

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11296

研究課題名(和文) 口腔癌の薬剤耐性関連エクソソームmicroRNAの同定と診断・治療への応用

研究課題名(英文) The identification of drug resistance-related exosome microRNA and the applications for diagnosis and treatment in oral cancer

研究代表者

中山 秀樹 (Nakayama, Hideki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：70381001

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)：【背景】口腔扁平上皮癌(OSCC)におけるmiRNA発現の臨床的意義は不明なため、OSCC患者における循環miRNA発現を調査した。【方法】当科で治療を行い、血液サンプルが得られたOSCC患者55例を対象とし、血清中のmiR-1290をリアルタイムPCRで調べた。全例CRT 30Gyを施行した後に根治的手術を施行した。【結果】miR-1290発現量は分化度、CCRTの病理学的治療効果、再発の有無と有意に相関し、miR-1290発現量は患者予後とも相関した。【結論】循環マイクロRNAであるmiR-1290は、OSCC患者のCRTの治療効果予測と予後予測の有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The prognostic significance of circulating miRNAs in oral cancer patients has not been fully explored. The purpose of this study was to determine the clinical significance of circulating miRNAs in patients with oral cancer. Oral cancer patients who underwent surgery following chemoradiotherapy were enrolled. And circulating miRNA-1290 in blood serum prior to treatment was determined by quantitative RT-PCR in 55 patients. The associations between miRNA-1290 expression and various clinicopathological features were examined, and the effects of miRNA-1290 on the prognosis were evaluated. A Cox regression analysis based on the disease-free survival (DFS) revealed miR-1290 expression and pathological response to chemoradiotherapy to be significant prognostic factors in oral cancer patients. We demonstrated that miRNA-1290 expression pattern in pretreatment serum of oral cancer patients may have potential as a biomarker for outcome of CRT.

研究分野：医歯薬学

キーワード：microRNA

1. 研究開始当初の背景

MicroRNA (miRNA) は、18-25 塩基からなる低分子の non-coding RNA であり、複数の標的 mRNA と特異的に結合し、翻訳阻害や mRNA 分解を介して多くの遺伝子やタンパク質の発現を制御している。多様なヒト腫瘍細胞株に対する 10 万種類以上の化学物質の抗癌活性を網羅的に調べた National Cancer Institute (NCI) の研究結果などから、各種癌細胞における miRNA 発現と薬剤耐性が密接に関わっていることが次第に明らかとなってきた (Blower et al, Mol Cancer Ther, 2007)。また、最近の報告は、miRNA の発現状態が薬剤感受性の指標として有用である可能性、さらには miRNA が抗癌剤耐性克服のための治療ツールになりうる可能性を示唆している (Kasinski et al, Nat Rev Cancer, 2011)。一方、口腔扁平上皮癌 (OSCC) の抗癌剤耐性を制御する miRNA に関する報告はほとんどみられない。

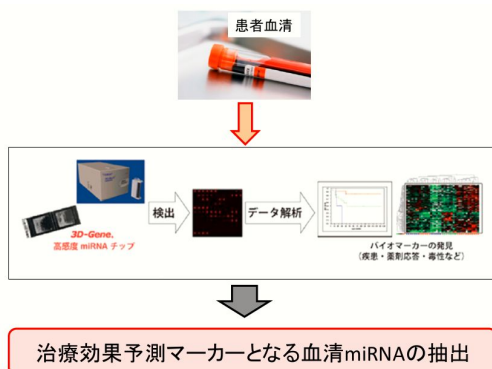
2. 研究の目的

薬剤耐性関連のエクソソーム microRNA を特定し、薬剤耐性に関わる機能の検証を経て、診断と治療に応用することである。

3. 研究の方法

熊本大学医学部附属病院・歯科口腔外科で治療を行い、血液サンプル (治療前の採血) が得られた OSCC 患者 55 名を対象とした。術前化学放射線療法 (CRT) は、5-FU 系抗癌剤である S-1 を 2 週間連続投与し、放射線は 1 日 2 Gy を週 5 日、計 30 Gy 照射した。全ての患者は術前 CRT を施行した後、根治的手術を行った。

