

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11300

研究課題名(和文) 長鎖non-codingRNAの制御を介した新たな口腔癌治療戦略

研究課題名(英文) New strategy for oral cancer treatment by control of long non-coding RNA

研究代表者

山本 一彦 (YAMAMOTO, KAZUHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20243842

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)：Malic enzyme 1 (ME1)は energy産生に関わる多機能蛋白で、種々の癌で発現亢進がみられる。口腔扁平上皮癌(OSCC)では48%で中等度から高度に発現し、pT、pN、臨床stage、組織学的gradeと予後不良と相関していた。ME1をknockdownまたはlanthanideで不活化すると細胞増殖と運動を抑制し、上皮間葉転換を低下させ、energy代謝を酸化的リン酸化に、redox statusを酸化型にシフトさせた。マウスモデルにおいてlanthanideは腫瘍の増殖を抑え、生存期間を延長した。以上より、ME1はOSCC治療の有用な分子標的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Malic enzyme 1 (ME1) is a multifunctional protein involved in energy production and overexpressed in various cancers. We examined expression and function of ME1 in oral squamous cell carcinomas (OSCC). Immunohistochemical expression of ME1 was moderated to strong in 48 % of OSCCs and correlated with pT, pN clinical stage and histological grade. Moderate to strong ME1 expression indicated a worse prognosis than did weak ME1 expression. Malic enzyme 1 knockdown or inactivation by lanthanide inhibited cell proliferation and mortality and suppressed the epithelial-mesenchymal transition in HSC3 human OSCC cells. Knockdown of ME1 also shifted energy metabolism from aerobic glycolysis and lactate fermentation to mitochondrial oxidative phosphorylation and the redox status from reductive to oxidative. In a mouse tumor model, lanthanide suppressed tumor growth and increased survival time. These findings reveal that ME1 is a valid target for molecular therapy in OSCC.

研究分野：oncology

キーワード：Oral cancer long non-coding RNA malic enzyme

1. 研究開始当初の背景

口腔癌に対する化学療法、放射線療法さらに分子標的治療には一定の効果が認められるが、その効果には限界がある。これは癌細胞の中に種々の治療に抵抗する機序が存在するため、これらの機序を標的とした効果的な治療の開発が望まれる。近年、長鎖 non-coding RNA (lncRNA) の機能が次第に明らかにされつつあり、lncRNA が個体の発生や細胞の恒常性維持に重要な役割を担っていること、さらに癌においても浸潤や転移、治療抵抗性の獲得に関与していることが報告されるようになった。そこで、lncRNA の発現と機能を解明し、lncRNA が関与する過程を制御することにより口腔癌に対する治療効果を高める事ができるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌において EMT や CSCs といった治療抵抗性の獲得に関わる lncRNA について網羅的に解析することによりその候補 lncRNA を同定し、これらの lncRNA が口腔癌の治療抵抗性の獲得にどのような役割を演じているかを明らかにすることにより、lncRNA の制御を介した新たな治療戦略を模索することである。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株および口腔癌における long non-coding RNA の発現

高転移性口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 と低転移株 HSC4 における long non-coding RNA (lncRNA) の発現について検討を行った。lncRNA は、大腸癌において肝転移との相関が報告されている 10 種の lncRNA のうち NR_036537 (RAB6C antisense RNA 1), NR_036580 (DPP10 antisense RNA 1) および NR_002795 (HOXA11 antisense RNA) を対象とした。

(2) 口腔癌における long non-coding RNA の発現とその悪性度との関係

NR_036537 (RAB6C antisense RNA 1), NR_036580 (DPP10 antisense RNA 1) および

NR_002795 (HOXA11 antisense RNA) の標的遺伝子として同定した NQO2 (NM_000904) の発現について 16 例の口腔扁平上皮癌症例 (OSCC) において検討するとともに、その臨床像との関連について検討を行った。さらに HSC3 細胞株における NR_002795 および NQO2 の発現と悪性度との関連について検討した。

(3) 口腔癌における Malic enzyme 1 の役割

Malic enzyme 1 (ME1) は、癌細胞において energy metabolism、redox cycle、epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関与しており、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 治療の分子標的になりうる。そこで、OSCC における ME1 の役割について検討した。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株および口腔癌における long non-coding RNA の発現

