

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21246

研究課題名(和文) 癌遺伝子 Np63とmicroRNAを介した癌の浸潤・転移機構の解析と治療応用

研究課題名(英文) Creation of new cancer treatment methods and analysis of cancer invasion and metastasis mechanism through delta-Np63 and microRNA

研究代表者

後藤 雄一 (Goto, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00637902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)は、発生の過程において重要な役割を担うが、近年癌の浸潤、転移においても重要な役割を担うことが明らかとなっている。われわれは、口腔扁平上皮癌(OSCC)において、Np63のスプライシングバリエーションである Np63 の発現を抑制することでEMTが誘発されることを明らかにしてきた。さらに最近の知見においてはその分子メカニズムにマイクロRNA(miRNA)の関与が示唆されている。われわれは Np63の下流でmiR-205が重要な役割を果たしEMTと関連するZEB1、ZEB2などの間葉系マーカーがターゲットとなり発現がコントロールされていることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮系癌である口腔扁平上皮癌の浸潤・転移の分子メカニズムの一端を明らかにした。癌の転移は生命予後を左右する重要な事象であるが、そのコントロールは出来ていない。浸潤・転移の分子メカニズムの全容が解明されることにより、その治療戦略が大きな転換点を迎える可能性があり、増加する口腔がんの治療戦略へ一石を投じることが出来る。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the process of development, recently it has been revealed that it also plays an important role in invasion and metastasis of cancer. We have shown that EMT is induced by suppressing the expression of Np63, a splicing variant of Np63, in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Furthermore, recent findings suggest that microRNA (miRNA) is involved in the molecular mechanism. We found that miR-205 plays an important role downstream of Np63 and regulates its expression by targeting mesenchymal markers such as ZEB1 and ZEB2, which are associated with EMT.

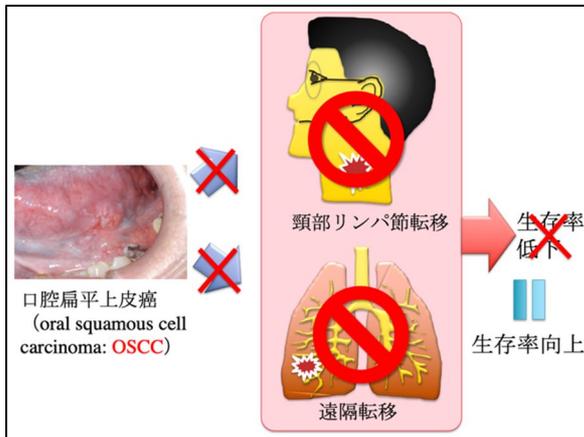
研究分野：口腔外科

キーワード：Np63 OSCC miR205 micro RNA ZEB1 EMT ZEB2

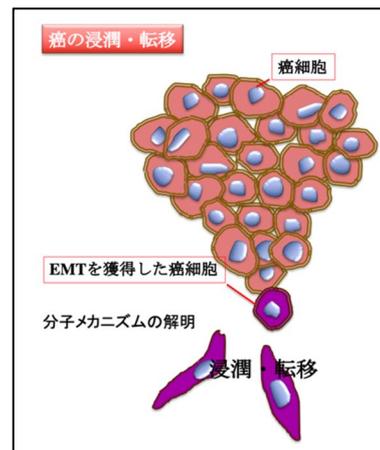
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、診断技術や手術手技の進歩により、口腔扁平上皮癌 (OSCC) の治療成績は向上しているが、依然として予後因子である頸部リンパ節転移や肺などへの遠隔転移は患者の生命予後を悪化させ、生命予後を左右する重要な因子である。このことは、頸部リンパ節転移および遠隔転移の制御が、OSCC 患者の生存率の向上に必要不可欠であることを意味している。そのため、転移の初期の段階に起こる癌の浸潤の分子メカニズムを解明することは、OSCC 患者の治療戦略を多様化させ、ひいては生存率向上のために極めて重要である。近年、癌の浸潤および転移には、上皮細胞が間葉系細胞のような形質を獲得する、いわゆる上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が関与していることが明らかとなっている。本来、EMT は器官形成において必須の現象として広く知られており、EMT が誘導された上皮細胞は、線維芽細胞様の



