

令和元年6月27日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20611

研究課題名(和文) PDXモデルを用いた口腔癌における新規転移マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of novel metastatic markers using PDX model mouse on oral cancer

研究代表者

木内 誠 (Kinouchi, Makoto)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00759483

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)：PDXモデルマウス作成に先立ち、in vitroでの先行研究を行った。まず、分泌型microRNAとして既に報告されているmiR-518cを用いて実験を行った。使用した細胞は口腔癌細胞株であるCAL-27を用いた。培養上清からエクソソームの単離を行った。次いでその定量を行った。結果をもとにリアルタイムPCRによるmiR-518cの発現量比較を実施予定であったが、エクソソームの定量の段階で予想以上に回収率が少なかった。PDXモデルマウスでは血清からのエクソソーム回収率になり、さらにサンプル量が少なく実験は困難となり、予想した結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、口腔癌に特異的な分泌型microRNAが同定できれば、所属リンパ節転移あるいは遠隔転移の早期発見につながった可能性があるが、血清からのexosomeの収率が低く、予想したようなmiRNAの同定には至らなかった。今後の研究でさらに微量での検出を行えるような手法の開発や同定方法を確立したいと考える。

研究成果の概要(英文)：I examined a pilot study before the establishment of PDX model mouse. First, I experimented using a miR-518c as the secretory microRNA by oral cancer cells, CAL-27. I isolated the exosome from their supernatant and quantified. I tried to exam the expression of miR-518c using qRT-PCR, however, the collect rare was very low. This results indicated that the following study was so hard. On the study using PDX model mouse, the collection rate of exosome from their serum was lower than from culture supernatant. Therefore, I could not acquire the result such as my hypothesis.

研究分野：がん

キーワード：microRNA exosome

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の予後不良因子は転移である。そのため、当研究室では口腔癌の転移機構に関する研究を行ってきた。その中で、ケモカインレセプターCXCR4を発現する口腔癌細胞が、転移先臓器の産生するリガンドstromal-cell derived factor (SDF)-1に引き寄せられながら転移すること(Exp Cell Res 290:289, 2003, Lab Invest 84:1538, 2004, Int J Oncol 25:65, 2004, Mol Cancer Res 5:685,2007), この転移がCXCR4阻害剤により抑制できることを明らかにした(Mol Cancer 8:62, 2009, Eur J Cancer 47:452, 2011, Clin Exp Metastasis 30:133, 2013)。現在のところ、SDF-1/CXCR4システムは癌細胞の走化性亢進により転移を惹起すると考えられているが、本システムが浸潤・脈管内侵入・血管外遊出・異所性発育などの複雑な過程を伴う転移をどのように制御するかは不明である。われわれは、その解明に本システムの下流に存在する標的分子の解析が重要であると考え、様々な癌の進展過程への関与が明らかにされたマイクロRNA(miRNA)をmiRNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、SDF-1/CXCR4システムによって誘導される転移関連候補miRNAとしてmiR-518c-5pを同定し、miR-518c-5pが転移促進miRNAであること、その過程で腫瘍増殖を促進することを明らかにした(PLoS One 9:e115936, 2014)。近年、miRNAは癌細胞を含む種々の細胞から細胞外小胞体であるexosome内に取り込まれた状態で細胞外へ分泌され、血液や尿などの体液中で安定した状態で循環することが明らかにされた(Front Genet. 5:173,2013)。さらに、癌細胞より放出されるexosomeはそれぞれの癌種、あるいは腫瘍の悪性度に特異的なmiRNAを内包していることが報告されていることから、口腔癌の転移に特異的なexosomeを明らかにすることができれば、転移、治療効果、さらには予後をliquid biopsyにて簡便に診断できると考えられる。われわれが同定したmiR-518c-5pは、分泌型miRNAとして作用することが示唆されており(Molecular Cytogenetics 5:27, 2012)、miR-518c-5pがリンパ節転移を有する口腔癌患者の血清中で上昇していることを確認した(未発表データ)。しかしながら、血清中で検出されるmiR-518c-5pの濃度は、他のmiRNAに比較して2オーダー程度低く、実際に癌転移マーカーとして使用できる可能性は低いことが明らかとなった。このように培養癌細胞を使用したexosomeの解析は、実際の癌患者血清の解析結果と乖離が見られることがある。これは、培養癌細胞において、腫瘍が本来有していたヘテロジェナイティーが失われ、増殖能や浸潤能などの生物学的特徴が変化することに起因している。このため一般に癌患者由来血清から直接exosomeを採取し、転移関連miRNAなどのバイオマーカーを検索する方法がとられるが、患者個人の持つ基礎疾患、腫瘍の進展度、あるいは抗癌剤をはじめとする各種薬剤の使用などがバイアスになり、癌の個性を反映しない可能性がある。近年、患者由来癌組織をマウスに直接移植したPatient-Derived Xenograft(PDX)モデルが報告された。PDXモデルは、患者由来の癌組織を直接マウスに移植することで、癌本来のヘテロジェナイティーを維持したまま、患者組織をマウスで継代することが可能であり、加えて癌組織と間質の相互作用についても解析することができる(Cancer Discov. 4:998-1013, 2014)。従って、継代で増殖させた同一サイズの腫瘍を移植すれば、担癌マウスの血液中には腫瘍の採取時期や採取時の進展度に依存しない純粋なバイオマーカーを含むことが予想される。すなわち、転移のある患者と転移のない患者から採取した口腔癌組織を用いて、それぞれのPDXモデルを作製し、血清中のexosomeを比較することで、バイアスのない純粋な転移マーカーを同定できると考えられる。そこで本研究では、口腔癌におけるPDXモデルを確立し、本モデルの血中miRNAを解析することで、将来的に口腔癌のliquid biopsyに使用可能な新規転移マーカーを同定することを目的とする。

2. 研究の目的

昨今、様々な癌におけるmicroRNA(miRNA)の重要性が着目され、患者血中の遊離miRNAを標的としたliquid biopsyの報告が散見される。口腔癌は視診で診断可能な場所に発生するため、liquid biopsyは転移診断に有用であると考えられる。しかしながら、患者血清を用いた解析は、患者の基礎疾患や採血時の癌の進展度がバイアスになり、癌の個性を反映しない可能性がある。近年、患者由来癌組織をマウスに移植したPatient-Derived Xenograft(PDX)モデルが報告された。本モデルは、腫瘍本来の性質を維持したままの組織の継代が可能であり、担癌マウスの血液中には腫瘍自身が産生する純粋な遊離miRNAを含むことが予想される。そこで本研究では、口腔癌におけるPDXモデルを確立し、本モデルの血中miRNAを解析することで、診断治療に有用な口腔癌の新規転移マーカーを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PDXモデルマウス作製方法の検討と確立を行う。(2) 転移なし患者由来口腔癌組織を移植したコントロールマウスと転移あり患者由来口腔癌組織を移植したマウスの血清中に含まれるexosomeを単離する(3) 実験(2)で採取したexosome中に含まれるmiRNA

の発現量をマイクロアレイにて比較する。(4) 実験(3)で得られた結果の再現性を定量性 PCR にて確認する。(5) 実験(4)で再現性の得られた転移関連 miRNA を、転移能がない培養口腔癌細胞に導入し、転移能獲得の有無を検討する。(6) 実験(5)で効果の得られた miRNA について、臨床材料を用いて新規転移マーカーとしての有用性について検討する。

4. 研究成果

PDX モデルマウス作成に先立ち、*in vitro*での先行研究を行った。その目的は、培養上清中に癌細胞から分泌されたエクソソームに含まれる microRNA を検出することとした。PDX モデルマウスが作成できたとしても、このエクソソームの単離及び定量ができなければその後の解析が困難となる。そこでまず、分泌型 microRNA として既に報告されている miR-518 を用いて実験を行った。使用した細胞は口腔癌細胞株である CAL-27 を用いた。これに miR-518c の発現ベクターおよびコントロールベクターを導入し、miR-518c の強制発現株および mock 細胞を樹立した。これらの最奥を培養し、セミコンフルエントになったところで、serum free medium にて培養後、その培養上清から exoRNeasy serum/Plasma Kit (QIAGEN)を用いてエクソソームの単離を行った。次いで Qubit[®];microRNA アッセイキット (Thermo Fisher SCIENTIFIC)を用いてその定量を行った。その結果をもとにリアルタイム PCR による miR-518c の発現量比較を実施予定であったが、エクソソームの定量の段階で予想以上に回収率が少なかった。PDX モデルマウスでは血清からのエクソソーム回収になり、さらにサンプル量が少なく実験は困難となり、予想した結果は得られなかった。一方で、このようにして回収されたエクソソームをリンパ管内皮細胞の培養上清中に転化したところ、管腔形成能の亢進が認められた。また、同様にリンパ管内皮細胞を用いたマイグレーションチャンバーアッセイを行った際に、エクソソームを添加したほうが、有意にその遊走能が亢進したことから、定量はできなかったものの、エクソソームに含まれた microRNA がなんらかのシグナルを通して、リンパ管内皮細胞に働きかけていることが示唆された。

