

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20546

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるmiRNAによる抗癌剤耐性機構の解明と個別化治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms underlying chemoresistance through microRNA modulation and applications to individualized therapy in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

川原 健太 (Kawahara, Kenta)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90732735

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)：2種類の5-FU耐性OSCC細胞株とその親株のtotal RNAを抽出し、miRNAマイクロアレイ解析を行うことにより、miRNAの発現プロファイリングを調査した。解析の結果より、共通して発現が有意に増加したものはmiR-30aの1つであり、低下したものは認めなかった。miR-30aを細胞導入し、miR-30aを安定的に高発現した細胞株においてその耐性を認めた。またOSCC患者の治療前、術前化学放射線療法後、手術後および再発時の血清で、exosomal miRNAであるmiR-1290の低発現群は口腔癌における全生存率および無病生存率ともに有意に予後不良であることが解明された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to determine the functional role of the miRNA which is involved in 5-FU resistance in oral squamous cell carcinoma (OSCC). The human OSCC, and the 5-FU-resistant cell lines were used in this study. Then, on the basis of the miRNA microarray data that miR-30a is significantly upregulated in the resistant cell lines, we investigated the effects of miR-30a on 5-FU sensitivity. We produced two miR-30a overexpressing stable cell lines, and confirmed that both of them showed increased 5-FU resistance. Blood samples were collected before the administration of preoperative chemoradiotherapy for a routine laboratory analysis of the full blood count. Low expression of miR-1290 was significantly correlated with poor prognosis.

研究分野：歯科口腔外科学分野

キーワード：口腔癌 microRNA 抗癌剤耐性 exosomal microRNA

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部癌の約 60%を占める疾患であり、その 90%以上を口腔扁平上皮癌 (**Oral squamous cell carcinoma: OSCC**)が占めている。近年、OSCC の診断・治療法の選択肢は広がっているものの、その 5 年生存率は過去 30 年間ほとんど変化していない (*Jemal et al. Cancer Statistics 2012*)。その原因として、放射線や抗癌剤に対する治療抵抗性、あるいは高転移・浸潤能を獲得した細胞の存在が想定され問題となっている。これらの問題を解決するためには、上述のような悪性度の高い癌細胞の悪性形質獲得の解明が重要で、そのことが新たな治療法の開発や予後予測因子の発見につながっていくことが期待される。様々な角度からこの治療抵抗性 OSCC の研究が進められているが、依然として革新的な治療効果予測マーカーや新規治療法の開発には至っていない。

そのような中、近年、機能性小分子 RNA の一つである miRNA が有望な研究対象として注目され様々な癌の発症、進展に関わっていることが明らかになっている (*Garzon et al. Nat rev Drug discov 2010, Merritt et al. Cancer Res 2010*)。同時に癌における新規診断マーカーや治療標的として注目され、種々の癌腫で研究が進んでいる (*Cheng G. Adv Drug Deliv Rev 2014, Gallo A et al. Methods Mol Biol 2013*)。しかし、OSCC における発現制御や機能については未知な部分が多い。

### 2. 研究の目的

口腔に生じる主な悪性腫瘍は口腔扁平上皮癌 (**Oral squamous cell carcinoma: OSCC**) であり、口腔癌の 90%以上を占める。OSCC の治療法として外科療法、化学療法、放射線療法があり、これらの治療法を組み合わせた集学的治療が行われている。しかし、これらの治療法の進歩にも関わらず、治療成績はほとんど向上していない。その原因の一つに、放射線や抗癌剤に対する治療抵抗性が挙げられる。近年、様々な側面からその克服が目指されているが、機能性小分子である microRNA (miRNA) による新たな治療抵抗性獲得機構が多くの癌腫で報告されている。申請者も、OSCC 患者において miRNA の発現調整に関わる分子や miRNA 自身が 5-FU 系抗癌剤の耐性に関わることを見出してきた。しかし、OSCC における miRNA と抗癌剤耐性との関係については未解明な部分が多い。そこで、本研究では miRNA を介した OSCC の癌剤耐性制御機構解明を行うとともに、miRNA に注目した新たな 5-FU 系抗癌剤の効果予測マーカーや治療戦略を探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 【miRNA マイクロアレイによる 5-FU 耐性関連 miRNA の抽出と機能解析】