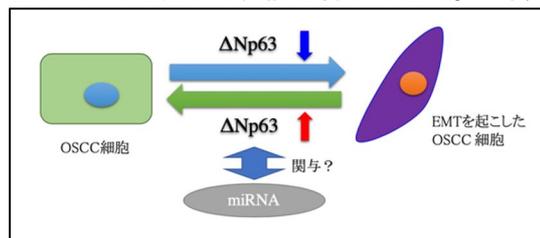
の形態変化、上皮系マーカーの発現低下、間葉系マーカーの発現上昇、細胞接着の喪失、遊走能の亢進および増殖能の低下を示し、間葉系細胞様の形質を示すとされている。すなわち、癌細胞は進行の過程で EMT が誘導され、細胞間接着が喪失することにより原発巣から離脱し、遊走能が亢進することで間質への浸潤を容易にしているとされる。つまり EMT の制御に関与している分子を明らかにすることは、癌の浸潤および転移の制御機構の解明につながり、癌の分子標的薬の開発や新たなバイオマーカーの確立に大きく貢献するものと推察される。



の形態変化、上皮系マーカーの発現低下、間葉系マーカーの発現上昇、細胞接着の喪失、遊走能の亢進および増殖能の低下を示し、間葉系細胞様の形質を示すとされている。すなわち、癌細胞は進行の過程で EMT が誘導され、細胞間接着が喪失することにより原発巣から離脱し、遊走能が亢進することで間質への浸潤を容易にしているとされる。つまり EMT の制御に関与している分子を明らかにすることは、癌の浸潤および転移の制御機構の解明につながり、癌の分子標的薬の開発や新たなバイオマーカーの確立に大きく貢献するものと推察される。

2. 研究の目的

本研究は、現在までに蓄積された OSCC の浸潤メカニズムにおける研究成果や臨床経験をもとに着想した研究である。癌の「浸潤・転移」の分子機構の解明をしていく上で、本研究は、OSCC の浸潤・転移における  $\Delta$ Np63 を介した EMT の関与について現在まで検討を行ってきた。一方、microRNA は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA であり癌の進展に大きな影響を与えてことが報告されている。本研究では、OSCC における Np63 の microRNA を介した浸潤・転移の分子機構の解明を目的とする。さらに OSCC の浸潤・転移の分子機構の解明を図るとともに、OSCC 患者における転移制御の可能性について追求することが目的である。



3. 研究の方法

本研究は OSCC において Np63 による microRNA 発現変動を介した浸潤・転移の分子機構を解明するための基盤となる研究を行うことを目的とし、以下の方法で研究を進めた。

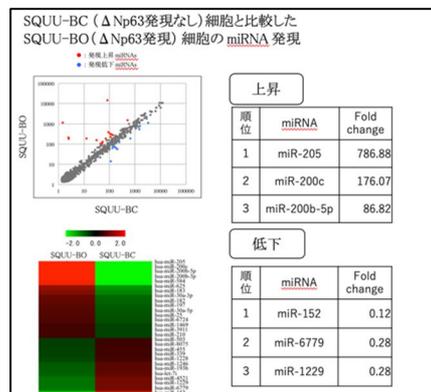
- (1) Np63 過剰発現により生じる microRNA の発現をマイクロアレイを用いてプロファイリングし、OSCC の浸潤・転移における Np63 を介した microRNA の役割を in vitro で確認する。
- (2) 目的 microRNA を決定したのち in vitro における機能解析実験を行い、OSCC における浸潤・転移における影響を検討した。
- (3) OSCC 患者における目的 microRNA の発現を生検材料により同定し、発現様式や臨床病理学的所見との関連を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) Np63 発現変動による microRNA の発現プロファイリング

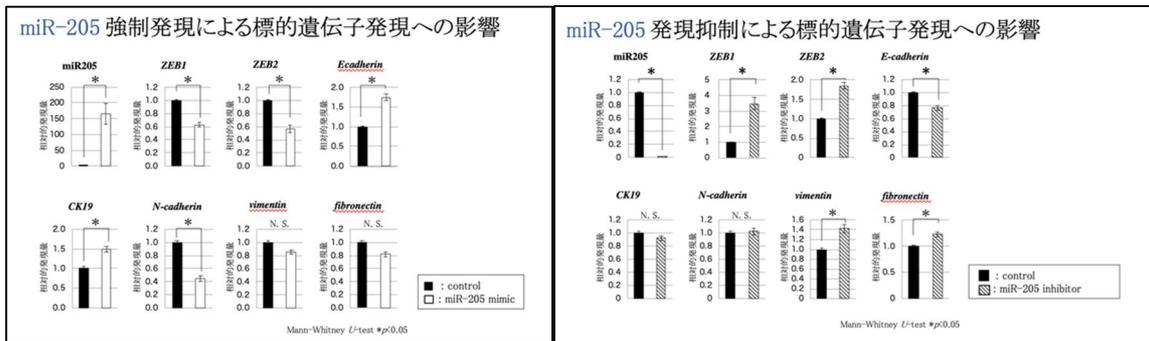
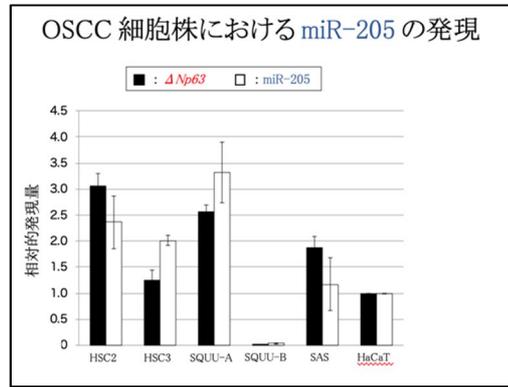
Np63 の発現がない OSCC 株と同株に Np63 を導入し過剰発現させた細胞株をマイクロアレイ解析を行い、複数の microRNA の発現亢進 (miR-205, -200c, -200b 等) を認めた。われわれはその中でも miR-205 に着目しその後の検討に用いることとした。miR-205 の下流遺伝子を検索した結果 ZEB1 や ZEB2 といった EMT 関連遺伝子に影響を与える可能性が示唆された。

- (2) OSCC 細胞株における miR-205 の発現と機能に関する



## 検討

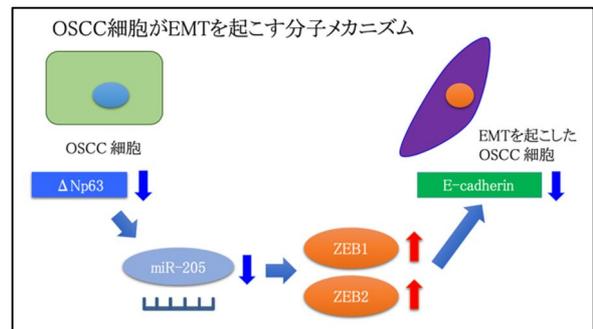
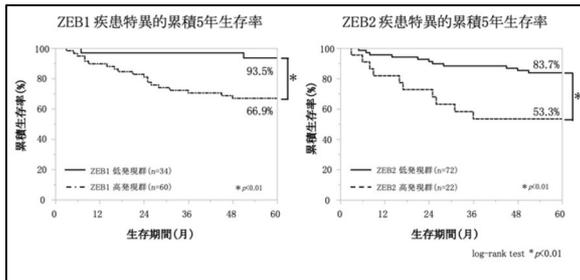
OSCC 細胞株における miR-205 の発現は、Np63 と同様の発現パターンを示し、Np63 を発現していない高転移株 SQUU-B 細胞において最も低かった。miR-205 の標的となりうる遺伝子の中でも、細胞接着分子である E-cadherin の発現を抑制することで EMT のプロセスに関与する遺伝子のひとつとして今回着目した ZEB1 および ZEB2 の 2 つの遺伝子の発現は、miR-205 の発現と逆相関していた。さらに、miR-205 を発現していない SQUU-B 細胞に miR-205 の強制発現を行うと、ZEB1 と ZEB2 の発現低下と、E-cadherin を含む上皮系マーカーの発現亢進、間葉系マーカーの発現低下、遊走能および浸潤能の低下を認め、EMT 形質を失う傾向にあった。また、miR-205 を高発現している細胞に miR-205 のノックダウンを行うと、逆に ZEB1 と ZEB2 の発現が亢進し、E-cadherin を含む上皮系マーカーの発現低下、間葉系マーカーの発現亢進、遊走能および浸潤能の亢進を認め、EMT の形質に近づくことがわかった。



以上の結果は J Cell Physiol 誌に Tumor-suppressive roles of Np63 -miR-205 axis in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma via targeting ZEB1 and ZEB2. として掲載された (2018 Oct;233(10):6565-6577. doi: 10.1002/jcp.26267. Epub 2018 May 10. )

### (3) OSCC 患者の生検材料における ZEB1, ZEB2 の発現と臨床病理学的所見との関連

OSCC 生検材料において ZEB1, ZEB2 は浸潤先端部に発現を認め、ZEB1 が高発現している群は Stage が進むにつれ、また頸部リンパ節転移と局所再発が有意に多いことがわかった。また ZEB2 は局所再発が有意に多い結果であった。累積 5 年生存率においても ZEB1, ZEB2 とともに高発現群は有意に生存率が低いことがわかった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hashiguchi Yuma, Kawano Shintaro, Goto Yuichi, Yasuda Kaori, Kaneko Naoki, Sakamoto Taiki, Matsubara Ryota, Jinno Teppei, Maruse Yasuyuki, Tanaka Hideaki, Morioka Masahiko, Hattori Taichi, Tanaka Shoichi, Kiyoshima Tamotsu, Nakamura Seiji	4. 巻 233
2. 論文標題 Tumor-suppressive roles of Np63 -miR-205 axis in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma via targeting ZEB1 and ZEB2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 6565 ~ 6577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.26267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Maruse Y, Kawano S, Jinno T, Matsubara R, Goto Y, Kaneko N, Sakamoto T, Hashiguchi Y, Moriyama M, Toyoshima T, Kitamura R, Tanaka H, Oobu K, Kiyoshima T, Nakamura S.	4. 巻 47
2. 論文標題 Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oral Maxillofac Surg.	6. 最初と最後の頁 836-845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijom.2018.01.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kaneko N, Kawano S, Yasuda K, Hashiguchi Y, Sakamoto T, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Morioka M, Hattori T, Tanaka S, Tanaka H, Kiyoshima T, Nakamura S.	4. 巻 75
2. 論文標題 Differential roles of kallikrein-related peptidase 6 in malignant transformation and Np63 -mediated epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oral Oncol.	6. 最初と最後の頁 148-157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oraloncology.2017.11.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kitamura R, Toyoshima T, Tanaka H, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Oobu K, Nakamura S.	4. 巻 14(6)
2. 論文標題 Cytokeratin 17 mRNA as a prognostic marker of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 6735-6743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.7066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Kaneko N, Hashiguchi Y, Hattori T, Tanaka S, Kitamura R, Kiyoshima T, Nakamura S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Critical roles of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma and production of matrix metalloproteinase-2 via Np63 -mediated epithelial-mesenchymal transition.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oral Oncol.	6. 最初と最後の頁 15-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oraloncology.2017.03.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naoki Kaneko, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Masakazu Iida, Seiji Nakamura	4. 巻 14