高転移性口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 では低転移株 HSC4 に比較しそれぞれ 6 倍、8 倍、4.5 倍の mRNA 発現が RT-PCR で認められた。また、同 RNA のターゲット遺伝子とされる NQO2 (NM_000904) の発現を検討すると、HSC3 では HSC4 の約 55% に発現が低下していた。

ヒト口腔扁平上皮癌の病理組織標本を削り出して抽出した RNA を用いた検討では、NR_002795 はリンパ節転移陽性例 5 例では陰性例 8 例の約 3 倍の発現を示し、NQO2 発現は約 63% に低下していた。

lncRNA はネットワークをなして遺伝子発現に影響を与えているとされているが、今回検討した 3 種の lncRNA は大腸癌でも肝転移症例で高発現を示しており、癌抑制性に作用する NQO2 発現を抑制することにより転移を促進すると考えられている。同様の変化が口腔扁平上皮癌でも認められ、口腔癌においても高転移能症例のマーカーとなる可能性がある。

(2) 口腔癌における long non-coding RNA の発現とその悪性度との関係

16 例の OSCC について NR_002795 RNA および NQO2 RNA の発現を検討すると、N-症例と N+ 症例では NR_002795 は正常の 159% および 194% ($P < 0.05$)、NQO2 は 45% および 30% ($P < 0.05$)

であった。また、NR_002795 RNAおよびNQO2 RNAの発現は、 $r = -0.7427$ ($P = 0.0010$) と逆相関を示していた。

次に、NR_002795を高発現するHSC3ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対して、NR_002795 siRNAを処理しノックダウンするとNQO2 RNAの発現は約2.4倍に増大した。さらに、NR_002795のノックダウンに伴い、HSC3細胞の増殖能、浸潤能は低下し、アポトーシスは増加した。

以上のように、NR_002795は口腔扁平上皮癌の悪性度の指標となる可能性が示されたとともに、分子治療標的としても有望な可能性が示唆された。

(3) 口腔癌における Malic enzyme 1 の役割

ME1の発現を119例のOSCCにおいて免疫組織化学的に検討したところ、多様なパターンで細胞質に陽性を示した。非癌領域では発現はほとんどみられなかった。ME1はp53陽性細胞と異なった細胞に陽性を示した。ME1の発現はT因子、N因子と臨床stageの間に有意に相関が見られた。ME1の発現は高分化OSCCにおいて組織的にhigh gradeのOSCCより高かった。また、ME1の発現は患者の予後と有意の相関がみられ、ME1の低発現例では5%の患者が死亡したが、中等度から高発現例では27%の患者が死亡していた。平均生存期間はME1が中等度から高発現例では低発現例より短く、Kaplan-Meier法において有意に予後が悪かった。

次にHSC3細胞を用いた *in vitro* の実験において、ME1をknockdownすると、100および200mg/dLのglucoseの存在下でHSC3細胞の増殖を抑制した。wound healing assayにおいてMEのinhibitorであるlanthanideで処理するとHSC3細胞で覆われる領域が85%から38%に低下した。*in vitro* invasion assayにおいてtype IV collagenでcoatしたmembraneへのHSC3細胞のinvasionを52%抑制した。HSC3細胞のEMT associated gene productを変化させ、E-cadherinとclaudin-4 mRNAレベルが増加し、snailとvimentin蛋白のレベルが減少した。またPKM (glycolysis)、G6PD (PPP)、ACC (TCA)の蛋白レベルを増加させたが、GLUD1 (glutaminolysis)の蛋白レベルは変化させなかった。stem cell activityのマーカーであるALP activityを25%低下させた。逆にglutamineのloadはALP activityを48%

増加させた。CD44とnanogのmRNAの発現を低下させたが、glutamineをloadするとこれらは増加した。HSC3細胞の増殖とlactate産生が抑制された。特にglucose freeの状態では顕著であった。glutamine添加下での増殖の促進とlactateの産生がみられなくなった。この結果はHSC3細胞がglucoseの存在しない状態において解糖ではなくME1によって産生されたpyruvateをlactate fermentationに用いていることを示していると考えられた。glucoseの濃度に関わらずGSH/GSSH比が低下しHSC3細胞の酸化性ストレスが増強するとともにmitochondriaの領域が90%増大した。

最後にBALB/cSlc-nu/nuマウスにHSC3細胞 10^7 個を皮下に接種し、lanthanideによる腫瘍の増殖抑制効果について検討した。lanthanideは腫瘍の増殖を45%抑制し、マウスの死亡率を100%から60%に低下させるとともに、50%生存期間を28日から39日に延長した。