OSCC 細胞株より樹立した 2 種類の 5-FU 耐性株を用い、その親株と耐性株による miRNA マイクロアレイ解析を行い網羅的データを収集している。本研究では 2 種類の耐性株で共通して発現の上昇あるいは低下を認める miRNA に着目し、OSCC の 5-FU 耐性における miRNA の機能解析を行う予定である。また、miRNA は同時に複数の遺伝子を制御することが知られており、同時に発現制御を受ける複数の標的遺伝子の中からより耐性への関連を強く疑わせる分子を見出す必要がある。そこで、miRNA マイクロアレイに供したサンプルを元に DNA マイクロアレイも同時に行う予定である。それにより 5-FU 耐性に関連する miRNA の標的遺伝子を絞り込むことが容易になると考えられる。マイクロアレイ解析において耐性株で共通して miRNA が発現上昇あるいは発現低下している miRNA は 5-FU 耐性に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。そこで、遺伝子導入法を用いて miRNA を恒常的に過剰発現あるいは発現抑制させた OSCC 細胞株の樹立を目指す。リアルタイム PCR、薬剤感受性試験、ウエスタンブロッティング法などを用いて、樹立した OSCC 培養細胞の 5-FU 感受性を検証し、かつ DNA マイクロアレイの結果を参考に miRNA が 5-FU 耐性に関与するどのような分子を標的としているかを検索する。

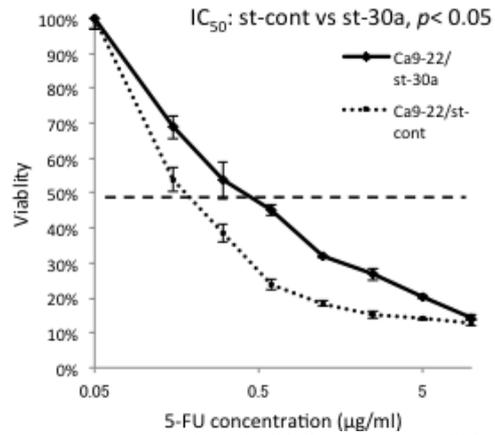
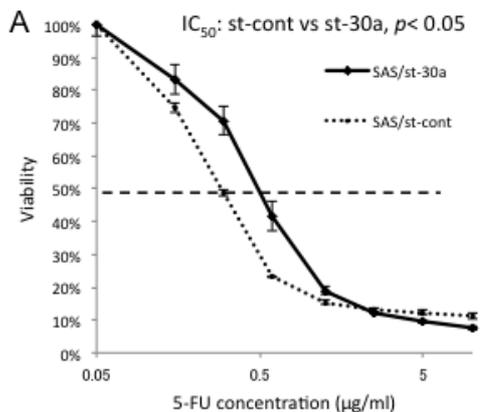
#### 【癌患者体液中バイオマーカーとしての miRNA の有用性の検討】

様々な癌領域における miRNA の極めて詳細な解析が進み、最近では細胞内で働くと言われてきた miRNA が細胞外へ分泌され癌の新たな指標の産物として報告されている (*Kosaka N et al. J Biol Chem 2013*)。この分泌にはエクソソームと呼ばれる脂質の二重膜の細胞外顆粒が関わっており、既にある種の癌ではこのエクソソームに内包される miRNA が治療効果や予後との強く相関することが示されている (*Takeshita N et al. Br J Cancer 2013*)。こうした癌体液診断の現状を鑑みると、OSCC においても癌患者体液中の miRNA を指標とした診断方法の開発は重要であると考えられる。そこで、本研究ではエクソソーム中の miRNA (exosomal miRNA) に着目した診断方法を開発することで、口腔癌の予防や早期発見はもとより、病型分類、経過・予後予測、治療方針の決定、治療効果判定等における exosomal miRNA の新たなバイオマーカーとしての利用価値を創出し、癌細胞由来の特異的な exosomal miRNA の分泌の抑制や除去することで個別化治療の実現を目指す。

#### 4. 研究成果

(1) 以前より OSCC 細胞株である 2 つの細胞株(SAS, Ca9-22)より 5-FU 耐性株の樹立に成功しており、今回のその親株と耐性株の total RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ解析を行うことにより、miRNA の発現プロファイリングを調査した。解析の結果より、miRNA の発現が有意に増加したものと低下したものがいくつか認められたが、これらの miRNA の中から両細胞株で共通して発現が変動していたものは miR-30a の一つであり、低下したものは認めなかった。そのため解析の対象を miR-30a に絞り、両耐性株で増加していることから、miR-30a が 5-FU 耐性の何らかの機序を担っている標的として考えられた。

