

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09796

研究課題名(和文) MIA2関連シグナルを標的とした口腔癌の分子診断・治療の新展開

研究課題名(英文) New Developments in Molecular Diagnosis and Therapy of Oral Cancer by Targeting MIA2-related Signals

研究代表者

栗原 都 (Kurihara, Miyako)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：40453170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Melanoma inhibitory activity (MIA family) は口腔癌の進展に関与する分泌タンパクである。本研究期間中において、申請者らはMIA familyに関連したシグナルとしてpyruvate kinase (PKM)、miR29b-1-5p、non-SMC condensin I complex subunit H (NCAPH)、mucin20 (MUC20)などを新たに見いだした。それらの分子は機能こそ異なっているが、いずれも口腔癌の進展を促進する因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MIA familyは分泌タンパクであることから血液や尿などの体液からも検出可能であり、治療だけではなく診断標的としての利用も可能である。特に、唾液中にも分泌されることより、低侵襲かつ繰り返し検査が可能な診断マーカーとしての有用性も示唆される。口腔癌は進行癌として見つかることが多いだけでなく、術後の顔貌の変化が余儀なくされるために審美性の低下によるQOLの低下が大きな問題となる。申請者らが見いだした知見は、口腔癌の早期発見・早期治療のあらたな診断、治療標的として臨床応用への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Melanoma inhibitory activity (MIA family) is a secreted protein involved in the progression of oral cancer. During the course of this study, the applicants newly identified pyruvate kinase (PKM), miR29b-1-5p, non-SMC condensin I complex subunit H (NCAPH), and mucin20 (MUC20) as signals related to the MIA family. The results of this study are as follows. Although these molecules have different functions, they were all found to be factors that promote the progression of oral cancer.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 MIA family MIA2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌が浸潤・転移するには がん細胞の遊離 増殖能と浸潤能の獲得 脈管侵襲 脈管外への遊出 転移臓器での増殖といった出来事が必須である。これらの浸潤・転移カスケードのうちどこかを遮断すれば理論上はがんを制御可能なはずであるが、実際にはこれらの過程において引き起こされる様々な遺伝子異常が複雑に作用するため、分子標的の候補を絞り込むのは容易ではない。また、生じる遺伝子異常の多くは口腔癌の進展に伴い付随的に生じたパッセンジャー変異である。がんの発生・進展に直接影響するドライバー遺伝子を同定することは有効な分子標的治療に直結するため、一日も早く口腔癌のドライバー遺伝子を同定することが望まれる。

申請者らは MIA gene family である MIA2 が口腔癌の新規腫瘍関連因子であることを見いだしている。MIA2 は一般的に腫瘍抑制性に作用するが、MIA や受容体であるインテグリンと相互作用することにより口腔癌では脈管新生や宿主免疫能の低下を誘導する。さらに MIA2 に関連した新規因子を幾つか明らかにした。PAUF は口腔癌においてシスプラチン耐性の獲得やリンパ節転移を促進する。しかしながらがんにおける MIA2 の機能やシグナル伝達経路はいまだに不明な点が多く、臨床応用の可能性を探るため詳細な解析が急がれる。

2. 研究の目的

本研究は MIA2 の機能ならびに関連シグナルの解明により、口腔癌診断・治療の新展開を模索することを目的とする。申請者らが見出した MIA2 に関連したシグナルは口腔癌のドライバー遺伝子となるポテンシャルを有している可能性が高く、治療標的としての臨床応用が期待される。また MIA2 は低分子量の分泌タンパクであることから口腔癌患者の血清や唾液中の有用な腫瘍マーカーとなりうる可能性もある。特に唾液マーカーとして有用であれば簡便かつ低侵襲な検査が可能となる。

3. 研究の方法

本研究の概略は下記の通りである。

(1) MIA2 関連シグナルの詳細な機能の解明

複数の口腔癌細胞株を用い、網羅的遺伝子発現解析により MIA2 関連シグナルの全貌を明らかにする。抽出された MIA2 関連シグナルを過剰発現ないし発現抑制する口腔癌細胞株を作製し、これらの細胞株とコントロール細胞株を用いて、増殖/浸潤/遊走能、アポトーシス誘導能・薬剤耐性能、脈管新生能、代謝能などへの影響を調べる。これらの解析を通して MIA2 に関連した重要な新規シグナルの候補を決定する。