以上の結果より、ME1はlactate fermentationを増加させ、redox statusを維持し、stemnessとEMTを促進することによりOSCCの増殖を促進することが示唆された。したがって、ME1はOSCC治療の有用な分子標的となりうることを示された。

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2件)

Expression of cytosolic malic enzyme (ME1) is associated with disease progression in human oral squamous cell carcinoma. Nakashima C, Yamamoto K, Fujiwara-Tani R, Katsuragawa H, Shimomura M, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Matsushima S, Fujii K, Ohmori H, Sasahira T, Sasaki T, Kitadai Y, Kirita T, Kuniyasu H. *Chungcheong Cancer Sci* 109(6): 2036-2045, 2018. doi: 10.1111/Cas.13594.

Programmed death ligand 1 (PD-L1) expression and tumor microenvironment: Implication for patients with oral precancerous lesions. Yagyuu T, Hatakeyama K, Imada M, Kurihara M, Matsusue Y, Yamamoto K, Obayashi C, Kirita

1. 査読あり Oral Oncol 68: 36-43, 2017.
doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.03.006.

〔学会発表〕(計 11 件)

多機能タンパク質 Malic enzyme 1 の口腔扁平上皮癌における腫瘍促進機序. 中嶋 千恵、栗原 都、笹平 智則、山本 一彦、桐田 忠昭. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2017.10.20-22, 京都.

Malic enzyme 1 による口腔扁平上皮癌促進作用. 中嶋 千恵、栗原 都、山本 一彦、パワール・ウジャール、笹平 智則、桐田 忠昭、國安 弘基. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017.9.28-30, 横浜.

Malic enzyme 1 の口腔扁平上皮癌における腫瘍促進機序. 中嶋 千恵、谷 里奈、パワール・ウジャール、山本 一彦、笹平 智則、桐田 忠昭、國安 弘基. 第 106 回日本病理学会総会 2017.4.27-29, 東京.

口腔扁平上皮癌における Malic enzyme 1 の発現, 機能及び予後への影響. 中嶋 千恵、栗原 都、山本 一彦、笹平 智則、桐田 忠昭. 第 35 回日本口腔腫瘍学会 2017.1.26-27, 福岡.

口腔扁平上皮癌における代謝調整因子 malic enzyme の重要性. 中嶋 千恵、栗原 都、笹平 智則、山本 一彦、桐田 忠昭. 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2016.11.25-27, 千葉.

口腔扁平上皮癌における malic enzyme 発現の意義. 中嶋 千恵、桐田 忠昭、栗原 都、松島 紗弥子、パワール・ウジャール、山本 一彦、笹平 智則、國安 弘基. 第 75 回日本癌学会学術大会 2016.10.6-8, 横浜.

口腔扁平上皮癌における malic enzyme の発現. 中嶋 千恵、桐田 忠昭、栗原 都、羅 奕、山本 一彦、岩田 直也、桂川 広幸、笹平 智則、國安 弘基. 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.12-14, 仙台.

口腔扁平上皮癌におけるピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの発現. 栗原 都、笹平 智則、山本 一彦、國安 弘基、桐田 忠昭. 第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2016. 1. 21-22, 横浜.

口腔扁平上皮癌のエネルギー代謝経路における ME1 の作用の検討. 中嶋 千恵、栗原 都、笹平 智則、山本 一彦、桐田 忠昭. 第 60 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 10.16-18, 2015, 名古屋.

口腔扁平上皮癌における malic enzyme の発現. 中嶋 千恵、桐田 忠昭、栗原 都、羅 奕、山本 一彦、岩田 直也、桂川 広幸、笹平 智則、國安 弘基. 第 74 回日本癌学会学術総会 10.8-10, 2015, 名古屋.

HuD promotes progression of oral squamous cell carcinoma. Kurihara M, Sasahira T, Yamamoto K, Kuniyasu H, Kirita T. 第 39 回日本頭頸部癌学会 第 4 回アジア頭頸部癌学会 6.3-6, 2015, 神戸.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 一彦 (YAMAMOTO Kazuhiko)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20243842

(2)研究分担者

國安 弘基 (KUNIYASU Hiroki)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00253055

桐田 忠昭 (KIRITA Tadaaki)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70201465

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし