

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11295

研究課題名(和文) 口腔癌遠隔転移に關する播種性腫瘍細胞を制御するmicroRNAに関する研究

研究課題名(英文) microRNA which promotes the disseminated tumor cell which participates in distant metastasis of the oral cancer

研究代表者

柳本 惣市 (YANAMOTO, Souichi)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：10315260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、播種性腫瘍細胞(DTC)の休眠と覚醒の制御機構にmicroRNAが関与しているかどうかを検証することを目的とした。成果として、高播種性腫瘍細胞が遠隔転移能を有することは明らかにすることができ、その形成過程においてmiR-21が関与している可能性が示唆された。miR-21の標的分子としてDKK2が有力な分子として考えられた。さらにmiR-21によりDKK2や細胞接着分子の発現が有意に阻害され、このメカニズムがDTCの特性に密接に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to verify whether microRNA participates for the object and making more disseminated tumor cell (DTC) a treatment mark. It's high seeding as an outcome, a tumor cell could do a thing with remote metastaticity clearly, and a possibility that miR-21 participates in the formative process was suggested. DKK2 was considered as a strong molecule as a mark molecule of miR-21. More DKK2 and manifestation of intercellular adhesion molecule were obstructed by miR-21 significantly, and a possibility that this mechanism participates in the special quality of DTC closely was suggested.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：播種性腫瘍細胞 口腔癌 microRNA

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌においては、再建手術の進歩に伴い拡大切除が可能となり、さらに術後補助療法として放射線に化学療法を上乗せすることにより局所頸部制御率の改善が得られている。しかしながら、最近報告された国外における第 相臨床試験の長期観察結果では、術後放射線療法への化学療法の上乗せは、全生存率の改善に寄与しないとも言われている。さらに頭頸部癌の中でも口腔癌は術後補助化学放射線療法の効果に乏しいとする国内の報告もある。つまり局所頸部制御が良好であっても遠隔転移により経過不良となる場合が多く、今後の口腔癌を含む頭頸部癌の生存率向上のためには遠隔転移の制御が重要であると考えられる。遠隔転移の形成や進展のメカニズムについて、乳癌や前立腺癌などでは播種性腫瘍細胞 disseminated tumor cell (DTC) の休眠と覚醒が関与している可能性が報告されている。DTC は骨髄内や末梢血内に存在し、通常は休眠状態を保ち、遠隔転移形成に際して覚醒するとされ、この休眠状態にある DTC は細胞周期が減速した状態であることから、抗癌薬に抵抗性を示すことや癌幹細胞様の性質を示すことなどが報告されている。口腔癌においても DTC に関する報告は散見されるが、その特性については明らかにされていない。推察すると、口腔癌においては原発巣形成時あるいはその前段階において DTC は存在し、手術等の一次治療が終わった後、時間を経て遠隔転移巣を形成する際に genetic あるいは epigenetic な制御を受けて覚醒すると考えられる (図 1)。これまでも研究代表者は、舌癌細胞から抗癌薬に対して抵抗性を持ち、無血清培養下では休眠状態を保った癌幹細胞様細胞である side population 細胞を分離できることを証明し、さらに舌癌の臨床検体を用いた研究において、術前化学療法により治療抵抗性の癌幹細胞を選択的に残存させることが局所再発につながる可能性について報告してきた。このような背景から、口腔癌遠隔転移に關する DTC が癌幹細胞の性質を有しているのはいないか、またつい最近、乳癌における DTC 休眠・覚醒の制御機構に epigenetic な microRNA の関与が報告されたこともあり、本研究の着想に至った。

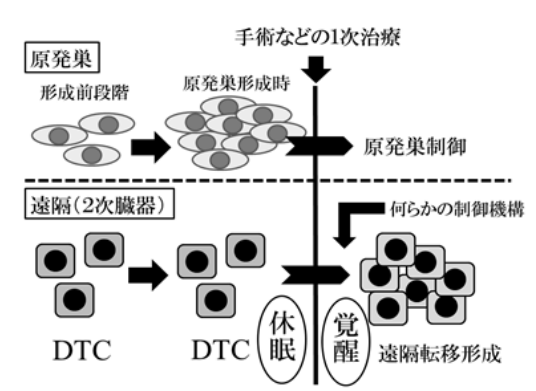


図 1

2. 研究の目的

高播種性口腔扁平上皮癌における遠隔転移には、播種性腫瘍細胞が関与していることが推察されることから、これらの細胞の細胞生物学的特徴を明らかにし、さらに治療標的とすることは、口腔扁平上皮癌の生存率向上に寄与すると考えられる。本研究では、この播種性腫瘍細胞の休眠と覚醒の制御機構に epigenetic な microRNA が関与しているかどうかを検証することを目的とした。さらに播種性腫瘍細胞を治療標的とした場合、休眠させたままの方が良いのか、細胞周期を静止期から追い出し覚醒させた上で治療の感受性を高めるべきかを考察し、実臨床に应用可能かどうかを明らかにすることを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌遠隔転移モデルの作製