術前治療効果が良好/不良の 2 群間での循環 miRNA の発現をマイクロアレイにて解析し、治療効果不良群で発現亢進を認めた miRNA について各種臨床項目との検討を行った。



4. 研究成果

miRNA マイクロアレイの結果より、miR-223、miR-659、miR-1290 の 3 つの miRNA が治療効果不良群で有意に上昇していることが明らかとなった。それらの miRNA について、OSCC 患者 55 例を対象として血清中の各 miRNA 発現と臨床病理学的検討を行った

ところ、miR-223 高発現は局所再発、miR-659 高発現は pT-stage、pN-stage、遠隔転移の有無と相関を認めた。一方、miR-1290 発現量は分化度、CRT の病理学的治療効果、再発の有無と有意に相関した。興味深いことに、miR-1290 発現量は患者予後とも相関した。

MIR-1290 と発現と各種臨床項目との関連(単変量解析)

項目	n	High	Low	P-value
分化度				
高分化	43	28(65%)	17(39%)	0.030*
中分化	12	3(25%)	9(75%)	
治療効果				
Grade ≤ II (治療効果不良)	12	3(25%)	9(75%)	0.030*
Grade ≥ III (治療効果良好)	43	28(65%)	17(39%)	
再発				
再発あり	12	3(25%)	9(75%)	0.030*
再発なし	43	28(65%)	17(39%)	

MIR-1290 と発現と予後との関連(多変量解析)

項目	スコア	リスク比 (95% CI)	全生存	P-value	無病生存	P-value
年齢						
≤ 65	0	1.112(0.36-3.97)	0.860		0.989(0.31-3.41)	0.958
> 65	1					
性別						
男性	1	0.507(0.15-1.68)	0.296		0.415(0.12-1.60)	0.193
女性	0					
pT-stage						
T1, T2	1	6.441(1.28-40.9)	0.023*		8.454(1.66-53.4)	0.009**
T3	2					
T4	3					
pN-stage						
N 0	0	31.33(5.28-250)	<0.001**		42.49(6.77-347)	<0.001**
N 1, 2a	1					
N 2b	2					
N 2c	1					
N 2d	3					
原発巣						
舌	1	0.849(0.14-4.69)	0.854		1.55(0.31-7.24)	0.581
下咽頭肉	2					
上咽頭肉	3					
口癌	4					
扁桃癌	5					
分化度						
高分化	0	3.562(0.91-14.7)	0.069		3.16(0.85-12.6)	0.068
中分化	1					
腫瘍組織学						
Grade 0, I, IIa	1	0.225(0.05-0.85)	0.027*		0.115(0.02-0.46)	0.002**
Grade IIb	2					
Grade III, IV	3					
miRNA 発現						
High	0	2.82(0.91-10.4)	0.074		3.80(0.21-14.6)	0.021*
Low	1					

CI, confidence interval; *P < 0.05, **P < 0.01

現在までの達成度

循環 miRNA の一つである miR-1290 の発現は、単変量解析において、OSCC の分化度、CRT に対する組織学的治療効果、再発、予後と有意な相関を示した。さらに、多変量解析においても、miR-1290 の発現亢進は、pTstage および pN-stage、CRT の組織学的治療効果、無病生存率との間に有意な相関を認めた。OSCC における血清 miRNA の発現と予後を解析した報告はほとんどなく先駆的成果と考えられ、結果の一部は現在英文科学雑誌に投稿準備中である。

