

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20588

研究課題名(和文)機能性RNAによる癌転移抑制因子CD82発現制御を利用した口腔癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of oral cancer therapy utilizing the regulation of CD82 expression, a suppressor of metastasis, by microRNA.

研究代表者

峯 真理子(Mine, Mariko)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：50755270

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): CD82は、遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしているmiRNAの中で複数のmiRNAの発現を亢進させた。特にmiR-203は直接的にFZD2の発現を抑制し、癌細胞の遊走能を低下させた。これよりCD82がmiR-203を介してFZD2を抑制することによりWntシグナル経路を抑制し、癌の浸潤転移を抑制することが示唆された。

また口腔扁平上皮癌の腫瘍マーカーとしてのmiRNAの有用性を検討するため、OSCC患者群と健常者群の血清より作製した血清プール中のmiRNAを比較検討した結果、miR-125bとmiR-183の有用性が示唆され、さらにmiR-183は術後モニタリングとしての有用性も示唆された。

研究成果の概要(英文): We investigated the mechanism through which CD82 inhibited FZD expression by examining the effects of miRNAs. The miRanda algorithm predicted 11 miRNAs from FZD sequences. Among these miRNAs, CD82 caused upregulation of miR-203 as compared with control cells. Transfection with miR-203 mimics or inhibitors revealed that miR-203 downregulated FZD2 mRNA and protein expression. Moreover, transfection with the miR-203 mimic also inhibited cell migration. Therefore, these findings suggested that CD82 enhanced the expression of miR-203 and directly downregulate FZD2 expression, suppressing cancer metastasis by inhibition of the Wnt signaling pathway. We also studied specific serum miRNAs as biomarkers for OSCC diagnosis. In conclusion, miR-125b and miR-183 expression levels in serum have significant potential as effective biomarkers for the detection of OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：癌転移機構 microRNA

1. 研究開始当初の背景

癌治療において原発巣の制御とともに転移の制御が予後を大きく左右する因子として重要である。

我々は細胞膜表面の膜貫通型タンパク質のスーパーファミリーであるテトラスパニンのメンバーである CD82/KAI1 が、以下に示す様々なメカニズムで癌転移を抑制することを明らかにしてきた。

CD82 が E-cadherin/ β -catenin 複合体の β -catenin のチロシンリン酸化を抑制することで複合体を細胞膜上に安定化させ、同種細胞間接着を強固にし、癌細胞の原発巣離脱を抑制する。(A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated hemophilic cellular adhesion of cancer cells. Masakazu Abe et al. Cancer Letters 266: 163-170 (2008))

その機構に Wnt signal の抑制による β -catenin の膜安定化が関与する。

(CD82 inhibits canonical Wnt signalling by controlling the cellular distribution of β -catenin in carcinoma cells. Satomi Chigita et al. International Journal of Oncology 41(6): 2021-8 (2012))

このように CD82 は癌浸潤転移を抑制するが、癌の新規治療に展開するためには CD82 の遺伝子治療を想定せねばならず、現実的ではない。そこで、さらに詳細なメカニズムを解析することで新たな治療ツールの発見を目指す必要があると考えられた。

microRNA (miRNA) は small non-coding RNA の一種で、遺伝子発現の制御に非常に重要な役割を果たしている。ヒト miRNA のうちの 50% 近くが癌に関連したゲノム領域あるいは染色体不安定部に位置しており、多くのヒト癌において miRNA は癌遺伝子 (oncomiR) もしくは癌抑制遺伝子 (anti-oncomiR) として機能する。しかしながら、miRNA が癌転移に重要である Wnt signal を制御しているかについては解明されていない。

我々のこれまでの研究で、CD82 は Wnt 経路だけでなく、様々な経路を介し癌の浸潤転移を抑制することから、CD82 の発現を miRNA もしくは miRNA 阻害によりコントロールすることができれば、強力な癌転移抑制治療ツールになると考えた。

そこで、本研究では CD82 の癌転移抑制機構のさらなる検討と癌細胞における CD82 発現のコントロールについて miRNA に注目しておこなった。

また口腔扁平上皮癌への腫瘍マーカーとしての miRNA の有用性を検討するため、OSCC 患者群の血清より作製した血清プール中の miRNA と、健常者群の血清より作製した血清プール中の miRNA を比較検討した

2. 研究の目的

癌の浸潤・転移は患者の予後を左右する極めて

重要な悪性形質である。我々はこれまでの研究で、癌転移抑制因子テトラスパニン CD82/KAI1 が、FZD 発現調節を行うことで Wnt シグナル系を抑制することにより E-cadherin 依存性の癌細胞間接着を安定化し、癌細胞の原発巣離脱を抑制することを明らかにした。近年 miRNA は遺伝子の翻訳調節に直接関わる因子として治療や診断への応用が期待されている。