Fig. エクソソームがリンパ管内皮細胞の管腔形成能に与える影響

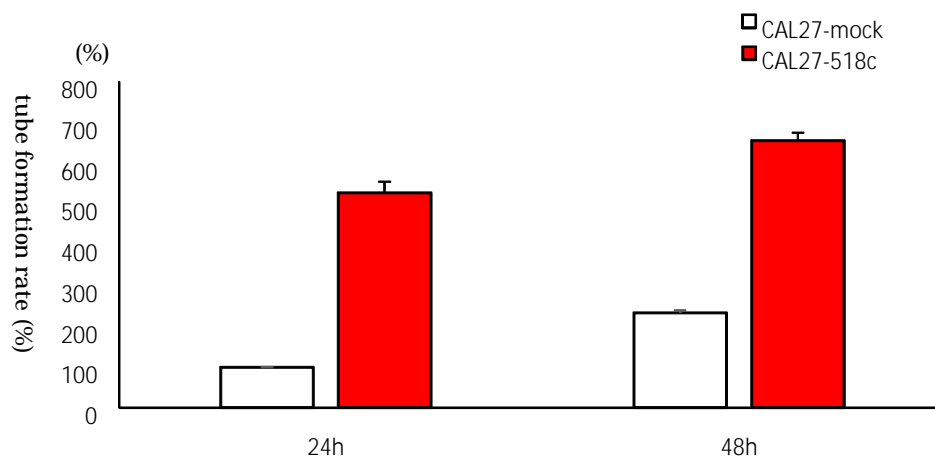
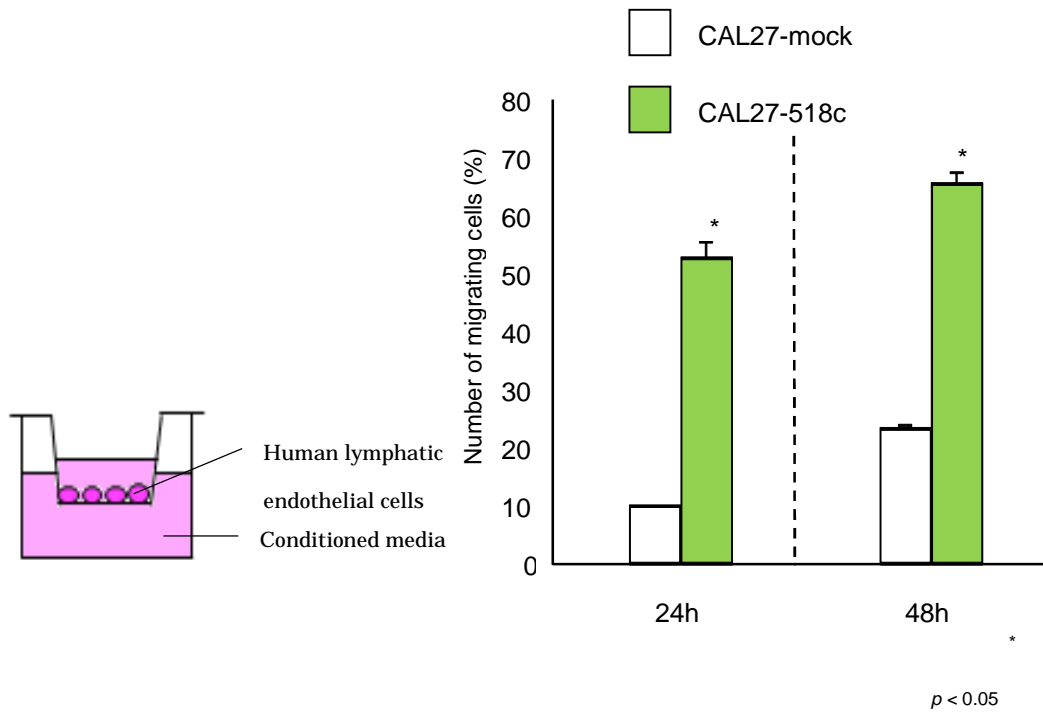


Fig. エクソソームがリンパ管内皮細胞の遊走能に与える影響



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

第76回日本癌学会学術総会 2017年9月28日~30日

Role of microRNA-518c-5p on the metastasis of oral cancer cells

Makoto Kinouchi, Daisuke Uchida, Nobuyuki Kuribayashi, Hitoshi Kawamata

〔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:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。