

令和元年5月24日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17273

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるtRNA修飾の網羅的解析及び機能解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Exhaustive and functional analysis of tRNA modification in oral squamous cell carcinoma, and development a new treatment strategy

研究代表者

高橋 望 (Takahashi, Nozomu)

熊本大学・医学部付属病院・非常勤診療医師

研究者番号：60779172

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)：本研究では口腔扁平上皮癌においてtRNA修飾が与える影響を解明することを目的とした。口腔扁平上皮癌患者の臨床検体を用いてtRNA修飾の網羅的解析を行った。その結果、ある修飾において腫瘍部が周囲正常組織と比較して優位に増加していることがわかった。また臨床データではT分類、stage分類と統計学的に優位な正の相関関係を認めた。さらに口腔癌細胞株を用いて同修飾の修飾酵素を抑制したところ、増殖能の低下を認め、抗がん剤に対する感受性が増大する傾向にあることが示された。以上の結果より、同修飾はOSCCにおける新規診断、治療法の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は世界的にみても主要な悪性腫瘍の一つでありその80%以上をOSCCが占めている。近年の診断・治療法の進歩にも関わらず、5年生存率に大きな改善はみられていない。その原因として、高転移能、治療抵抗性など腫瘍制御の障壁となる悪性形質をもつ腫瘍細胞が存在していることが挙げられる。tRNA修飾は、迅速かつ正確なタンパク質翻訳に寄与していることが示唆されており、近年様々な疾患との関連性が示唆されている。しかしながら、tRNA修飾とOSCCの発生・進展との関わりについては未解明なままであり、新たな知見を得ることは現在まで大きな改善を認めていない治療成績の向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to determine the functional role of the tRNA modification in the oral squamous cell carcinoma (OSCC). First, we tried exhaustive analysis of tRNA modification by using the clinical sample of OSCC. We found that a certain modification showed significant increase in tumor sample in comparison to peripheral normal tissue. The expression status of this modification correlated with T classification and clinical stage. In addition, suppression of this modification enzyme showed decrease of proliferating ability and increase of anticancer drug sensitivity in cultured OSCC cell. These results suggest that tRNA modification may be a promising target for new diagnostic modality and treatment strategy.

研究分野：歯科口腔外科学分野

キーワード：tRNA修飾 口腔癌 臨床検体 質量分析 SAS 抗がん剤 5-FU

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は世界的にみても主要な悪性腫瘍の 1 つでありその 80%以上を口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma : SCC) が占めている。近年の診断・治療法の進歩にも関わらず、5 年生存率に大きな改善はみられない (Siegel et al. CA Cancer J Clin 2012)。その原因として、高転移能、治療抵抗性など腫瘍制御の障壁となる悪性形質をもつ腫瘍細胞が存在していることが挙げられる (Hanahan & Weinberg. Cell 2011)。近年、そのような高悪性腫瘍細胞の生物学的特徴の理解が多面的に行われ、新たな知見が示されている。

tRNA は多彩な翻訳後修飾を受けることが明らかになっており、これまでに 100 種類以上の修飾が tRNA の塩基に見出されている (Machnicka et al. Nucleic Acids Res. 2013)。これらの修飾は、迅速かつ正確なタンパク質翻訳に寄与していることが示唆されている。中でもイオウを含む修飾は翻訳の質およびその下流の細胞機能に重要であり、同修飾の破綻が糖尿病やミトコンドリア病発症に関与することが最近明らかとなった (Wei et al. J. Clin. Invest. 2011, Wei, Takahashi et al. Cell Metab. 2015)。また、他領域ではあるが子宮頸癌細胞において一部の tRNA 修飾と抗癌剤感受性との関連性の報告も認めている (Okamoto et al. PLOS Gen. 2014.)。

