

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20540

研究課題名(和文) 癌幹細胞の特性から口腔癌早期診断・転移抑制を可能にする遺伝子配送システムの開発

研究課題名(英文) A development of gene delivery system that enable to making early diagnosis and inhibiting metastasis.

研究代表者

石井 広太郎 (Kotaro, Ishii)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60596386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1. 腺様嚢胞癌細胞株を用いてリンパ節転移細胞株の樹立に成功した。この転移細胞株と原発巣細胞株についてマイクロアレイ解析を行い比較検討をおこなった。転移細胞株においてNNMTが二千倍もの上昇を認めた。腺様嚢胞癌においても転移にNNMTが関与する可能性が示唆された。2. 患者群、健常群の全血より血清を分離、総RNAを抽出しDNA Micro Arrayにて網羅的解析を行った。口腔癌患者の血清においてmiR-183の発現が有意に亢進していた。また頸部リンパ節転移群の血清においてもmiR-183が亢進していたことから、miR-183は口腔扁平上皮癌転移の指標となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：1. We established a lymph node metastatic subline from a highly metastatic AdCC cell line. DNA microarray hybridization and scanning were performed to compare RNA expression in lymph node metastatic cells with highly metastatic cells. The expression level of NNMT (Nicotinamide N-methyltransferase) was up-regulated by 2000 times in lymph node metastatic cells. NNMT is known as a tumorigenesis agent. It was suggests that NNMT is involved in the metastasis in the AdCCs. 2. We performed miRNA microarray to identify differential miRNAs in serum pools of 6 OSCC patients and 6 health control. Then, we analyzed expression levels of miRNA in each serum sample of OSCC patients and control by real time PCR. MiR-183 showed significant over expression in patient group and was concerned with metastasis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 転移機構

### 1. 研究開始当初の背景

我々がこれまで研究を続けてきた腺様嚢胞癌は口腔内においては最も頻度の高い唾液腺悪性腫瘍とされている。その特徴としては、神経・血管系へ浸潤性増殖、それに引き続く肺・骨への遠隔転移が挙げられる。本腫瘍の遠隔転移の発生率は60%と非常に高く、これにより治療は極めて困難であり、当科の一次転移症例5年生存率は30%を下回る。放射線化学療法への感受性も低く、本腫瘍の集学的治療法の開発は大きな課題である。しかし本腫瘍の浸潤・転移の分子機構については十分に明らかにされておらず、成績は極めて不良である。つまり、本腫瘍の浸潤・転移メカニズムを正確に把握したうえで、分子標的治療がなされるべきであると考えられた。

### 2. 研究の目的

癌幹細胞は癌の悪性形質である浸潤転移をもたらす、さらに薬剤耐性・放射線耐性から治療困難や再発の原因となることから、新たな治療標的として注目されている。一方でマイクロRNA (miRNA) は遺伝子の翻訳調節に直接かかわる因子として治療や診断への応用が期待されている。そこで本研究では  
(1) 腺様嚢胞癌細胞株におけるリンパ節転移細胞株および肺転移細胞株の樹立  
(2) 血中・唾液中 miRNA 測定による新規口腔癌マーカー (転移マーカー) の発見  
(3) 口腔癌幹細胞の維持と誘導に必須な遺伝子検索と miRNA による癌幹細胞制御法の確立  
(4) エクソソーム miRNA を応用した口腔癌幹細胞制御による新規治療法の開発を目的とした。これにより口腔癌転移抑制および根治、転移の早期診断による治療成績の向上が期待できると考えられた。

### 3. 研究の方法

- (1) 転移モデルマウスにおけるリンパ節転移および肺転移巣転移細胞株の樹立  
我々の研究室で開発した腺様嚢胞癌細胞株を用いた *in vivo* selection 法は癌細胞に GFP を導入することにより励起光下で腫瘍形成、転移について目視することができるため、癌細胞をマウス舌に接種し、数週間後にリンパ節に転移を励起光下で確認・採取し、組織片培養法によりリンパ節転移細胞株を樹立する。
- (2) 培養癌細胞を用いた口腔癌特異的 miRNA の検索  
さまざまな部位からの培養癌細胞を用い、miRNA の発現を、miRNA マイクロアレイを用いて口腔癌細胞株と比較検討する。口腔癌細胞株に共通する特異的 miRNA を抽出する。さらに、口腔癌細胞株において実験的高転移株と低転移株との比較により悪性形質に関与する口腔癌特異的 miRNA を検索する。
- (3) 血中・唾液中マイクロRNA 測定による新規口腔癌マーカー (転移マーカー)

### の検索

担癌患者の血清・唾液と健常ボランティア血清・唾液との比較を各5検体程度により行い、数種類の候補 miRNA を抽出する。この候補 miRNA について症例数を増やして血清中 miRNA 量を real time PCR により検討する。

- (4) miRNA の口腔癌腫瘍マーカー・転移マーカー・予後マーカーとしての有用性の検討

miRNA が腫瘍の存在だけでなく転移マーカーもしくは予後マーカーになり得るかを経過観察中症例にまで拡大して統計学的に検討する。

### 4. 研究成果

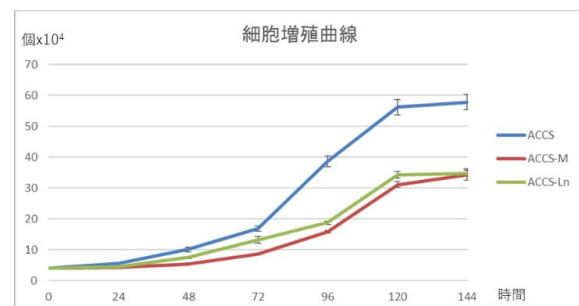
- (1) 腺様嚢胞癌細胞株におけるリンパ節転移細胞株および肺転移細胞株の樹立

PBS で調整した  $1 \times 10^6$  個の ACCS-M-GFP 細胞を6匹のマウス舌に接種した。数週間後マウス舌を観察すると、100%の確率でマウス舌に腫瘍塊を形成し、さらに100%の確率でリンパ節転移巣を形成した。転移を認めたリンパ節を摘出し、励起光観察下にリンパ節組織から転移組織片を摘出し培養皿へ接着させた。その後培養液を加え組織片培養法により細胞株樹立を行った。数日後、貼り付けた組織片から増殖してきた細胞を分離・培養し、これによりリンパ節転移細胞株を樹立することに成功した。このリンパ節転移細胞株を ACCS-LN-GFP とした。

以後、原発巣由来の親株 ACCS-GFP と高転移原発巣細胞株 ACCS-M-GFP と転移巣細胞株 ACCS-LN-GFP において生物学的特性の違いを検討した。(以降、GFP の記載は省略)

### 細胞増殖能の検討

腫瘍増殖能を検討する目的で連日細胞数の検定を行った。6穴ディッシュに  $4 \times 10^4$  個の細胞を播種し細胞数をカウントしたところ、全ての細胞で約120時間後にプラトーに達したことから、同等の細胞増殖能を有することがわかった。ACCS-M や ACCS-LN は ACCS に比べて細胞のサイズがやや膨大している可能性がある。

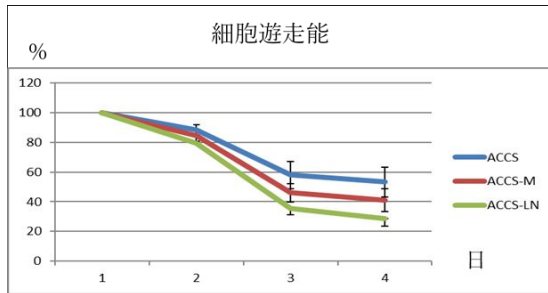


### 細胞遊走能の検討

細胞遊走能を検討する目的で Wound healing assay を用い、cell migration assay を行った。ACCS や ACCS-M と比較して ACCS-LN

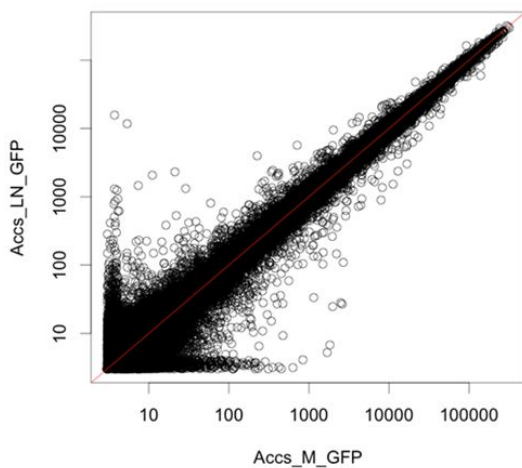
の遊走能が高いことが明らかとなった。

以上のことから、ACCS-LN は原発巣細胞株に比べ、細胞増速および遊走能の高い性質をもつ細胞集団であることが示唆された。



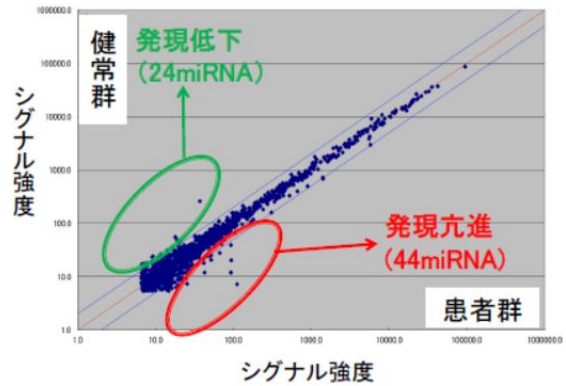
DNA マイクロアレイによる網羅的解析 ACCS-M と ACCS-LN を用いて DNA マイクロアレイ解析することで、転移に関連する分子の網羅的解析を行った。その結果、発現に有意差のある 1130 個の遺伝子がピックアップされた。これらの遺伝子のうち最も発現に差を認めたものが NNMT (ニコチンアミド-N-メチルトランスフェラーゼ) が二千倍もの上昇を認めた。この NNMT は癌の悪性化度(腫瘍増大、転移の有無、ステージング)が進行するに従い、発現が亢進することがわかっている。腺様嚢胞癌細胞株においても転移に NNMT が関与する可能性が示唆された。

