

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09537

研究課題名(和文) 遠隔転移に関与するエクソソームmicroRNA解析による口腔癌治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of therapeutic targets for oral cancer by microRNA analysis of exosomes involved in distant metastasis

研究代表者

柳本 惣市 (YANAMOTO, Souichi)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：10315260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の遠隔転移に関与するエクソソーム由来microRNAの特定を行った結果、高浸潤口腔癌細胞を分離培養でき、それぞれの細胞培養上清よりエクソソームを単離することができた。また、元細胞をコントロールとしてアレイ解析で網羅的に解析した結果、データベースを参考に3つの細胞に共通して変化する2つのmiR-Xを特定できた。口腔癌患者の末梢血および唾液を用いた検討を行ったところ、特定されたmiR-Xの発現はいずれもみられなかった。本結果から、口腔癌遠隔転移に関与するであろう浸潤能について、癌細胞エクソソーム由来の2つのmiR-Xが重要な役割を果たしてい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

遠隔転移制御を目的とした治療戦略において、口腔癌遠隔転移に高播種性腫瘍細胞エクソソーム由来のmicroRNAが重要な役割を担っていることを明らかにすることができた。さらに実臨床において、血液や唾液を用いて解析することが可能となれば、効率的な治療標的分子シーズをより容易に探索でき、将来的にもリアルタイムで口腔癌患者の病態をモニタリングすることが可能となり、生存率改善へとつながる。

研究成果の概要(英文)：To identify exosome-derived microRNAs involved in the distant metastasis of oral cancer, we were able to isolate highly invasive oral cancer cells and isolate exosomes from the supernatant of each cell culture, and comprehensively analyzed them by array analysis using parental cells as a control. As a result, we were able to identify two miR-Xs that commonly fold change in the three cells, referring to the database. The expression of the identified miR-Xs was not observed in peripheral blood and saliva of oral cancer patients. These results suggest that two miR-Xs derived from cancer cell exosomes may play an important role in the invasive ability that may be involved in oral cancer distant metastasis.

研究分野：口腔腫瘍学

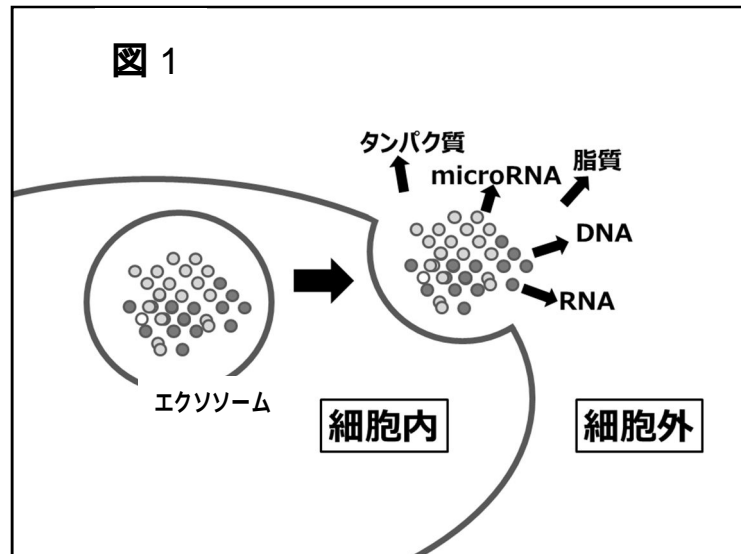
キーワード：口腔癌 遠隔転移 エクソソーム microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌はヒトにおいて全ての癌と診断された症例の 2~3% を占める希少癌で、わが国においても増加傾向にある癌の一つでもある。口腔癌治療法の第一選択は外科的切除であり、術後病理で再発高リスク因子(切除断端近接あるいは転移リンパ節被膜外浸潤)が認められた場合に術後補助化学放射線療法を行うことが世界的に標準治療とされている¹⁾。しかしながら治療成績について、この四半世紀わずかな向上を認めるものの、他領域の癌と比較して大きな変化はないとされている。その理由としては、術後補助化学放射線療法の導入により、局所頸部制御率の向上は得られたものの遠隔転移を制御するには至っていないことが挙げられている。これまでに研究代表者も、口腔癌所属リンパ節転移症例の大規模な多施設共同観察研究を行った結果、術後補助療法は局所頸部制御の向上に寄与したものの遠隔転移死を改善するには至らず、術後補助療法としての放射線への化学療法の上乗せ効果も低かったことを報告している²⁾。最近はいくつかの同様の報告がなされ、特に口腔癌においては同じ頭頸部癌の中でも咽頭癌や喉頭癌などと比較しても術後補助化学放射線療法の恩恵を受ける可能性が低いとも考えられている³⁾。つまり局所頸部制御が良好であっても遠隔転移により経過不良となる場合が多く、今後の口腔癌の生存率向上のためには遠隔転移の制御が重要であると考えられる。このような現状の中で、研究代表者は遠隔転移を生じるような高転移能・高浸潤能(すなわち高播種性)を有する口腔癌細胞を単離することができたが、その表現型に影響を与える分子については明らかにできていない。最近、癌細胞から分泌されるエクソソーム(図1)が、遠隔転移先の癌微小環境形成などを行うことにより癌転移において重要な役割を果たしていることが報告されている⁴⁾。エクソソームは内部にタンパク質、脂質、RNA、DNA および microRNA などを含んでおり、細胞外に分泌された後、体液を介して遠隔組織に取り込まれ、癌細胞同士の細胞間コミュニケーションを行う分子としても注目を集めている。なかでもエクソソームに含まれる特定の microRNA が癌細胞転移・浸潤に重要な役割を果たしていることが各種の癌で報告されている。これまでも研究代表者も

