

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09745

研究課題名(和文) 癌幹細胞と口腔癌転移患者血液の2つに着目した転移特異的miRNA同定と診断法確立

研究課題名(英文) Identification of Metastasis-specific miRNAs and Establishment of Diagnostic Methods Focusing on Cancer Stem Cells and Blood of Patients with Oral Cancer Metastasis

研究代表者

高丸 菜都美 (TAKAMARU, Natsumi)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：40513031

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)：口腔癌の最も大きい予後決定因子は転移である。予後を改善するためには、転移の予測、早期診断法の開発が必要である。最近、癌の早期診断法として少量の血液から検出可能なmiRNAが着目されているが、口腔癌では、転移に特異的なmiRNAの報告は殆どない。そのため、本研究で、癌幹細胞に着目した方法と、口腔癌患者の血液を利用した方法で転移に特異的なmiRNAの探索を行った。では口腔癌の転移に關与する癌幹細胞マーカーはALDH1とSOX2に選定できたが、これらを強制発現した株では転移関連miRNAを選定できなかった。では転移に關連するmiRNAが3種類選定され、これらが転移特異的なmiRNAと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の最も大きい予後決定因子は転移である。予後を改善するためには、転移の予測、早期診断法の開発が必要である。最近、癌の早期診断法として少量の血液から検出可能なmiRNAが着目されているが、口腔癌では、転移に特異的なmiRNAの報告は殆どない。本研究において、口腔癌の転移に關連するmiRNAが同定されたことで、患者の血液を利用し、術前もしくは原発巣の術後に転移の可能性を予測することが可能となり、予防的治療の必要性や術後治療の必要性などさらに個別設定することができ、生命予後の改善に一翼を担うことができると考える。

研究成果の概要(英文)：Metastasis is the largest prognostic determinant of oral cancer. Prediction of metastasis and development of early diagnosis are necessary in order to improve the prognosis. Recently, microRNAs (miRNAs), which can be detected from a small amount of blood, have been attracting attention as an early diagnostic method for cancer, but there have been few reports of miRNAs specific to metastasis in oral cancer. Therefore, we searched for metastasis-specific miRNAs by (1) focusing on cancer stem cells and (2) using the blood of oral cancer patients. In (1), we were able to select ALDH1 and SOX2 as cancer stem cell markers involved in metastasis of oral cancer, but we were unable to select metastasis-related miRNAs in the strains overexpressing these markers. In (2), three kinds of miRNAs related to metastasis were selected, and these were considered to be metastasis-specific miRNAs.

研究分野：口腔外科学分野

キーワード：口腔癌 がん幹細胞 転移 miRNA

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の最も大きい予後決定因子は転移である。予後を改善するためには、転移の予測、早期診断法の開発が必要である。最近、癌の早期診断法として少量の血液から検出可能な microRNA(miRNA)が着目されている。miRNA は 18~25 塩基からなる低分子 RNA であり、複数の遺伝子を制御している。乳癌においては miRNA(miR)-335,-126, -206 の発現が低下すると転移が促進されることが報告されている (Nature,451,147-54,2008)。しかし、口腔癌では、転移に特異的な miRNA の報告は殆どない。

仮に、口腔癌転移患者の血液を臨床サンプルとしてマイクロアレイ解析すれば、転移に関連する候補 miRNA を得ることは可能である。しかし、それらの候補 miRNA が本当に転移と関連しているか否かを検証することは難しい。なぜなら、その検証を臨床サンプルで行うには膨大な患者数が必要となるし、培養系で行ったとしても、それが臨床を反映しているとは言えないからである。研究代表者らは、当教室で樹立した口腔扁平上皮癌細胞株 B88 を用いてヌードマウスで頸部リンパ節および肺転移を生じる口腔癌転移マウスモデルを開発している (Int J Cancer 70:120, 1997, Eur J Cancer, 47: 452-459, 2011)。このモデルを利用して、マイクロアレイ解析で得られた候補 miRNA を B88 細胞に強制発現あるいは発現抑制して、転移が増加するか減少するかを確認することによって口腔癌の転移に特異的に関連する miRNA を同定できると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌の転移に特異的な microRNA (miRNA) の同定である。口腔癌の転移に関連する miRNA を同定する研究は盛んに行われている。マイクロアレイを用いれば、それぞれの発想で入手したサンプルから、候補となる miRNA を得ることは可能である。しかし、得られたそれらの候補 miRNA が本当に転移に関連しているかどうかを検証することは難しい。この点に関して、研究代表者らは当教室で樹立した口腔扁平上皮癌細胞株 B88 によるヌードマウスの頸部リンパ節および肺転移を生じるモデルを開発していることが大きな利点である。このモデルを利用して、得られた候補 miRNA を B88 細胞に強制発現あるいは発現抑制すれば、転移の増減を指標として、転移に特異的なかを *in vivo* で検証できるからである。