高浸潤能口腔癌細胞のクローニング：口腔癌培養細胞 HSC-2 細胞および SAS 細胞をマトリゲルインベージョンチャンパーに播種し、マトリゲルを通過した細胞を再びマトリゲル上に播種するといったサイクルを繰り返し、浸潤能の高い細胞群をクローニングした。サイクル数については、5 回毎に継代可能な細胞数が得られた時点で、マトリゲルインベージョンアッセイを用いて浸潤能を評価した。parental cell の 10 倍程度の浸潤能が得られるまで行った。

DTC の分離：クローニングした高浸潤細胞を 4 週齢の Balb/C 系ヌードマウスの左心室に心腔内注射し、一定の間隔でエックス線および CT 撮影を行い、肺転移あるいは骨転移の形成を確認した。同時にクローニングする前の parental cell も同様に心腔内注射し、同期間観察し遠隔転移していないことを確認した上で、コントロールとした。

(2) 播種性腫瘍細胞 (以下 DTC) の分離 (マウス屠殺後)

マウス末梢血および骨髄からの DTC の濃縮分離：遠隔転移を起こしたヌードマウスの末梢血および骨髄細胞から、サイトケラチン発現細胞のポジティブセレクションにより、播種性上皮系腫瘍細胞を濃縮し分離した。形成された遠隔転移組織 (肺転移あるいは骨転移) を抽出した。

(3) microRNA の抽出およびアレイ解析

Parental cell, 高浸潤能細胞, マウス末梢血からの DTC, マウス骨髄からの DTC および 遠隔転移組織より microRNA を抽出した。同様に制御を受けた分子の発現解析のために total RNA も抽出した。また抽出した microRNA を microRNA アレイ解析した。と、と、と、とのサンプルを比較検討した (図 2)。



図 2

(4) 浸潤，転移および播種に關与する microRNA (以下 miR-X とする) の特定  
高浸潤能細胞と DTC に特異的に変化する miR-X の特定：高浸潤能細胞と DTC に共通して fold change する microRNA を候補とし，中でも癌細胞浸潤や転移に關与する分子を制御している microRNA をデータベース “miRanda” で特定した。

miR-X が制御する分子の発現についての検討：特定された microRNA を parental cell および高浸潤能細胞に導入。安定した導入効率をレポーターアッセイを用いて評価した。データベースで予測されたターゲット分子について，microRNA 導入前後の発現の変化を mRNA レベル (RT-PCR) およびタンパクレベル (Western blot) で解析した。さらに invitro での細胞生物学的特性の変化を検討するために，マトリゲルインベーションアッセイや wound healing assay を行い，浸潤能あるいは遊走能の変化を評価した。

(5) in vivo での miR-X 発現の検討

遠隔転移病巣における miR-X の発現検索：特定された miR-X の発現の分布についてホルマリン固定パラフィン包埋された遠隔転移組織について in situ hybridization にて検討した。

遠隔転移巣における miR-X ターゲット分子の発現検索：特定された miR-X ターゲット分子の発現の分布について，免疫組織化学的染色にて検討した。

(6) in vivo での miR-X 発現抑制による治療効果の検討

口腔癌遠隔転移モデルへの miR-X インヒビターの導入：高浸潤能細胞を心腔内注射した後に，口腔癌遠隔転移モデルに miR-X インヒビターをマウスに導入し，末梢血および骨髄の DTC の検出および遠隔転移形成を評価した。さらに抗癌薬との併用による遠隔転移形成抑制効果も評価した。

(7) 口腔癌患者における miR-X 発現意義についての検討

同意の得られた口腔癌患者の末梢血および手術材料について，miR-X の発現を検討し，臨床病理学因子との相関性を明らかにし，臨床的意義について考察した。

#### 4. 研究成果

(1) 口腔癌遠隔転移モデルの作製  
高浸潤能口腔癌細胞のクローニング：口腔癌

培養細胞 HSC-2 細胞および SAS 細胞から parental cell の約 5 倍の浸潤能をもった細胞集団がクローニングできた。このクローニングした高浸潤細胞を 4 週齢の Balb/C 系ヌードマウスの左心室に心腔内注射したところ，約 4 週間で肺転移の形成が確認できたが，骨転移は形成されなかった。