本研究では、CD82 の癌転移抑制機構のさらなる検討と癌細胞における CD82 発現のコントロールについて miRNA に注目しておこない、miRNA を利用した口腔癌の診断・治療法に展開することを目的とした。

3. 研究の方法

研究 1

miRNA による CD82 発現制御を介した Wnt シグナル系の制御機構

(1) 細胞および培養

CD82 低発現細胞株である非小細胞性肺癌細胞株 h1299 に CD82 cDNA を導入した h1299/CD82 と空ベクターのみを導入した h1299/zeo を使用した。ウエスタンブロット法による解析では、h1299/CD82 の CD82 発現量は、親株である h1299 や h1299/zeo の約 20 倍、フローサイトメトリーを用いた解析では、細胞膜表面の CD82 の発現量は 9 倍である。

(2) Short hairpin RNA (shRNA) の導入
h1299/CD82 に CD82 の short hairpin RNA (shRNA) を導入することによって CD82 のノックダウンを行った。h1299/CD82 にそれぞれ pLKO.1-puro Control Vector もしくは pLKO.1-puro/sh.CD82 を遺伝子導入した(それぞれ h1299/CD82-sh.control、h1299/CD82-sh.CD82)。shRNA を導入した h1299 細胞は RT-PCR およびイムノブロット法を用いて CD82 の発現レベルを確認した。

(3) miRNA Mimics, miRNA Hairpin Inhibitors の導入

h1299/zeo および h1299/CD82 に対し、miRIDIAN microRNA Mimics と miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors および Negative Controls を遺伝子導入した(それぞれ h1299/zeo/338 inhibitor、h1299/zeo/203 mimic、h1299/zeo/control inhibitor、h1299/zeo/control mimic、h1299/CD82/338 mimic、h1299/CD82/203 inhibitor、h1299/CD82/control inhibitor、h1299/CD82/control mimic)。

(4) 遺伝子データベース検索プログラムによる miRNA 予測

FZD と Wnt を標的とする miRNA を検索するツールとして、miRanda を用いた。このプログラムは主に miRNA の標的部位を検索する際に用いられる miRNA のデータベースである。miRanda のアルゴリズムは、ある miRNA とその標的遺伝子の塩基配列との間の部分的な相補的塩基配列を検索する。今回、我々はまず FZD2, -3, -5, -7, -9 を標的とする miRNA

を検索し、その中から Wnt を標的とする miRNA を除外した。

(5) リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法

h1299 細胞から total RNA を抽出し、First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript II RT を用いて cDNA を合成した。mRNA の発現量は、LightCycler FastStart DNA Master SYBER Green 1 kit を用いたリアルタイム PCR システムで 3 回ずつ定量した。また各細胞で mRNA 発現量を比較するため、同時に定量した β -actin の mRNA 発現量と比較して、相対的発現量を算出した。

miRNA については、h1299 細胞から miRNA を含む total RNA を抽出し、miScript II RT Kit を用いて cDNA を合成した。miRNA の発現量は、miScript SYBR Green PCR kit を用いたリアルタイム PCR システムで 3 回ずつ定量した。また各細胞で miRNA 発現量を比較するため、同時に定量した RNU6B の発現量と比較して、相対的発現量を算出した。

(6) イムノプロット解析

細胞溶解液を SDS-PAGE に展開し、ニトロセルロースメンブレンに転写し、特異的な一次抗体を用いて室温で 1 時間反応させた。続いて HRP 標識二次抗体および ECL ウェスタンブロッティング検出システムで発光させ、化学発光検出システムを用いて検出後、定量化・解析を行った。

(7) Wound healing assay

6 穴平型プレートにて h1299/zeo および h1299/CD82 に各種 miRNA を導入し、48 時間後にコンフルエントの状態では新鮮な増殖培地に交換した。200 μ l ピペットチップにてウェル内に直線状に傷を付け、その傷によって形成されたスペースを創部面積とした。観察は各種細胞株を傷つけた直後から蛍光顕微鏡を用いて開始し、8 時間毎に 24 時間後まで行った。創部面積は以下の計算式を用いて評価した。