### 2. 研究の目的

tRNA 修飾と OSCC の発生・進展との関わりについては未解明なままであり、新たな知見を得ることは現在まで大きな改善を認めていない治療成績の向上に寄与することが期待される。そこで本研究では、OSCC における tRNA 修飾の臨床的意義、特に予後に大きな影響を与える転移能や治療抵抗性との関わりや新たな分子ネットワークの解明を行う。従来と全く違うアプローチで OSCC と向き合い、新規治療法開発にも大きく貢献できるものと考えられる。また、tRNA 修飾が調節する癌悪性形質の解明は OSCC の研究向上に寄与するだけでなく、他癌腫における高悪性腫瘍細胞の制御機構解明にも新たな知見をもたらす、その治療法開発に貢献すると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### 質量分析法による tRNA 修飾の網羅的解析

申請者は現在までに tRNA 修飾の中でもチオメチル化 ( $ms^2$ ) 修飾の解析を行ってきた (Takahashi et al. Nucleic Acids Res. 2016)。そのような中、近年、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた tRNA 修飾の網羅的解析の手法が発表され、約 30 種類の修飾における Dynamic MRM (Multiple Reaction Monitoring) のパラメーターが明らかになった (Dan et al. Nat Protoc. 2014)。そこで本研究では OSCC 患者より得られた腫瘍組織及び周囲正常組織を用いて total RNA を精製し tRNA 修飾の網羅的解析を行う。腫瘍組織において正常組織と比較して修飾量に変化が見られるかを評価する。同解析から抽出した特定の修飾において臨床データと統計学的な解析を行い、臨床的な意義を見出す。

#### 培養細胞における tRNA 修飾の機能的解析

OSCC 細胞株を用いて網羅的解析によって抽出された特定の tRNA 修飾について、siRNA を用いてその修飾酵素を抑制し、腫瘍性質に与える影響について解析を行う。WST assay、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法により機能解析を行う。また、同細胞に抗がん剤である 5-FU を投与し、感受性の変化について検討する。

### 4. 研究成果

#### 質量分析法による tRNA 修飾の網羅的解析

OSCC 患者より得られた腫瘍組織及び周囲正常組織を用いて tRNA 修飾の網羅的解析を行ったところ、腫瘍において有意に増加している修飾が存在することを見出した (図 1)。同修飾量と患者ごとの臨床データ (年齢、性別、臨床型、T 分類、N 分類、stage 分類、分化度、YK 分類) について統計学的に解析を行なったところ、T 分類と stage 分類において有意な正の相関関係を認めた (図 2)。これらの結果は、tRNA 修飾が OSCC の発生や進展に深く関与している可能性を示唆しており、tRNA 修飾が OSCC の病態形成に及ぼす影響を解明することは、新たな診断・治療法の創出をもたらすことにつながると考えられた。

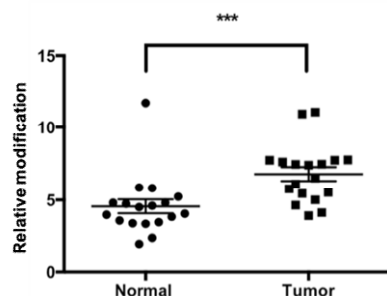


図1

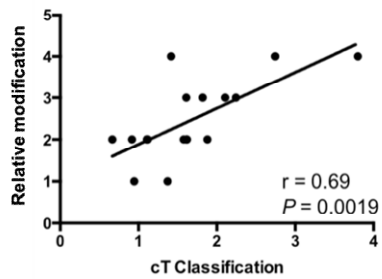


図2

培養細胞における tRNA 修飾の機能的解析  
 OSCC 細胞株を用いて網羅的解析によって抽出された tRNA 修飾について、OSCC 細胞株 SAS を用いて機能解析を行なった。siRNA を用いて特定の修飾酵素の発現を抑制し、実験を行なった。siRNA を遺伝子導入することにより修飾酵素の発現量は低下し、それに伴い同修飾量も有意に減少した。さらに WST assay にて増殖能を評価したところ、修飾酵素を抑制した細胞はコントロール群と比較して有意に増殖が抑制されていた(図3)。また、ミトコンドリアタンパクである MT-CO のタンパク発現量も低下しており、ミトコンドリアの機能低下が疑われた(図4)。同細胞に 5-FU を投与したところ、修飾酵素抑制細胞において細胞死が有意に増加していた。

