in human salivary gland cancers. Clin Exp Metastasis 30:133-142, 2013(査読有). Tamatani T, Takamaru N, Hara K, Kinouchi M, Kuribayashi N, Ohe G, Uchida D, Fujisawa K, Nagai H, Miyamoto Y: Bortezomib-enhanced radiosensitization through the suppression of radiation-induced nuclear factor- $\kappa$ B activity in human oral cancer cells. Int J Oncol 42:935-944, 2013(査読有). Ohe G, Sasai A, Uchida D, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: Effect of soluble factors derived from oral cancer cells on the production of interferon- $\gamma$  from peripheral blood mononuclear cells following stimulation with OK-432. Oncol Rep 30:945-951, 2013(査読有). Kuribayashi N, Uchida D, Kinouchi M, Takamaru N, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: The role of metabotropic glutamate receptor 5 on the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral cancer. PLoS One 8:e80773, 2013(査読有).

[学会発表](計 17 件)

玉谷哲也、高丸菜都美、大江剛、永井宏和、宮本洋二. 口腔扁平上皮癌における CD44, ABCG2 および ALDH1 の発現に関する検討. 第 60 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 名古屋国際会議場(愛知県, 名古屋市) 2015 年 10 月 16 日

玉谷哲也、高丸菜都美、大江剛、永井宏和、宮本洋二. 口腔癌における Bmi-1 と CD24 発現の臨床病理病理学的意義. 第 74 回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市) 2015 年 10 月 10 日

栗林伸行、内田大亮、木内誠、玉谷哲也、永井宏和、川又 均、宮本洋二. SDF-1/CXCR4 システムを介した口腔癌の転移における新規経口 CXCR4 阻害剤 AMD070 の有用性. 第 74 回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市) 2015 年 10 月 10 日  
Makoto Kinouchi, Daisuke Uchida, Nobuyuki Kuribayashi, Tetsuya Tamatani, Hirokazu Nagai, Hitoshi Kawamata, Youji Miyamoto. miR-518c-5p promotes the metastasis of oral cancer cells in a CXCR4-dependent and -independent manner. AACR Annual Meeting 2015. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia (USA). 2015.4.19.

栗林伸行、内田大亮、木内誠、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二. SDF-1/CXCR4 システムを介した口腔癌の転移における新規経口阻害剤 AMD070 の効果. 第 33 回日本口腔腫瘍学会学術大会. 奈良県新公会堂. (奈良県, 奈良市). 2015 年 1 月 30 日.

玉谷哲也、高丸菜都美、木内誠、栗林伸行、内田大亮、永井宏和、宮本洋二. 口腔癌における ABCG2 と ALDH1A1 発現の臨床病理学的意義. 第 73 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市). 2014 年 9 月 27 日.

Natsumi Takamaru, Tetsuya

Tamatani, Daisuke Uchida, Nobuyuki Kuribayashi, Go Ohe, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto. Clinicopathological Evaluation of Late cervical Lymph Node Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma. American association of Oral Maxillofacial Surgeons (aaoms) 96<sup>th</sup> Annual Meeting, Hawaii Convention center, Hilton Hawaiian Village. Honolulu, Hawaii (USA). 2014. 9. 14.

木内誠、内田大亮、栗林伸行、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二. miR-518c-5p の口腔癌における metastamiR としての可能性. 第 6 回日本 RNAi 研究会. グランドプリンスホテル広島. (広島県, 広島市) 2014 年 8 月 28 日.

木内誠、内田大亮、栗林伸行、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二. CXCR4 システムにより誘導される miR-518c-5p の口腔癌における転移関連 microRNA としての可能性. 第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 京王プラザホテル(東京都, 新宿区) 2014 年 5 月 8 日.

Tetsuya Tamatani, Natsumi Takamaru, Makoto Kinouchi, Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto. Expression of ABCG2, ALDH1A1, CD44, and CD44 variant 9 in human oral squamous cell carcinoma and its relationship with clinical factors. AACR Annual Meeting 2014. San Diego Convention Center, San Diego (USA). 2014.4.7.

Makoto Kinouchi, Daisuke Uchida, Nobuyuki Kuribayashi, Tetsuya Tamatani, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto. Isolation of a novel metastasis-related microRNA, miR-518c-5p, induced by the stromal cell-derived factor (SDF)-1/CXCR4 system in oral cancer. AACR Annual Meeting 2014. San Diego Convention Center, San Diego (USA). 2014.4.7.

Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida, Makoto Kinouchi, Tetsuya Tamatani, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto. The role of metabotropic glutamate receptor 5 on the lymph node metastases in oral cancer. AACR Annual Meeting 2014. San Diego Convention Center, San Diego (USA). 2014. 4.7.

栗林伸行、内田大亮、木内 誠、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二. CXCR4 システムを介した口腔癌のリンパ節転移における mGluR5 のリンパ管新生への関与. 第 58 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、福岡国際会議場(福岡県、福岡市). 2013 年 10 月 11 日.

玉谷哲也、高丸菜都美、木内誠、栗林伸行、内田大亮、永井宏和、藤澤健司、宮本洋二. 口腔癌における NF- $\kappa$ B 発現の臨床病理学的意義. 第 72 回日本癌学会学術大会総会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市), 2013 年 10 月 4 日.

木内誠、内田大亮、栗林伸行、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二. 口腔癌における CXCR4 システムにより誘導される新規転移関連 microRNA の同定. 第 72 回日本癌学会学術大会総会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市), 2013 年 10 月 4 日.

栗林伸行、内田大亮、木内誠、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二. CXCR4 伝達経路による mGluR5 の転写調節機構. 第 72 回日本癌学会学術大会総会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市). 2013 年 10 月 4 日.

木内誠、内田大亮、栗林伸行、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二. Stromal-cell derived factor(SDF)-1/CXCR4 システムにより誘導される口腔癌の転移関連マイクロ RNA の検索. 第 37 回日本頭頸部癌学会. 京王プラザホテル(東京都、新宿区). 2013 年 6 月 14 日.

## 6. 研究組織

### (1) (1)研究代表者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：20200214

### (2)研究分担者

内田 大亮 (UCHIDA, Daisuke)  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20335798

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：30274236

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号：50282190

高丸 菜都美 (TAKAMARU, Natsumi )  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：40513031

大江 剛 (OHE, Go)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：60432762

栗林 伸行 (KURIBAYASHI, Nobuyuki)  
獨協医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80617332