(2) 播種性腫瘍細胞 (以下 DTC) の分離  
サイトケラチン発現細胞のポジティブセレクションにより遠隔転移を起こしたヌードマウスの末梢血および骨髄細胞から DTC の分離を試みたが，困難であった。したがって，形成された遠隔転移組織 (肺転移あるいは骨転移) を試料としたが，肺転移は非常に微小な転移巣であり，純粋な摘出を行うことは非常に困難であった。

(3) microRNA の抽出およびアレイ解析

上記の通り遠隔転移組織より microRNA を抽出できなかったため Parental cell とクローニングした高浸潤細胞のサンプルを比較検討した。

(4) 浸潤，転移および播種に關与する microRNA の特定

高浸潤能細胞で特異的に変化する miR-X の特定を行ったところ miR-21 がいずれの細胞株の高浸潤細胞集団で fold change していたため，それを候補とし，microRNA をデータベース “miRanda” で標的分子として DKK2 を特定した。

microRNA 導入前後の発現の変化を mRNA レベル (RT-PCR) およびタンパクレベル (Western blot) で解析したところ，DKK2 の挙動に伴い，カテニンおよびカドヘリンの発現が有意に阻害され，これらの細胞接着因子が DTC の特性に密接に關与している可能性が示唆された。しかしながら，マトリゲルインベーションアッセイや wound healing assay で浸潤能あるいは遊走能の変化を評価したが変化は明らかでなかった。

(5) in vivo での miR-21 発現の検討

遠隔転移病巣における miR-21 の発現検索：特定された miR-21 の発現の分布については微小な転移であったためにその局在を明らかにすることはできなかった。免疫組織化学的検討でも同様に局在を明らかにすることはできなかった。

(6) 口腔癌患者における miR-21 発現意義についての検討

同意の得られた口腔癌患者の末梢血および手術材料について，miR-21 の発現を検討したが，検出できず，末梢血採血量の増量などの検討が必要と考えられた。

以上の成果が得られたが，問題点としてサイトケラチンを指標とした (マーカーとし

た) DTC の検出に問題があった可能性が高いと考察できる。検出能を向上させるために他のマーカー(たとえば EpCAM などの上皮接着分子など)を用いることも有効と思われる。さらにマウスの末梢血からの DTC 検出は検体量から考えて無理があったかもしれず、他のモデルの使用も検討の余地があると思われる。

最終的には高播種性腫瘍細胞が遠隔転移能を有することは明らかにすることができ、その形成過程において miR-21 が関与している可能性が示唆され、その標的分子として DKK2 が有力な分子として考えられた。

今後は、末梢血からの DTC 検出を目指し、新たな手法の開発も必要であると考えられた。

#### 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 5 件)

Yanamoto S, Umeda M, Kioi M, Kirita T, Yamashita T, Hiratsuka H, Yokoo S, Tanzawa H, Uzawa N, Shibahara T, Ota Y, Kurita H, Okura M, Hamakawa H, Kusukawa J, Tohnai I, Multicenter retrospective study of cetuximab plus platinum-based chemotherapy for recurrent or metastatic oral squamous cell carcinoma, *Cancer Chemother Pharmacol*, 査読有, Vol 81, 2018, 549-554

Yamada S, Otsuru M, Yanamoto S, Hasegawa T, Aizawa H, Kamata T, Yamakawa N, Kohgo T, Ito A, Noda Y, Hirai C, Kitamura T, Okura M, Kirita T, Ueda M, Yamashita T, Ota Y, Komori T, Umeda M, Kurita H, Progression level of extracapsular spread and tumor budding for cervical lymph node metastasis of OSCC, *Clin Oral Investig*, 査読有, Vol 22, 2018, 1311-1318

DOI:10.1007/s00784-017-2231-y

Hasegawa T, Yanamoto S, Otsuru M, Yamada S, Minamikawa T, Shigeta T, Naruse T, Suzuki T, Sasaki M, Ota Y, Umeda M, Komori T, Retrospective study of treatment outcomes after postoperative chemoradiotherapy in Japanese oral squamous cell carcinoma patients with risk factors of recurrence, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 査読有, Vol 123, 2017, 524-530

Nakao Y, Yamada S, Yanamoto S, Tomioka T, Naruse T, Ikeda T, Kurita H, Umeda M, Natriuretic peptide receptor A is related to the expression

of vascular endothelial growth factors A and C, and is associated with the invasion potential of tongue squamous cell carcinoma, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 査読有, Vol 46, 2017, 1237-1242

DOI:10.1016/j.ijom.2017.04.022

Naruse T, Yanamoto S, Okuyama K, Yamashita K, Omori K, Nakao Y, Yamada S, Umeda M, Therapeutic implication of mTORC2 in oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncology*, 査読有, Vol 1, 2017, 23-32

DOI:10.1016/j.oraloncology.2016.12.01

2

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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) 研究代表者

柳本 惣市 (YANAMOTO, Souichi)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号: 10315260