2. 論文標題 Tongue squamous cell carcinoma producing both parathyroid hormone-related protein and granulocyte-colony-stimulating factor	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-016-0918-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 見立 英史, 川野 真太郎, 清島 保, 三上 友里恵, 後藤 雄一, 河津 俊幸, 池邊 哲郎, 中村 誠司	4. 巻 28
2. 論文標題 巨舌を呈した舌対称性脂肪腫症の1例	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本口腔腫瘍学会誌	6. 最初と最後の頁 293-298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5843/jsot.28.293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 垣花 泰之, 安田 智嗣, 二木 貴弘, 大隣 貴仁, 古別府 裕明, 寺田 晋作, 宮本 昇太郎, 山下 翔太, 町田 千尋, 後藤 雄一, 上国料 千夏, 伊藤 隆史
2. 発表標題 敗血症初期蘇生管理における急性血液浄化療法-循環・体液管理- 当施設における敗血症性ショック時の循環管理法
3. 学会等名 日本急性血液浄化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 垣花 泰之, 安田 智嗣, 二木 貴弘, 大隣 貴仁, 古別府 裕明, 寺田 晋作, 宮本 昇太郎, 山下 翔太, 町田 千尋, 後藤 雄一, 上国料 千夏, 八島 望, 十時 崇彰, 谷口 賢二郎, 伊藤 隆史
2. 発表標題 敗血症性ショックにおける急性血液浄化療法の導入意義とは?
3. 学会等名 日本急性血液浄化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 康大, 浜田 倫史, 有村 麻弥, 松村 吉晃, 山城 康太, 内野 祥徳, 森 和樹, 日焼 菜央美, 後藤 雄一, 杉浦 剛
2. 発表標題 Detecting oral squamous cell carcinoma by novel serum microRNA panel
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部 多市, 川野 真太郎, 三上 友里恵, 筑井 徹, 河津 俊幸, 松原 良太, 後藤 雄一, 金子 直樹, 坂本 泰基, 橋口 有真, 神野 哲平, 丸瀬 靖之, 田中 翔一, 大部 一成, 中村 誠司
2. 発表標題 舌エコーの画像所見による潜在的頸部リンパ節転移の予測
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山城 康太, 浜田 倫史, 内野 祥徳, 有村 麻弥, 中村 康大, 松村 吉晃, 後藤 雄一, 別府 真広, 比地岡 浩志, 杉浦 剛
2. 発表標題 当科における過去3年間の口腔癌の治療成績に関する臨床病理学的検討
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 : 三島 優美子, 後藤 雄一, 別府 真広, 山下 薫, 濱田 倫史, 坂元 亮一, 今村 晴幸, 杉村 光隆, 杉浦 剛
2. 発表標題 口腔癌術治療時に著明な低ナトリウム血症を認め診断治療に苦慮した2例
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松原 良太, 川野 真太郎, 後藤 雄一, 金子 直樹, 橋口 有真, 坂本 泰基, 中村 誠司
2. 発表標題 シンポジウム U-40 : 頭頸癌診療への挑戦
3. 学会等名 第41回 日本頭頸部癌学会総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taiki Sakamoto, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Naoki Kaneko, Yuma Hashiguchi, Taichi Hattori, Shoichi Tanaka, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura
2. 発表標題 Involvement of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of oral squamous cell carcinoma through Np63 -mediated EMT
3. 学会等名 KAOMS 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂本 泰基・川野 真太郎・松原 良太・後藤 雄一・神野 哲平・丸瀬 靖之・金子 直樹・橋口 有真・服部 多市・田中 翔一・中村 誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の浸潤・遊走における Np63 を介したWnt5a-Ror2シグナル経路の関与
3. 学会等名 第41回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂本泰基・大部一成・金子直樹・後藤雄一・松原良太・神野哲平・丸瀬靖之・橋口有真・服部多市・川野真太郎・中村誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌頸部転移に対するS-1 (UFT) 併用術後化学放射線治療の有用性についての検討
