

令和元年6月16日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11294

研究課題名(和文) 口腔癌頸部リンパ節転移のバイオマーカーとしての血液中microRNAの探索

研究課題名(英文) the examination of microRNA related with lymph node metastasis

研究代表者

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：30274236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：初診時NO症例で原発巣切除後に局所再発がなく、頸部リンパ節に後発転移をおこした癌患者の頸部郭清術前と術後に、血液を採取してmicroRNAアレイの解析を行った。手術前後で明らかに転移した群で発現上昇した候補となるmicroRNAを選定した。miR-4664-5p、miR-6872-3p、miR-1290、miR-191-5p、miR-593-5p、miR-6778-5p、miR-4732-5p、miR-342-5p、miR-551b-5p、miR-198、miR-4419b、miR-3619-3p、miR-23b-3p、miR-107の発現がリンパ節転移と相関している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は、直接口腔内を観察することで癌の存在、再発を診断できるが、口腔癌の頸部リンパ節転移の診断は画像検査によるところが大きい。そのため、転移をより早期に発見するためには、リンパ節転移を検出するバイオマーカーが必要である。しかし、腫瘍マーカーとして頻用されている血清SCC抗原値は、口腔癌に対する腫瘍マーカーとして特異性が低いと報告されているように、臨床的に有用な口腔癌の腫瘍マーカーは存在していない。しかし、われわれは、口腔癌リンパ節転移患者と健常者の血液中のmicroRNAを比較した結果、そのプロファイリングに大きな違いが見られることを明らかにし、マーカーになりえるmicroRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the microRNA array analysis using patient blood who had total neck dissection before and after. The conditions were oral cancer patients who had without local recurrences after primary site operation, and occurred occult lymph node metastasis. The expression of miR-4664-5p, miR-6872-3p, miR-1290, miR-191-5p, miR-593-5p, miR-6778-5p, miR-4732-5p, miR-342-5p, miR-551b-5p, miR-198, miR-4419b, miR-3619-3p, miR-23b-3p, and miR-107 might be related to lymph node metastases.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 microRNA 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、直接口腔内を観察することで、癌の存在、再発を診断できるが、口腔癌の頸部リンパ節転移の診断は画像検査によるところが大きい。そのため、転移をより早期に発見するためには、リンパ節転移を検出するバイオマーカーが必要である。しかし、腫瘍マーカーとして頻用されている血清 SCC 抗原値は、口腔癌に対する腫瘍マーカーとして特異性が低いと報告されている (日本口腔外科会雑誌、60(7):407-415, 2014) ように、臨床的に有用な口腔癌の腫瘍マーカーは存在していない。申請者らも、今までに頸部リンパ節転移の指標となる因子を原発癌組織で検索した結果、転写因子と癌幹細胞マーカーの過剰発現が口腔癌患者の予後と相関していることを明らかにしたが、リンパ節転移とは相関を示すことができなかった。近年、細胞から分泌される膜小胞であるエクソソーム由来の分泌型 microRNA は、RNA 分解酵素の分解を受けず安定的に血液中に存在し、非浸襲的に採取可能なため、liquid biopsy ともいわれ、さまざまな癌腫のバイオマーカーとして注目を集めている。また、microRNA はエクソソームを介して細胞の情報伝達を行い、タンパク質合成の上流を制御するため、創薬のターゲットになると考えられている。一方、癌組織での microRNA の発現は癌種によってその発現が大きく異なり、癌細胞内と血液中の microRNA のプロファイルも大きく異なっている。さらに、がん患者と健常者とでは、分泌型 microRNA の発現に明確な差があることがわかっており、そのプロファイリングの解析により、がんの悪性度、予後等に関する重要な情報が徐々に明らかにされている。最近、大腸癌患者 186 例と健常対照者 53 例を対象とした研究結果では、大腸癌患者の血清中 miR-21 の発現が上昇しているのが、手術後に有意に低下し、予後と相関関係を示すことから、大腸癌の診断および予後予測のバイオマーカーとして有用性が報告されている (JNCI,105(12):849-859,2013)。大腸癌以外にも、肺がん等 13 種のがんでバイオマーカーとなる分泌型 microRNA を同定する大規模試験が始まっているが、その中に口腔癌は含まれていない。

そこで、申請者らは、口腔癌リンパ節転移患者と健常者の血液中の microRNA を比較した結果、そのプロファイリングに大きな違いが見られることを明らかにした。一方、転移診断可能な microRNA を新規に検索するための最適な条件を考察した結果、口腔に癌細胞がなく、転移巣のみがある状態と転移巣を切除して体内に癌細胞がない状態の患者血液 (同一患者) を比較することが有効であると発想している。大腸癌など他臓器の癌では、原発巣を切除後、局所再発がなく、リンパ節転移を起こした患者の手術による根治は困難であるため、このようなサンプリングは行うことができない。口腔癌は、口腔癌の部位特異性から、サンプリングを行って、転移に特異的な microRNA を検出できる可能性が大きいと考えている。また、現在までに、このような条件で転移診断のための microRNA を探索した報告例はほとんどない。