アレイの結果より実際に細胞株から total RNA を抽出し、RT-qPCR にて miR-30a の発現を確認したところ、両耐性株において有意に miR-30a の発現が増加していたことが確認できた。またそれぞれの耐性株に一時的に 5-FU 刺激を行うことで、さらに miR-30a が上昇することを認めた。miR-30a の発現増加時の 5-FU 耐性度を評価するために、親株である SAS および Ca9-22 に miR-30a を細胞導入し、miR-30a を安定的に高発現した SAS/st-30a および Ca9-22/st-30a を樹立した。その結果、コントロールである SAS/st-cont および Ca9-22/st-cont に比べ、miR-30a を安定的に高発現させた両細胞株で細胞増殖の抑制が認められた ( $P < 0.05$ )。細胞周期解析を行ったところ、両細胞株で G1 期の上昇が認められた。さらに 5-FU 感受性試験を施行したところ、コントロールに比べ両細胞株において約 2 倍の 5-FU 耐性を示していた。またアポトーシスによる細胞死の検出を行ったところ、コントロールに比べ、両細胞株においてアポトーシスの割合が減少していた。



miR-30a の発現抑制時の 5-FU 耐性度を評価するため、SAS/st-30a および Ca9-22/st-30a に対する miR-30a の発現抑制実験を行った。その場合、SAS/st-30a と Ca9-22/st-30a の両細胞株の細胞増殖活性は有意に増加した。加えて、miR-30a 抑制細胞の G1 アレスト細胞の割合は減少し、5-FU 刺激に対して感受性が増加することが明らかとなった。これらの結果により miR-30a は、OSCC 細胞の細胞周期を G1 期で停止させることで細胞増殖を抑制し、5-FU への感受性を低下させている可能性が示唆された。

(2) OSCC 患者より治療前、術前化学放射線療法後、手術後、再発時の 4 点で血清を採取しており、それぞれのサンプルから exosomal miRNA を抽出し、その発現変動と生物学的意義を解明した。その結果 miR-1290 の低発現群は口腔癌における全生存率および無病生存率ともに有意に予後不良であることが解明された。その原因として低発現群ほど腫瘍のサイズが大きく、またリンパ節転移を伴いやすく、術前化学放射線療法の治療効果が不良、等が挙げられた。

#### 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 6 件)

Hiraki A, Yamamoto T, Yoshida R, Nagata M, Kawahara K, Nakagawa Y, Matsuoka Y, Tanaka T, Hirotsue A, Fukuma D, Ikebe T, Shinohara M, Nakayama H. Factors affecting volume change of myocutaneous flaps in oral cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2016 (in press)

Nakashima H, Matsuoka Y, Yoshida R, Nagata M, Hirotsue 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**. 26;16:41, 2016

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- $\alpha$ -TNFR1-NF- $\kappa$ B pathway and a possible involvement of angiotensin-like 4 in lung metastasis. **Int J Oncol.** 49:1377-84, 2016

Yoshitake Y, Fukuma D, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Tanaka T, Nagata M, Takamune Y, Kawahara K, Nakagawa Y, Yoshida R, Hirose 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.** 21:312-21, 2015.

Matsuoka Y, Yoshida R, Nakayama H, Nagata M, Hirose A, Tanaka T, Kawahara K, Nakagawa Y, Sakata J, Arita H, Hiraki A, Shinohara M. The tumour stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. **APMIS.** 123:205-14, 2015.

Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Ueda M, Nagata M, Guo J, Hayashi M, Yoshida R, Ota T, Ota K, Kawahara K, Nakagawa Y, Yamashita S, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Ando Y. Osteopontin-integrin  $\alpha(v)\beta(3)$  axis is crucial for 5-fluorouracil resistance in oral squamous cell carcinoma. **FEBS Lett.** 589:231-9, 2015.

〔学会発表〕(計4件)

山本達郎「BRD4はMMP2のエピジェネティックな調節を介して口腔扁平上皮癌の転移に関与する」日本癌学会学術総会 2016年10月6-8日 パシフィコ横浜 神奈川県

松岡祐一郎「Phospho-Nrf2 is a useful predict factor of the response to chemoradiotherapy in oral squamous cell carcinoma」日本癌学会学術総会 2016年10月6-8日 パシフィコ横浜 神奈川県

中嶋光「Investigation of the clinical significance of circulating miR-1290 in oral squamous cell carcinoma」日本癌学会学術総会 2016年10月6-8日 パシフィコ横浜 神奈川県

川原健太「肺転移巣に対するCetuximab併用化学療法が奏効した唾液腺道管癌の1例」日本頭頸部癌学会学術総会 2016年6月9-10日 大宮ソニックシティ 埼玉県

〔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

川原 健太 (KAWAHARA, Kenta)  
熊本大学大学院生命科学研究部歯科口腔  
外科学分野 医員  
研究者番号：90732735

(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

( )