口腔癌細胞を用いた研究において、機能性 RNA の一種である microRNA のうち、miR-21 が、Wnt/ β -catenin 経路の down-regulator である DKK2 の発現を抑制して癌細胞浸潤能を制御していることを明らかにしてきたことから⁵⁾、先に述べた高播種性口腔癌細胞の浸潤・転移にエクソソーム由来の何らかの microRNA が関与しているのではないかと考えた。したがって、口腔癌遠隔転移に高播種性腫瘍細胞エクソソーム由来の microRNA が重要な役割を担っているのではないかと考え、本研究の着想に至った。



2. 研究の目的

本研究では、高播種性口腔癌細胞の浸潤・転移、とくに遠隔転移形成に関するエクソソーム由来の microRNA を特定し、臨床的意義を検証する前向き観察研究を行うことを目的とした。口腔癌の実臨床においては術後の病理組織学的検査で評価を行い、術後補助療法の適応を決定しているのが現状であり、さらにそのレジメンは 30 年以上前から使用されている殺細胞性抗癌薬であるシスプラチンと放射線外照射が標準治療とされており、治療法の進歩に乏しいと言わざるを得ない。口腔癌遠隔転移の形成過程の中で、術後病理組織学的評価を行う段階ではすでに進展した状態である可能性が高く、そのため術後補助療法が遠隔転移を制御できていない大きな要因であると推察される。そこで本研究では、高播種性口腔癌細胞から分泌された特定のエクソソーム由来 microRNA を血液や唾液に存在している状態で検出するリキッドバイオプシーを導入することにより、口腔癌遠隔転移形成能を初期の段階で検出できる点で、口腔癌治療の早期に遠隔臓器への転移を予期することが可能となる(図2)。また実際の口腔癌患者の血液および唾液のサンプルを用いて、特定のエクソソーム由来 microRNA 発現と遠隔転移の臨床像との相関性を前向き観察研究として検討することにより臨床的意義を検証できると考えた。

3. 研究の方法

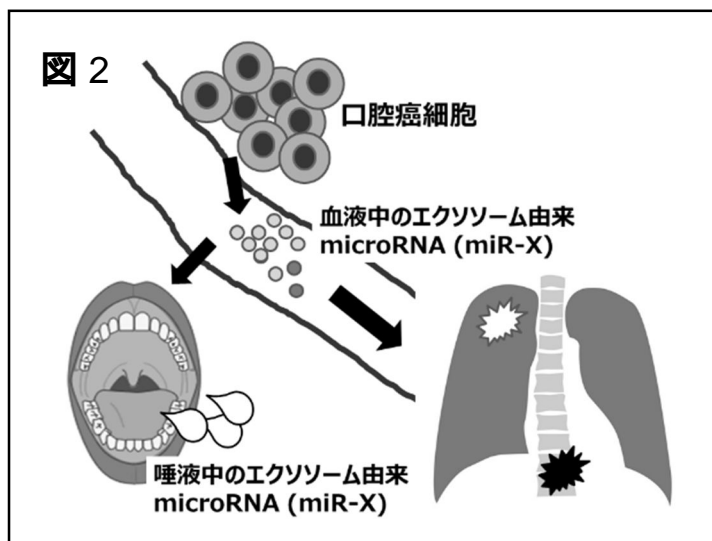
(1) 遠隔転移に関するエクソソーム由来 microRNA の特定

口腔癌細胞 HSC-2、OSC19 および SAS 細胞から、マトリゲルインベージョンチャンバーを用いて、高浸潤能を持つ亜型としてクローニングされた高浸潤口腔癌細胞(それぞれ HSC-2-HI、OSC19-HI および SAS-HI) の培養上清よりそれぞれエクソソームを単離し、small RNA を回収した。Parental cell をコントロールとして microRNA アレイ解析で網羅的に解析した。3 つ

の細胞に共通して fold change する microRNA を候補とし、中でも癌細胞転移に関与する分子を制御している microRNA をデータベース “miRBase (<http://www.mirbase.org/>)” で特定した。さらに特定された microRNA を Parental cell に導入することにより細胞形態や浸潤能がそれぞれの高浸潤能細胞の亜型に類似しているかどうか確認した。

(2) 口腔癌患者の末梢血および唾液のサンプルを用いた検討

実臨床で同意の得られた口腔癌患者の末梢血および唾液をサンプルとして、エクソソームを単離した後、microRNA を抽出した。上記で特定された microRNA の発現を検討し、臨床病理学因子との相関性を明らかにし、臨床的意義について検討した。