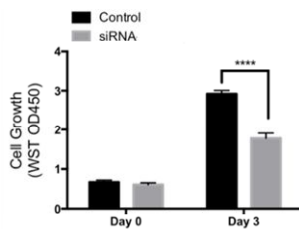


図3

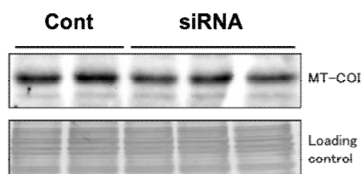


図4

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Junki Sakata, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Kenta Kawahara, Takuya Nakamura, Masafumi Nakamoto, Masatoshi Hirayama, Nozomu Takahashi, Hikaru Nakashima, Hidetaka Arita, Hidenao Ogi, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara & Hideki Nakayama. Predictive value of the combination of SMAD4 expression and lymphocyte infiltration in malignant transformation of oral leukoplakia. *Cancer Med.* 6(4):730-738, 2017

Koga K, Yoshida R, Nakamura T, Matsuoka Y, Takeshita H, Takahashi N, Nakamoto M, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H. A rare case of metachronous multiple supernumerary teeth in the bilateral premolar region of the mandible. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 29(2):132-5, 2017

〔学会発表〕(計4件)

口腔扁平上皮癌における tRNA 修飾の網羅的解析 (tRNA modomics) 及び機能解析

高橋望、魏范研、平山真弓、八木田麻耶、廣末晃之、吉田遼司、富澤一仁、中山秀樹

第71回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2017年4月26-28日、ひめぎんホール、愛媛

IGFBP3 は DNA 修復の促進を介して口腔扁平上皮癌に放射線抵抗性を附与する

坂田純基、廣末晃之、吉田遼司、松岡祐一郎、永田将士、川原健太、高橋望、有田英生、中嶋

光、田中拓也、福岡大喜、尾木秀直、中山秀樹  
第 41 回 日本頭頸部癌学会、2017 年 6 月 8-9 日、ウェスティン都ホテル京都、京都  
口腔癌に対する化学放射線治療におけるスパーサー、および補綴物除去の有効性の検討  
井上和繁、平山真敏、吉田遼司、尾木秀直、福岡大喜、廣末晃之、高橋望、有田英生、東家亮、  
村上龍次、大屋夏生、山下康行、中山秀樹、第 55 回 日本癌治療学会学術集会 2017 年 10 月  
20-22 日、パシフィコ横浜、神奈川県  
BRD4 は MMP2 遺伝子座に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  
山本達郎、廣末晃之、中元雅史、川原健太、高橋望、吉田遼司、平木昭光、篠原正徳、斉藤典  
子、中尾光善、中山秀樹、第 36 回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2018 年 1 月 25-26 日  
新潟グランドホテル、新潟

〔図書〕(計 1 件)

熊本大学大学院生命科学研究部放射線診断顎分野 山下 康行 (監修)  
日本大学松戸歯学部放射線学講座 金田 隆 (編著)  
熊本大学大学院生命科学研究部歯科口腔外科学分野 中山 秀樹 (編著)  
宮崎大学医学部病態解析医学講座放射線医学分野 平井 俊範 (編著)  
都城市群医師会病院放射線科 生嶋 一郎 (編著)  
熊本大学大学院生命科学研究部歯科口腔外科学分野 高橋 望 (分担執筆)  
画像診断 別冊 KEY BOOK シリーズ『知っておきたい顎・歯・口腔の画像診断』  
秀潤社、P168-9、2017

〔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 0 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

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。