創部面積 (%) = (観察時の創部面積 / 観察開始直後の創部面積) \times 100

研究 2

OSCC に対する血清腫瘍マーカー miRNA の探索

(1) 対象

対象は、2014 年から 2015 年に九州大学病院顎顔面口腔外科を受診し、病理組織学的検査により口腔扁平上皮癌と診断された治療前の患者 42 例と、ボランティアとして協力を得た健常者 20 例とした。臨床的背景因子として、年齢、性別、喫煙、飲酒、部位、腫瘍の大きさ、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、病理組織型についてカルテより取得した。口腔癌の解剖学的部位および TNM 分類は (TNM classification of malignant tumours) 第 7 版 (2009 年) の規定に従った。リンパ節転移の有無は、画像診断および頸部郭清術におけるリンパ節の病理組織学的所見により診断した。遠隔転移の有無は画像診断にて

診断した。血清サンプルの採取・利用に関しては九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会による審査および承認 (許可番号:26-306) を得た。また、採血前に全症例に対してインフォームドコンセント説明を行い、同意書を取得した。本研究は 1975 年のヘルシンキ宣言を遵守し施行した。

(2) 血清サンプル

OSCC 患者の血清サンプルは治療開始約 2 週間前に採取し、そのうち 9 例は術約半年後にも同様にサンプルを採取した。全症例で、採血管に血液 10 ml を採取し室温で 30 分静置し凝固させた後に 1900 g、4、30 分間遠心分離を行い、上清を採取した。さらに細胞性の浮遊物を除去するためにさらに 1600 g、4、10 分間遠心分離を行いその上清を血清サンプルとし、解析まで -80° で保存した。

(3) 血清中 miRNA の網羅的発現解析

患者 6 例の血清から各 200 μ l の血清を分取したものを混合し、患者血清プールとした。同様に健常者 6 例の血清から健常者血清プールを作製した。それぞれの血清プールから、3D-Gene RNA extraction reagent を用いて total RNA を抽出した。ラベル化には 3D-Gene miRNA labeling kit を用い、3D-Gene Mouse miRNA Oligo chips へハイブリダイゼーションした。シグナルは 3D-Gene Scanner を用いてスキャンし、3D-Gene Extraction software を用いて数値化した。各スポットのシグナル値からブランクのスポットの平均バックグラウンド値を引くことによってバックグラウンドの補正を行なった。バックグラウンドのシグナル値と比較し、2 SD 以上のシグナル強度を有効とした。さらに、シグナル強度の平均値が 25 となるようにグローバルノーマライゼーションを用いて正規化を行った。

(4) リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法

血清より miRNeasy serum/plasma kit と MS2 を用いて miRNA を含んだ total RNA を抽出し、TaqMan[®] MicroRNA RT kit を用いて cDNA を合成した。miRNA の発現量は、TaqMan[®] MicroRNA Assays を用いたリアルタイム PCR システムで 3 回ずつ定量した。PCR 反応は、熱変性 95 で 10 分間を 1 サイクル行い、2 サイクル目以降は熱変性 95 で 15 秒、アニーリング/伸長反応は 60 で 60 秒を 40 サイクル行った。血清の miRNA にはコントロールとして確立された miRNA がないため、microarray で患者群と健常群で発現に差が少なかった 3 つの miRNA (miR-23a, miR-24, miR-423) を内因性のコントロール候補として選択した。これらをリアルタイム PCR 法で miR-125b と miR-183 と共に測定し、最も発現の変動が少なかった miR-24 を内在性のコントロールとして選択した。また、各血清で患者群との相対的な発現量を算出する

ため、以下の式を用いて 2- CT 法で相対的発現量を算出した。

CT = cycle threshold

ddCT (patient) = CT (patient) - (CT miR-24) - dCT (health control)

dCT (health control) = [(CT (health control) - (CT miR-24))] の平均値

(5) 統計学的解析

血清中 miRNA の患者群と健常群の比較には Wilcoxon 検定を用いた。受信者動作特性曲線 (Receiver-operating characteristic 曲線、ROC 曲線) から診断に用いる基準値となるカットオフ値を算出した。ROC 曲線下面積 (The area under the ROC curve、AUC) は miRNA の診断能を示しており、AUC が 0.65 以上であれば有効な診断方法と考えられる。全ての解析において、P 値が 0.05 以下を有意差ありとした。これらの解析は SPSS software (version 18.0; SPSS, Chicago, IL) を用いて行った。