今後の研究の推進方策

miR-1290 は、腫瘍細胞やその周囲間質に対する癌抑制的マイクロ RNA (tumor suppressor-miR) として機能していると考えられ、他癌腫における過去の報告でも miR-1290 が癌抑制的に機能する報告もある。miR-1290 のターゲットとして Notch1 が挙げられる。Notch1 は近年 OSCC において癌遺伝子として作用する報告があり、miR-1290 が腫瘍細胞や間質細胞の Notch1 の発現を制御することで癌抑制的に機能していると考えられる。今後は、miR-1290 の Notch1 制御による EMT 促進、幹細胞性の獲得、血管新生など、OSCC の治療抵抗性との関連を中心に miR-1290 の機能分析を進めていく予定である。一方、血清 miRNA 発現は不安定であり、解析するコホートなどによって結果が異なることが示唆されている。そこで、解析する症例を変えて再現性を確認したところ、一部先

行研究の結果とは異なる miRNA 群の変動が認められた。この結果は、臨床検体を用いた候補 miRNA 絞り込みの限界を示唆するものであると考えられた。より普遍性の高い候補 miRNA を絞り込む為、現在、当科で樹立した放射線耐性 OSCC 細胞株の exosome から抽出した miRNA の発現解析を準備中である。

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 24 件)

1. Hirata K, Nakaura T, Okuaki T, Kidoh M, Oda S, Utsunomiya D, Namimoto T, Kitajima M, Nakayama H, Yamashita Y. Comparison of the image quality of turbo spin echo- and echo-planar diffusion-weighted images of the oral cavity. **Medicine (Baltimore)** 97(19):e0447, 2018 査読有 doi: 10.1097/MD.0000000000010447.
2. Shinriki S, Jono H, Maeshiro M, Nakamura T, Guo J, Li JD, Ueda M, Yoshida R, Shinohara M, Nakayama H, Matsui H, Ando Y. Loss of CYLD promotes cell invasion via ALK5 stabilization in oral squamous cell carcinoma. **J Pathol.** 244(3):367-79, 2018 査読有 doi: 10.1002/path.5019.
3. Nagata, M, Kusafuka K, Yoshida R, Kawahara K, Nakagawa Y, Nakamoto M, Shinohara M, Nakayama H. Mucinous adenocarcinoma with signet ring cell features of the sublingual gland: A case report with an immunohistochemical analysis **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, edicine, and Pathology** 査読有 doi: 10.1016/j.ajoms.2017.12.008
4. Sakata J, Yamana K, Yoshida R, Matsuoka Y, Kawahara K, Arita H, Nakashima H, Nagata M, Hirose A, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Hiraki A, Shinohara M, Toya R, Murakami R, Nakayama H. Tumor budding as a novel predictor of occult metastasis in cT2N0 tongue squamous cell carcinoma. **Hum Pathol.** published online on Jan. 4, 2018 査読有 doi: 10.1016/j.humpath.2017.12.021.
5. Tsuruta M, Ueda S, Yew PY, Fukuda I, Yoshimura S, Kishi H, Hamana H, Yatsuda J, Irie A, Senjyu S, Yuba E, Kamba T, Eto M, Nakayama H, and Nishimura Y. Bladder cancer-associated cancer-testis antigen-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes induced CD4+ T cells expressing converged T-cell receptor genes in vitro. **OncImmunity** published online on Jan. 5, 2018 査読有 doi: 10.1080/2162402X.2017.1415687.
6. Sakata S, Matsuoka Y, Kawahara K, Kakiuchi Y, Takaki A, Hirose A, Yoshida R, Saeki S, Fujii K, Nakayama H. Severe interstitial pneumonia associated with anti-PD-1 immune checkpoint antibody after talc slurry pleurodesis. **Respir Investig.** 56(2):195-8, 2018 査読有 doi: 10.1016/j.resinv.2017.11.006.
7. Arita H, Nagata M, Yoshida R, Matsuoka Y, Hirose A, Kawahara K, Sakata J, Nakashima H, Kojima T, Toya R, Murakami R, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H. FBWX7 expression affects the response to chemoradiotherapy and overall survival among patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study **Tumor Biol.** 39(10):1010428317731771, 2017 査読有 doi: 10.1177/1010428317731771.
8. Murakami R, Semba A, Kawahara K, Matsuyama K, Hiraki A, Nagata M, Toya R, Yamashita Y, Oya N, Nakayama H. Concurrent chemoradiotherapy with S-1 in patients with stage III-IV oral squamous cell carcinoma: A retrospective analysis of nodal classification based on the neck node level. **Mol Clin Oncol.** 7(1):140-4, 2017 査読有 doi: 10.3892/mco.2017.1276.
9. Tsukamoto H, Fujieda K, Hirayama M, Ikeda T, Yuno A, Matsumura K, Fukuma D, Nakayama H, Senju S, Nishimura Y. Soluble IL-6R expressed by myeloid cells Th1 differentiation and drives tumor progression. **Cancer Res.** 7(9):2279-91, 2017 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2446.
10. Kawahara K, Hiraki A, Yoshida R, Arita H, Matsuoka Y, Yamashita T, Koga K, Nagata M, Hirose A, Fukuma D, Nakayama H. Salivary duct carcinoma treated with cetuximab-based targeted therapy: a case report **Mol Clin Oncol.** 6(6):886-92, 2017 査読有 doi: 10.3892/mco.2017.1226
11. Nakamoto M, Ishihara K, Watanabe T, Hirose A, Hino S, Shinohara M, Nakayama H, Nakao M. The Glucocorticoid Receptor Regulates the ANGPTL4 Gene in a CTCF-Mediated Chromatin Context in Human Hepatic Cells. **PLoS One** 12(1):e0169225, 2017 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0169225. Sakata J, Yoshida R, Matsuoka Y, Nagata M, Hirose A, Kawahara K, Nakamura T, Nakamoto M, Hirayama M, Takahashi N, Nakashima H, Arita H, Ogi, H, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H.
12. Predictive value of the combination of SMAD4 expression and lymphocyte infiltration in malignant transformation of oral leukoplakia. **Cancer Med.** 6(4) :730-8, 2017 査読有 doi: 10.1002/cam4.1005.
13. Takahashi N, Wei F, Watanabe S, Hirayama M, Ohuchi Y, Fujimura A, Kaitsuka T, Sawa T,