また、本研究ではマイクロアレイ用のサンプルの入手法として2つの独創的なアイデアを持っている。第1は、同一癌患者の(1)術後、非担癌状態時の血液と、(2)頸部リンパ節、遠隔転移時(転移巣のみ存在)の血液をアレイ解析して、候補 miRNA を得るというアイデアである。第2は、癌幹細胞に着目した方法である。当科の研究から口腔癌の転移を引き起こす癌幹細胞は ALDH1 と SOX2 を発現していると考えている。これらを B88 細胞に導入し、癌幹細胞様細胞を作製し、親細胞と解析を行うことによって、候補 miRNA を得るアイデアである。これらのアイデアは独自のもので、さらに、理論的には実現の可能性が大きいアイデアであると考えている。

3. 研究の方法

(1)癌幹細胞に着目した転移関連 miRNA の選定と同定

口腔癌組織における癌幹細胞マーカー発現の検索

口腔癌組織を用いて癌幹細胞のマーカー (CD44, ALDH1, ABCG2, CD24, Bmi-1, SOX2 など) の発

現を免疫組織化学染色（IHC）にて評価する。

癌幹細胞様細胞株の樹立

口腔癌組織における癌幹細胞マーカーの発現を検討した結果、転移と強く関連していたものを、B88 細胞に、これらを導入した癌幹細胞マーカー強制発現株を樹立する。癌幹細胞マーカーの cDNA を発現プラスミド（オリジーンテクノロジー）に組み込み、selection 後、それらの発現を RT-PCR で確認する。癌幹細胞マーカー発現細胞は癌幹細胞様の特徴を有していると考えられるため、細胞の特性、転移能を解析し、その確認を行う。癌幹細胞マーカー発現細胞（ 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 個細胞）をヌードマウスの咬筋内に移植し、造腫瘍性、転移能を検討する。また、癌幹細胞マーカー発現細胞のスフェロイドの形成能を 0.6% 軟寒天培地における足場非依存性増殖能あるいは無血清培地による 3D 培養で行い評価する。

(2) 口腔癌患者の血液に着目した転移関連 miRNA の選定と同定

口腔癌患者の血液に着目した転移関連 miRNA 候補の探索と選定

口腔癌患者の根治手術後、担癌状態でないと考えられる時の血液 a と、原発巣に再発がなく、転移が判明した時（体内に転移巣のみ存在している状態）の同一患者の血液 a' をサンプルとして、miRNA のマイクロアレイ解析（a と a'）を行う。実際には血液サンプルを回収後、RNA を抽出し、東レ 3D-Gene[®] を用いて miRNA のアレイ解析を行う。20 例の解析結果から、発現差が 3 倍以上ある miRNA を、候補 miRNA として選定する。

上記で選定した転移に関連する候補 miRNA の検証による転移特異的 miRNA の同定

候補 miRNA が転移の制御に関与しているか否かの検証は、当教室で樹立した B88 細胞によるヌードマウスの口腔癌転移モデルを用いて行う。同モデルは、B88 細胞をヌードマウスの咬筋内に同所性移植すると、頸部リンパ節転移を生じる系である (Int J Cancer 70:120, 1997, Eur J Cancer, 47: 452-459, 2011)。また、尾静脈から移植すると肺転移が生じる。そこで、B88 細胞に候補 miRNA のインヒビターである miRCURY LNA[™] microRNA Inhibitor (Exiqon) を用いて miRNA の機能を抑制、あるいは miRNA 発現プラスミド（オリジーンテクノロジー）を用いて過剰発現させた細胞を作製する。この細胞をヌードマウスの咬筋内に移植し、4 週後、親細胞と比較してリンパ節転移が増加しているか、減少しているかを確認することによって検証する。転移を増加あるいは減少させた miRNA を転移特異的な miRNA と同定する。

4. 研究成果

(1) 癌幹細胞に着目した転移関連 miRNA の選定と同定

口腔癌患者の生検及び手術材料による組織切片を用いて、癌幹細胞マーカー（CD44, ALDH1, ABCG2, CD24, Bmi-1, SOX2 など）の発現を免疫組織化学染色（IHC）にて評価した。図 1 のように組織を評価し、転移の有無について関連を探索した。その結果、ALDH1 と SOX2 が口腔癌の転移と関連していることが示唆された。