4. 研究成果

研究 1

miRNA による CD82 発現制御を介した Wnt シグナル系の制御機構

(1) FZD2, -3, -5, -7, -9 を標的とする可能性のある miRNA の予測

当科ではこれまでに、CD82 が FZD2, -3, -5, -7, -9 の発現を抑制し、その一方で FZD1, -4, -6, -8, -10 および Wnt の発現は制御しないことを報告した。そこで、FZD2, -3, -5, -7, -9 のみを抑制する可能性の高い miRNA を抽出するために、まず FZD2, -3, -5, -7, -9 を共通して標的とする miRNA を miRNA による標的遺伝子検索ツールの一つである miRanda を用いて予測した。次に、それらの miRNA の中から、FZD1, -4, -6, -8, -10 と Wnt を標的とする miRNA を除外した。その結果、CD82 により制御されている可能性のある FZD2, -3, -5, -7, -9 を標的とする 11 種類の miRNA [miR-27a, miR-27b, miR-145, miR-185, miR-197, miR-203, miR-221, miR-222, miR-338-3p, miR-376a and miR-376b] を抽出した。

(2) CD82 が miRNA の発現に与える影響

h1299 細胞株において CD82 が miRanda により抽出した 11 種の miRNA の発現に影響しているかを確認するため、real-time PCR を行った。miR-338-3p は CD82 強制発現によって有意に発現低下しており、一方 miR-203 は CD82 強制発現によって有意に発現上昇していた。また、shRNA を導入して CD82 の発現をノックダウンした細胞株 h1299/CD82-sh. CD82 においては h1299/zeo と同程度まで miRNA 発現量は回復していた。これらの結果より、CD82 が miRNA を特異的に制御していることが示唆された。miR-27a, miR-27b, miR-145, miR-185, miR-197, miR-221, miR-222, miR-376a、

miR-376b に関しては、CD82 強制発現によって miRNA 発現量に差は認められなかった。これらの結果から、CD82 は miR-338-3p および miR-203 の発現に影響を及ぼすことが示された。

(3) miR-338-3p と miR-203 が FZD の mRNA 発現レベルに与える影響

miR-338-3p と miR-203 の FZD 発現に及ぼす影響を解析するために、miR-338-3p と miR-203 の mimic、もしくは hairpin inhibitor を h1299/zeo および h1299/CD82 へ導入した (それぞれ h1299/zeo/338-3p inhibitor、h1299/CD82/338-3p mimic、h1299/zeo/203 mimic、h1299/CD82/203 inhibitor とする)。48 時間後、h1299/zeo/338-3p inhibitor および h1299/CD82/203 inhibitor では miR-338-3p および miR-203 の発現がそれぞれ著しく低下していた。一方、h1299/CD82/338-3p mimic および h1299/zeo/203 mimic では miR-338-3p および miR-203 の発現がそれぞれ著しく上昇していた。位相差顕微鏡にてこれらの miRNA 導入細胞の形態を観察したところ、miR-203 を導入した h1299/zeo/203 mimic では親株である h1299/zeo およびコントロール細胞 h1299/zeo/control mimic と比較して立方叢石状の形態を呈していた。一方、h1299/CD82/203 inhibitor では親株の h1299/CD82 およびコントロール細胞 h1299/CD82/control inhibitor と比較し、紡錘形を呈する細胞の数が増加していた。miR-338-3p inhibitor あるいは miR-338-3p mimic を導入した細胞においては親株およびコントロール細胞と比較し、細胞の形態に変化は認めなかった。

これらの導入細胞を使って、FZD mRNA 発現の解析を行った。miR-338-3p inhibitor および miR-338-3p mimic を導入した細胞 (h1299/zeo/338-3p inhibitor、h1299/CD82/338-3p mimic) ではコントロール細胞と比較して FZD の発現量に大きな変化は認めなかった。だが一方で、miR-203 mimic を導入した細胞 (h1299/zeo/203 mimic) ではコントロール細胞と比較して FZD2 の発現が顕著に亢進していた。

(4) FZD のタンパク発現レベルに miR-338-3p と miR-203 が与える影響

次に、miR-203、miR-338-3p が FZD タンパク発現に与える影響について検討するために、導入細胞を用いてイムノプロットングを行った。その結果、h1299/zeo/203 mimic では親株およびコントロール細胞と比較して FZD2 タンパクの発現が有意に低下していた。逆に、h1299/CD82/203 inhibitor では、親株およびコントロール細胞と比較して FZD2 タンパクの発現が有意に亢進していた。一方、miR-338-3p mimic と miR-338-3p inhibitor を導入した細胞では親株およびコントロー