Accs\_M\_GFP vs Accs\_LN\_GFP



(2) 血中・唾液中 miRNA 測定による新規口腔癌マーカー(転移マーカー)の発見

患者群血清(6名) 健常群血清(6名)の全血より血清を分離、Total RNA を抽出し、Micro Array にて網羅的発現解析を行った。中でも、患者群において4倍以上の発現亢進: miR-183, 125b, 4321、1/4以下の発現低下: miR-1224 を口腔扁平上皮癌に関連する可能性のある血清 miRNA として同定した。

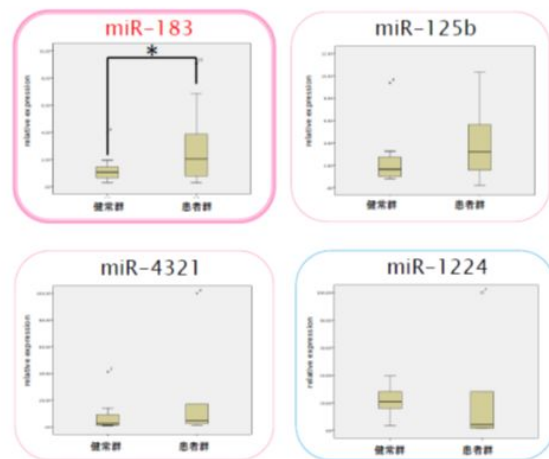


この4つの分子について、病理組織学的に口腔扁平上皮癌と診断された治療前の患者35名(うち8名は術前・術後)および健常者20名で比較を行ったところ、患者群で miR-183 の有意な発現の亢進を認めた。

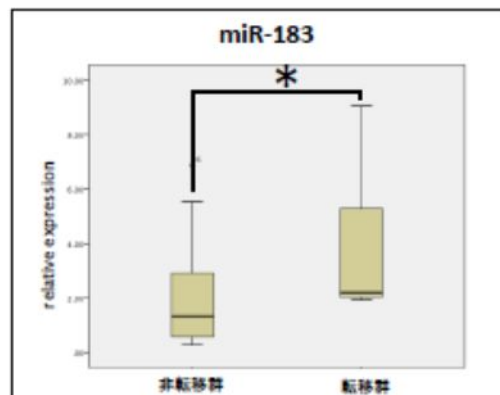
miRNA	患者群	健常群	患者群/健常群
hsa-miR-183	112.2	7.2	15.58
hsa-miR-125b	93.7	11.9	7.90
hsa-miR-4321	94.7	20.3	4.68
hsa-miR-1224	37.2	259.6	0.14

Micro Array 結果

原発腫瘍の大きさと miR-183 の発現に有意差は認めなかった。頸部リンパ節転移の有無で miR-183 の発現量を比較したところ、転移群において有意に発現の亢進を認めた。



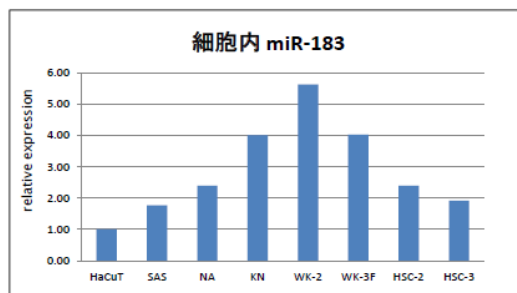
Mann-Whitney U 検定 \* < 0.05



miR-183 は口腔扁平上皮癌の腫瘍マーカーおよび転移の指標となる可能性が考えられた。

OSCC細胞株の細胞内におけるmiR-183の発現の検討

口腔扁平上皮癌細胞株 ( SAS, NA, KN, WK-2, WK-3F, HSC-2, HSC-3 )、表皮角化細胞株 ( HaCaT ) の細胞および培養上清より Total RNA を抽出し、cDNA を合成した後、リアルタイム PCR 法にて miR-183 の発現量を解析した。



表皮角化細胞株と比較し全ての OSCC 細胞内で miR-183 の発現が亢進していた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
石井広太郎 (ISHII, Kotaro)  
九州大学大学院歯学附  
顎顔面病態学分野  
顎顔面外科学講座・助教  
研究者番号：60596386

(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  
杉浦剛 (SUGIURA, Tsuyoshi)  
鹿児島大学顎顔面疾患制御学分野・教授  
研究者番号：40322292