2. 研究の目的

口腔癌の予後を改善するためには、頸部リンパ節転移を制御することが重要であるが、頸部リンパ節転移を診断できるバイオマーカーは存在しない。初診時 N0 症例で原発巣切除後に局所再発がなく、後に頸部リンパ節に後発転移をおこした癌患者の頸部郭清術前 (体内に転移巣のみが存在) と頸部郭清術後 (体内に癌細胞が存在していない状態) に、同一患者から血液を採取して microRNA (miRNA) のアレイ解析を行うことによって、口腔癌の転移に特異的な microRNA を検索できると発想している。本研究は、口腔癌患者の予後を改善するために、頸部リンパ節転移診断の指標となる microRNA を同定し、それらの microRNA が予後予測因子や治療効果の指標になるかを検証し、研究成果を臨床応用することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 初診時 N0 症例で原発巣切除後に局所再発がなく、後に頸部リンパ節に後発転移をおこした癌患者の頸部郭清術前と頸部郭清術後に、病理組織検査でリンパ節転移を確認した後の同一患者の血液サンプルから RNA を抽出し、microRNA アレイの解析(東レ 3D-Gene^R)を行う。複数の症例の解析結果より、手術前と手術後に発現差がある microRNA を抽出する。さらに、クラスター解析、下流に存在する遺伝子の解析をあわせて行い、候補となる microRNA を選定する。

(2) 口腔扁平上皮癌細胞 (SAS, CAL27, B88 細胞) を用いて、培養上清中、癌細胞中の microRNA を測定し、分泌型の microRNA であることを確認する。microRNA のインヒビターを用いて microRNA の機能を抑制、あるいは microRNA 発現プラスミドを用いて過剰発現させた癌細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍増殖、リンパ節への転移を検討する。また、網羅的に cDNA のマイクロアレイ解析を行い、それぞれの microRNA の下流に存在する遺伝子を同定する。さらに microRNA の発現が口腔癌の転移診断のバイオマーカーとなっているか判断し、同時に予後予測マーカーとなっているか検討を行い、その有用性について判断する。

4. 研究成果

診時N0症例で原発巣切除後に局所再発がなく、頸部リンパ節に後発転移をおこした癌患者の頸部郭清術前と術後に、血液を採取してmicroRNAアレイの解析結果を行った。解析結果より、手術前と手術後に発現差があり、明らかに転移した群で発現上昇した候補となるmicroRNAを選定した。

(1)手術後よりリンパ節転移時に2倍以上発現が上昇したmicroRNAはmiR-4664-5p、miR-6872-3p、miR-1290、miR-191-5p、miR-593-5p、miR-6778-5p、miR-4732-5p、miR-342-5p、miR-551b-5p、miR-198、miR-4419b、miR-3619-3p、miR-23b-3p、miR-107、miR-22-3p、miR-23a-3p、miR-1260a、miR-5585-3p、miR-1246であった。

(2)microRNAで、原発巣のみが存在する初診時に比較し、後発転移時に2倍以上発現が上昇したmicroRNAはmiR-4664-5p、miR-1290、miR-6778-5p、miR-4732-5p、miR-23b-3p、miR-107、miR-23a-3p、miR-1246であった。

(3)上記の中で、原発巣のみが存在する初診時と頸部郭清術後との発現差が2倍以下のmicroRNAは、miR-4664-5p、miR-1290、miR-6778-5p、miR-4732-5p、miR-1246であった。

これらのmicroRNAの発現が口腔癌の頸部リンパ節転移と関連している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tetsuya Tamatani, Natsumi Takamaru, Go Ohe, Kazuya Akita, Takayuki Nakagawa, Youji Miyamoto. Expression of CD44, CD44v9, ABCG2, CD24, Bmi-1 and ALDH1 in stage and oral squamous cell carcinoma and their association with clinicopathological factors. ONCOLOGY LETTERS: 16, 1133-40, doi:10.3892/ol.2018.8703, 2018(査読有).

〔学会発表〕(計4件)

Tetsuya Tamatani, Natsumi Takamaru, Go Ohe, Takayuki Nakagawa, Naito Kurio, Keiko Kudo, Yoshiko Yamamura, Takamitsu Mano, Youji Miyamoto. The clinicopathological roles of SOX2 and Oct4 expressions in stage I and II oral squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2018.

玉谷哲也, 高丸菜都美, 大江剛, 藤澤健司, 宮本洋二. 早期口腔扁平上皮癌患者における

ABCG2、ALDH1、Bmi-1、CD24 および CD44 発現に関する検討. 第 71 回日本口腔科学会 2017.

Tetsuya Tamatani, Natsumi Takamaru, Hirokazu Nagai, Kenji Fujisawa, Youji Miyamoto. Expression of ALDH1, Bmi-1 and CD24 in human oral squamous cell carcinoma and its relationship with clinical factors. AACR Annual Meeting 2016.

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, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮本 洋二

ローマ字氏名：(MIYAMOTO, Youji)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）

職名：教授

研究者番号（8 桁）：20200214

研究分担者氏名：高丸 菜都美

ローマ字氏名：(TAKAMARU, Natsumi)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）

職名：徳島大学専門研究員

研究者番号（8 桁）：40513031

研究分担者氏名：永井 宏和

ローマ字氏名：(NAGAI, Hirokazu)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院医歯薬学研究部

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：50282190

研究分担者氏名：大江 剛

ローマ字氏名：(OHE, Go)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：講師

研究者番号（8 桁）：60432762

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。