- Nakayama H, Akaike T, Tomizawa K. Reactive sulfur species regulate tRNA methylation and contribute to insulin secretion. **Nucleic Acids Res.** 45(1):435-45, 2017 査読有 doi: 10.1093/nar/gkw745.
14. Yoshida R, Ito T, Hassan WA, Nakayama H. Notch1 in oral squamous cell carcinoma. **Histol Histopathol.** 32(4): 315-23, 2017 査読有 doi: 10.14670/HH-11-821.
15. Murakami R, Nakayama H, Semba A, Hiraki A, Nagata M, Kawahara K, Shiraishi S, Hirai T, Uozumi H, Yamashita Y. Prognostic impact of the level of nodal involvement: A retrospective analysis of patients with advanced oral squamous cell carcinoma. **Br J Oral Maxillofac Surg.** 55(1):50-5, 2017 査読有 doi: 10.1016/j.bjoms.2016.08.026
16. Koga K, Yoshida R, Nakamura T, Matsuoka Y, Takeshita H, Takahashi N, Nakamoto M, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H. A rare case of metachronous multiple supernumerary teeth in the bilateral premolar region of the mandible. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology** 29(2):132-5, 2017 査読有 doi.org/10.1016/j.ajoms.2016.08.007
17. Matsuoka Y, Nakayama H, Yoshida R, Hirosue A, Nagata M, Tanaka T, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Nakashima H, Shinriki S, Fukuma D, Ogi H, Hiraki A, Shinohara M, Toya R, Murakami R. IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer** 115(10):1234-44, 2016 査読有 doi: 10.1038/bjc.2016.327.
18. Tanaka T, Imamura T, Yoneda M, Irie A, Ogi H, Nagata M, Yoshida R, Fukuma D, Kawahara K, Shinohara M, Nakayama H. Enhancement of active MMP release and invasive activity of lymph node metastatic tongue cancer cells by elevated signaling via the TNF- α -TNFR1-NF- κ B pathway and a possible involvement of angiopoietin-like 4 in lung metastasis. **Int J Oncol.** 49(4):1377-84, 2016 査読有 doi: 10.3892/ijo.2016.3653.
19. Hiraki A, Fukuma D, Nagata M, Shiraishi S, Kawahara K, Matsuoka Y, Nakagawa Y, Yoshida R, Tanaka T, Yoshitake Y, Shinohara M, Yamashita Y, Nakayama H. Sentinel lymph node biopsy reduces the incidence of secondary neck metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Mol Clin Oncol.** 5(1):57-60, 2016 査読有 doi: 10.3892/mco.2016.882
20. Hiraki A, Yamamoto T, Yoshida R, Nagata M, Kawahara K, Nakagawa Y, Matsuoka Y, Tanaka T, Hirosue A, Fukuma D, Ikebe T, Shinohara M, Nakayama H. Factors affecting volume change of myocutaneous flaps in oral cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 45(11):1395-99, 2016 査読有 doi: 10.1016/j.ijom.2016.04.014.
21. Imamura Y, Haruta M, Tomita Y, Matsumura K, Ikeda T, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Mizuta H, Nishimura Y, Senju S. Generation of Large Numbers of Antigen-Expressing Human Dendritic Cells Using CD14-ML Technology. **PLoS One** 11(4):e0152384, 2016 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0152384.
22. Nakashima H, Matsuoka Y, Yoshida R, Nagata M, Hirosue A, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Hiraki A, Nakayama H. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study. **BMC Cancer** 16(1):41, 2016 査読有 doi: 10.1186/s12885-016-2079-6.
23. Hirayama M, Tomita Y, Yuno A, Tsukamoto H, Senju S, Imamura Y, Sayem MA, Irie A, Yoshitake Y, Fukuma D, Shinohara M, Hamada A, Jono H, Yuba E, Kono K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakayama H, Nishimura Y. An oncofetal antigen, IMP-3-derived long peptides induce immune responses of both helper T cells and CTLs. **Oncimmunology** 5(6):e1123368, 2016 査読有 doi: 10.1080/2162402X.2015.1123368.
24. Yoshitake Y, Fukuma D, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Tanaka T, Nagata M, Takamune Y, Kawahara K, Nakagawa Y, Yoshida R, Hirosue A, Ogi H, Hiraki A, Jono H, Hamada A, Yoshida K, Nishimura Y, Nakamura Y, Shinohara M. Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS. **Clin Cancer Res.** 21(2):312-21, 2015 査読有 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0202.