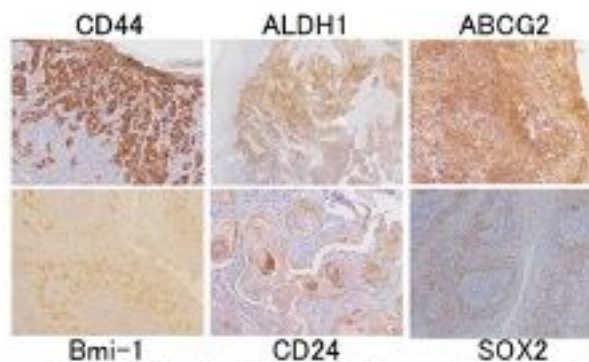


図1 口腔癌組織における癌幹細胞マーカーの発現

そこで、転移の原因となる癌幹細胞には ALDH1 と SOX2 の発現が必要であると考え、これらを B88 細胞に導入し、ALDH1 と SOX2 強制発

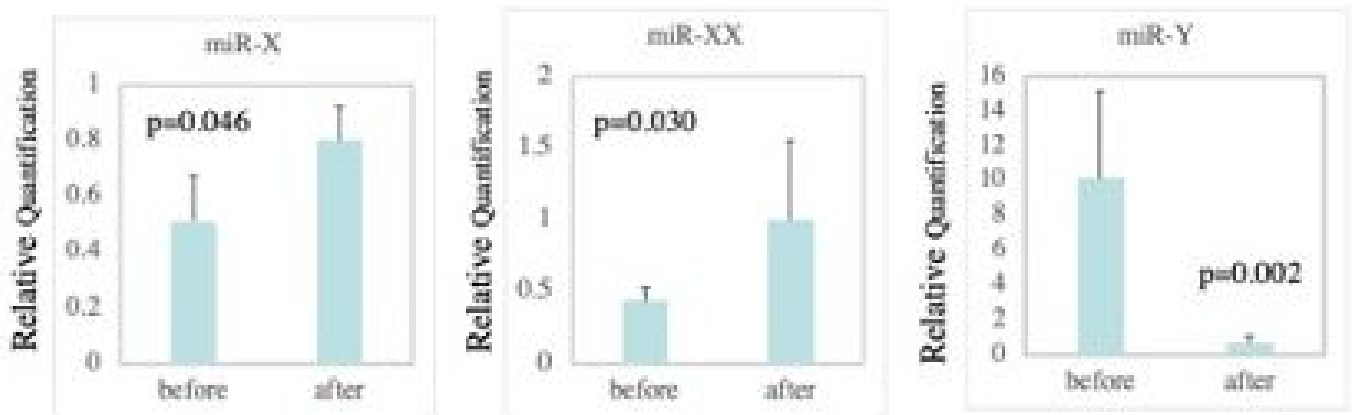
現株の作製を行った。ALDH1 と SOX2 を発現させた癌感細胞株の樹立を行ったが、癌幹細胞に特異的な転移に関連する miRNA 候補の探索も、結果にはばらつきがあり、候補が絞れない状態となり、この方法での転移関連 miRNA の選定を断念した。

(2) 口腔癌患者の血液に着目した転移関連 miRNA の選定と同定

口腔癌患者の根治手術後、担癌状態でないと考えられる時の血液 と、原発巣に再発がなく、転移が判明した時(体内に転移巣のみ存在している状態)の同一患者の血液 をサンプルとして、miRNA のマイクロアレイ解析(と)を行う。実際には血液サンプルを回収後、RNA を抽出し、東レ 3D-Gene[®] を用いて miRNA のアレイ解析を行った。抽出された miRNA は 2632 存在し、発現が 2 倍以上上昇した miRNA は 332、発現が 2 倍以上低下した miRNA は 166、発現が 4 倍以上上昇した miRNA は 315、発現が 4 倍以上低下した miRNA は 132、発現が 8 倍以上上昇した miRNA は 142、発現が 8 倍以上低下した miRNA は 131 であった。DIANA-microT-CDS や Pub Med で癌の浸潤/転移、予後に関する報告があるもので検索したところ、6 種類の miRNA が選定された。このうち 4 種類が 8 倍以上上昇した miRNA (miR-X, miR-XX, miR-XXX, miR-XXXX) で、2 種類が 8 倍以上低下した miRNA (miR-Y, miR-YY) であった。実際、患者の血清中の miRNA の発現量を測定したところ、miR-X, miR-XX, miR-Y で再現性があり、これら 3 つが口腔癌において転移特異的な miRNA ではないかと考えられた。

図2 転移特異的なmiRNAの探索

血清中のmiRNA発現量測定



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高丸 菜都美
2. 発表標題 早期口腔扁平上皮癌におけるPD-L1とZEB-1の発現と予後との関連について
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会・学術大会
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	宮本 洋二 (MIYAMOTO Youji) (20200214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	
研究分担者	玉谷 哲也 (TAMATANI Tetsuya) (30274236)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・非常勤講師 (16101)	
研究分担者	中川 貴之 (NAKAGAWA Takayuki) (30456230)	広島大学・病院(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	大江 剛 (OHE Go) (60432762)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・徳島大学専門 研究員 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	真野 隆充 (MANO Takamitsu) (80325125)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・徳島大学専門 研究員 (16101)	
研究分担者	栗尾 奈愛 (KURIO Naito) (80622141)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	工藤 景子 (KUDOH Keiko) (70380029)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

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