ル細胞と比較してFZDタンパクの発現に変化は認めなかった。

(5) miR-338-3p と miR-203 が細胞の遊走能に与える影響

miR-203によるFZD2発現抑制の機能的影響を解明するために、Wound healing assayにて細胞遊走能の評価を行った。miR-203 mimicの導入により、h1299/zeoの遊走能は抑制された。逆に、miR-203 inhibitorの導入により、h1299/CD82細胞の遊走能は亢進した。その一方で、miR-338-3pはh1299細胞の遊走能に影響を与えなかった。CD82の過剰発現により、h1299細胞の遊走能は60%程度に低下していた。miR-203 mimicの導入により、h1299/zeo細胞の遊走能は低下し、逆にmiR-203 inhibitorの導入により、h1299/CD82細胞の遊走能はh1299/zeo細胞の80%程度まで回復した。これらの結果から、miR-203が癌細胞の遊走を抑制することが示された。

以上より、CD82はmiR-203の発現を亢進させ、FZD2の発現を抑制し、Wntシグナル経路の制御を介して癌の浸潤転移を抑制することが示唆された。

研究2

OSCCに対する血清腫瘍マーカーmiRNAの探索

(1) OSCCの腫瘍マーカー候補となるmiRNAを絞り込むために、OSCC患者6例の血清プールおよび健常者6例の血清プールからmiRNAを含むtotal RNAを抽出し、2555種のmiRNAに対してmiRNA microarrayにて網羅的発現解析を行った。性別はそれぞれ男性3例、女性3例で、平均年齢は患者群で66.0歳、健常群で26.7歳であった。その結果、健常者血清プールと比較して患者血清プールにおいて2倍以上の発現亢進を認められた44種のmiRNA、1/2以下の発現低下を認められた24種のmiRNAを検出した。その中で、患者群において5倍以上の発現亢進を認められたmiR-125bとmiR-183と、1/5以下の発現低下を認められたmiR-1224を特に変化の大きいmiRNAとして抽出した。癌において発現が上昇していることが検査上有用であると考え、今後の検討においてはmiR-125bとmiR-183について行うこととした。

(2) microarrayの結果を検証するために、OSCC患者42例と健常者20例において各血清中のmiR-125bとmiR-183の発現をリアルタイムPCR法を用いて定量解析を行った。性別は患者群が男性23例、女性19例、健常群で男性11例、女性9例であった。また、平均年齢は患者群で68.0歳、健常群で27.8歳であった。その結果、miR-183では患者群において有意な発現亢進を認められた。一方、miR-125bはmicroarrayの結果に反して患者群で有意な発現の低下を認められた。

(3)各miRNAを用いた診断

miR-125、miR-183の腫瘍マーカーとしての診断精度の指標を評価するために、患者群42例と健常群20例の発現量を用いてReceiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を作製した。miR-125bではAUCが0.720であり、感度と特異度の合計が最大になるように0.88をカットオフ値とした場合、感度が92.86%、特異度が50%であった。一方、miR-183のAUCは0.763であり、カットオフ値1.42で感度が66.67%、特異度が80%であった。

(4) 4. miR-125bとmiR-183を併用した診断より精度の高い診断を行うために、miR-125bとmiR-183を併用した診断の有用性について検討を行った。全ての症例をdouble positive群(miR-125b low/miR-183 high)、single positive群(miR-125b low/miR-183 lowおよびmiR-125b high/miR-183 high)、double negative群(miR-125b high/miR-183 low)に分類し、それぞれにおいて感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を算出した。double negative群とdouble/single positive群、double positive群とdouble/single positive群で2群間の比較を行ったところ、double/single positive群では高い感度(97.6%)を示し、double negative群では高い陰性的中率(88.9%)を示した。また、double positive群では高い陽性的中率(92.9%)を示し、single positive/double negative群では高い特異度(90%)を示した。

(5)同一患者における術前後でのmiRNAの推移

miR-125bとmiR-183のモニタリングの有用性を検討するために、OSCC患者9例において術前と術後の各miRNAの発現量を比較したところ、miR-183では9例中7例で術後に発現低下を示し、この7例では現在まで再発や転移は認めなかった。術後に発現上昇を認められた残り2例のうち1例(図5B、矢印)はその後腫瘍の再発と後発転移を認められた。このことから、miR-183の発現は腫瘍の存在と関連があると考えられた。それに対し、miR-125bでは明らかな傾向を示さなかった。

以上より、血清中のmiR-125bとmiR-183がOSCCの腫瘍マーカーとなりうることが示された。さらに同一患者での術前と術後半の発現量を比較すると、miR-183では術後に発現が低下する傾向を認められたことから、術後のモニタリングとして有用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)
今後論文を投稿する予定である。
〔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

峯真理子 (MINE MARIKO)
九州大学大学院歯学府
口腔顎顔面病態学講座
口腔学顔面外科学分野 医員
研究者番号：50755270

(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