4. 研究成果

(1) 遠隔転移に関するエクソソーム由来 microRNA (miR-X) の特定について

口腔癌細胞 HSC-2, OSC19 および SAS 細胞から、マトリゲルインベージョンチャンバーを用いて、高浸潤口腔癌細胞 (それぞれ HSC-2-HI, OSC19-HI および SAS-HI) を分離培養でき、いずれの細胞も Parental cell と比較して約 5 倍の浸潤能を有していた。それぞれの細胞培養上清よりエクソソームを単離することができた。small RNA を回収し、Parental cell をコントロールとしてアレイ解析で網羅的に解析した結果、3 つの細胞に共通して fold change する miR-X について、データベースを参考にして、2 つ特定できた。さらにそれらの miR-X を Parental cell に導入したが、いずれも明らかな細胞形態の変化は認められなかったものの、浸潤能はそれぞれの高浸潤能細胞の亜型に類似していることは確認できた。

(2) 口腔癌患者の末梢血および唾液のサンプルを用いた検討について

実臨床で同意の得られた口腔癌患者の末梢血および唾液をサンプルとして、エクソソームを単離した後、microRNA を抽出したが、上記で特定された miR-X の発現はいずれも認められなかった。その原因としてサンプル量が少なく、エクソソーム単離が行えなかったことや、末梢血の保存状態に問題があったことが予想された。

本研究結果から、口腔癌の遠隔転移に関与するであろう浸潤能について、癌細胞エクソソーム由来の 2 つの miR-X が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。実臨床における癌患者血液あるいは唾液からのエクソソーム由来 miR-X を検出することができなかったが、手術で得られた病理組織標本を用いて、in situ hybridization での miR-X 検出を試みる意義はあると考えられた。

引用文献

- 1) Cooper JS, Pajak TF, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Eng J Med* 2004; 350: 1937-1944.
- 2) Yanamoto S, Otsuru M, et al. Multicenter retrospective study of adjuvant therapy for patients with pathologically lymph node-positive oral squamous cell carcinoma: analysis of covariance using propensity score. *Ann Surg Oncol* 2015; 22: 992-999.
- 3) Kao J, Lavaf A, et al. Adjuvant radiotherapy and survival for patients with node-positive head and neck cancer: an analysis by primary site and nodal stage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71:362-370.
- 4) Santos JC, Ribeiro ML, et al. Exosomes-mediate microRNAs transfer in breast cancer chemoresistance regulation. *Am J Cancer Res* 2016; 6: 2129-2139.
- 5) Kawakita A, Yanamoto S, et al. MicroRNA-21 promotes oral cancer invasion via the Wnt/ β -catenin pathway by targeting DKK2. *Pathol Oncol Res* 2014; 20: 253-261.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yanamoto S., Denda Y., Ota Y., Hasegawa T., Akashi M., Okura M., Yamada S.-I., Kurita H., Yamakawa N., Kirita T., Ueda M., Umeda M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Postoperative adjuvant therapy for patients with loco-regionally advanced oral squamous cell carcinoma who are at high risk of recurrence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 848 ~ 853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijom.2019.12.007	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 -
1. 著者名 Tsuchihashi Hiroki, Naruse Tomofumi, Yanamoto Souichi, Okuyama Kohei, Furukawa Kohei, Omori Keisuke, Umeda Masahiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Selective inhibition of PI3K110 as a novel therapeutic strategy for cetuximab-resistant oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 863 ~ 872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2020.7674	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 -
1. 著者名 Yanamoto Souichi, Soutome Sakiko, Murata Maho, Kawakita Akiko, Yamaguchi Erika, Yoshida Kazuhiro, Kurogi Tadafumi, Kuroshima Shinichiro, Murata Hiroshi, Sawase Takashi, Umeda Masahiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Efficacy of silicone soft reliner on the obturator prosthesis after maxillectomy for oral malignant tumors: A single arm prospective interventional study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dental Research	6. 最初と最後の頁 612 ~ 617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cre2.326	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 -
1. 著者名 Okuyama Kohei, Suzuki Keiji, Naruse Tomofumi, Tsuchihashi Hiroki, Yanamoto Souichi, Kaida Atsushi, Miura Masahiko, Umeda Masahiro, Yamashita Shunichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Prolonged cetuximab treatment promotes p27Kip1-mediated G1 arrest and autophagy in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5259 ~ 5259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84877-4	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福嶋大将, 柳本惣市, 大森景介, 鳴瀬智史, 古川浩平, 中村則夫, 梅田正博
2. 発表標題 口腔癌頸部リンパ節転移節外浸潤の進展に関する臨床病理学的検討
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福嶋大将, 柳本惣市, 大鶴光信, 末吉駿幸, 大森景介, 鳴瀬智史, 古川浩平, 梅田正博
2. 発表標題 早期口腔扁平上皮癌におけるcell-in-cell構造の臨床的検討
3. 学会等名 第39回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------