[学会発表](計4件)

1. Hikaru Nakashima, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirosue, Kenta Kawahara, Jyunki Sakata, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara and Hideki Nakayama. Investigation of the clinical significance of circulating miRNA-1290 in oral squamous cell carcinoma 第30回台湾口腔顎顔面外科学会年次総会、2017年3月4-5日、台北市国際会議中心、台湾、ポスター、優秀ポスター
2. Investigation of the clinical significance of circulating miRNA-1290 in oral squamous cell carcinoma. Hikaru Nakashima, Ryoji

Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Kenta Kawahara, Jyunki Sakata, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki and Hideki Nakayama. 第 75 回日本癌学会学術大会、2016 年 10 月 6-8 日、パシフィコ横浜、神奈川、ポスター

3. Tumor-suppressive microRNA-X regulates cancer cell migration, invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma by targeting metastasis-related molecule. Ryoji Yoshida, Junki Sakata, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Kenta Kawahara, Hikaru Nakashima, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara and Hideki Nakayama. 第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016 年 8 月 10-12 日、広島大学 応仁会館、広島、ポスター
4. 口腔扁平上皮癌患者における循環 miRNA の発現に関する臨床的検討 中嶋光, 吉田遼司, 廣末晃之, 有田英生, 坂田純基, 松岡祐一郎, 川原健太, 中川純泰, 永田将士, 中山秀樹 第 40 回日本頭頸部癌学会、2016 年 6 月 9-10 日、大宮ソニックシティ、埼玉、ポスター

〔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・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：70381001

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()