3. 学会等名 九州地区口腔癌研究会 第21回学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂本 泰基・川野 真太郎・松原 良太・後藤 雄一・神野 哲平・丸瀬 靖之・金子 直樹・橋口 有真・服部 多市・田中 翔一・中村 誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の浸潤・遊走における Np63 を介したWnt5a-Ror2シグナル経路の関与
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金子 直樹・川野 真太郎・松原 良太・後藤 雄一・神野 哲平・丸瀬 靖之・坂本 泰基・橋口 有真・服部 多市・田中 翔一・田中 秀明・大部 一成・中村 誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるkallikrein-related peptidase 6の発現と機能に関する研究
3. 学会等名 第41回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金子 直樹・川野 真太郎・松原 良太・後藤 雄一・神野 哲平・丸瀬 靖之・坂本 泰基・橋口 有真・服部 多市・田中 翔一・田中 秀明・大部 一成・中村 誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるkallikrein-related peptidase 6の発現と機能に関する研究
3. 学会等名 第62回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋口 有真、川野 真太郎、後藤 雄一、松原 良太、金子 直樹、坂本 泰基、服部 多市、 田中 翔一、中村 誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における Np63に関連した miR-205の役割について
3. 学会等名 第36回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋口有真, 川野真太郎, 後藤雄一, 松原良太, 神野哲平, 丸瀬靖之, 金子直樹, 坂本泰基, 松村万由, 中村誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるmiR-205の発現と機能に関する研究～特に Np63との関連について～
3. 学会等名 第70回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 坂本泰基, 川野真太郎, 松原良太, 後藤雄一, 神野哲平, 丸瀬靖之, 金子直樹, 橋口有真, 大部一成, 中村誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の遊走能における Np63を介したWnt5a-Ror2シグナル経路の関連
3. 学会等名 第70回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 金子直樹, 川野真太郎, 松原良太, 後藤雄一, 坂本泰基, 橋口有真, 神野哲平, 丸瀬靖之, 松村万由, 中村誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるkallikrein related peptidase 6の発現と機能に関する研究
3. 学会等名 第70回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 金子直樹, 川野真太郎, 松原良太, 後藤雄一, 坂本泰基, 橋口有真, 神野哲平, 丸瀬靖之, 松村万由, 服部多市, 田中秀明, 大部一成, 中村誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるkallikrein related peptidase 6の発現と機能に関する研究
3. 学会等名 第35回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 後藤雄一、瀧田倫史、山下麻由美、中村康大、上川善昭、杉浦 剛
2. 発表標題 右側下顎疼痛を初発症状とし脳腫瘍が発見された症候性三叉神経痛の一例
3. 学会等名 第84回日本口腔外科学会九州支部学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 後藤雄一、今村晴幸、坂元亮一、松村吉晃、石田喬之、別府真広、杉浦 剛
2. 発表標題 左側全顎部郭清後に乳糜胸をきたした1例
3. 学会等名 第35回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松村吉晃、後藤雄一、比地岡浩志、吉村卓也、別府真広、今村晴幸、坂元亮一、杉浦 剛
2. 発表標題 医療用ヒルにて腹直筋皮弁のうっ血状態が改善した1例
3. 学会等名 第35回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学研究者総覧  
<http://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/search?m=home&l=ja>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	橋口 有真  (Hashiguchi Yuma)  (80805268)	九州大学・大学病院・医員    (17102)	
研究協力者	川野 真太郎  (Kawano Shintaro)  (00398067)	九州大学・大学病院・講師    (17102)	
研究協力者	中村 誠司  (Nakamura Seiji)  (60189040)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	
研究協力者	杉浦 剛  (Sugiura Tsuyoshi)  (40322292)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授    (17701)	