また、microRNA に関しては、標的遺伝子と発現レベルが逆相関し、microRNA の活性化ないし抑制処理により標的遺伝子の発現が変化し、ルシフェラーゼレポーターアッセイで標的遺伝子 b- の 3' -UTR に結合するという条件を満たしたものを、MIA2 関連遺伝子の発現調節を規定する microRNA として同定する。

(2) 臨床検体を用いた発現解析による腫瘍マーカーとしての有用性の探索

口腔癌患者のパラフィン切片を用い、免疫組織化学的に MIA2 関連シグナルの発現解析を行い臨床病理学的な意義を検討する。またパラフィン切片から laser-capture microdissection (LMD) により分離した癌細胞から small RNA を含む total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析および microRNA 発現解析を行う。

(3) 動物実験

高転移性の口腔癌細胞株をヌードマウスに皮下移植し、コントロール群と比較して MIA2 関連シグナルを発現抑制ないしは増強させることによる増殖・浸潤能、アポトーシス誘導能、脈管新生能、転移能等への影響を継続的に観察する。実験期間は最大で 4 週間とし、移植後 24 時間、48 時間、72 時間、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間にヌードマウスを安楽死させる。これらにより口腔癌における MIA2 ならびに関連シグナルの診断・治療標的としての有用性を検討する。

4. 研究成果

(1) ピルビン酸キナーゼと口腔癌について

MIA2 関連シグナルを解析するなかで、解糖の最終段階を触媒するピルビン酸キナーゼ(PK)に関する因子が MIA gen family に関与している可能性が明らかとなった。PK のアイソフォームのうち、多くの癌細胞では高頻度に PKM1 から PKM2 への移行を認めるが、口腔癌における PKM の発現と機能についてはほとんど知られていない。口腔癌検体における PKM の発現を調べたところ、口腔癌細胞では PKM2/PKM1 比が隣接する正常粘膜細胞や異形成患者から得た検体よりも高いことが示され、特に PKM2 の発現は、免疫組織化学的に口腔癌の進展と強く相関していた。また、口腔癌では HIF-1 α を介した PKM1 から PKM2 への shift が生じることで増殖能の増強をもたらすことを見いだした(図 1)。

ヒト口腔癌細胞を用いて機能解析を行ったところ、PKM2 により ATP 産生、ミトコンドリア活性、乳酸産生、ROS の産生が調節されることが明らかとなった。さらに、高いエネルギーフローを示し、その代謝が好気性解糖と酸化的リン酸化に依存する HSC3 細胞において PKM2 の発現が高く、細胞増殖、浸潤、アポトーシス抵抗性を助長することが明らかとなった。この結果から、PKM2 が OSCC 細胞において様々な腫瘍進行機能を持つことが示唆された。

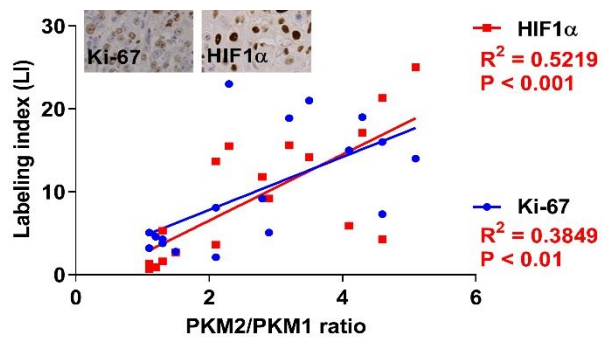


図 1 口腔癌における PKM2/PKM1 比

(2) miR-29b-1-5p と口腔癌について

MIA gene family に関連した microRNA として miR-29b-1-5p を見いだした。がんにおいて、miR-29b-1-5p の発現はスニチニブ耐性腎癌細胞やトリプルネガティブ乳癌で発現が低下しているが、一方で、高いレベルでの miR-29b-1-5p の発現は膀胱癌細胞の増殖や胃癌の発生に寄与するとも報告されており、その機能についてはいまだ不明な点が多い。49 例の口腔癌患者のパラフィン切片から LMD により small RNA を含む total RNA を抽出してリアルタイム RT-PCR による発現解析を行ったところ、

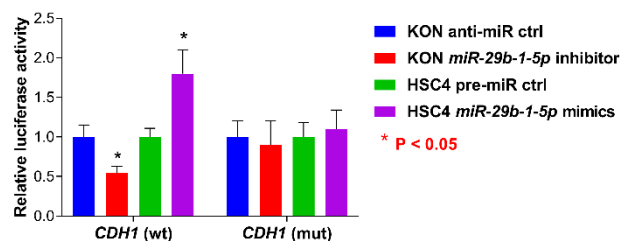
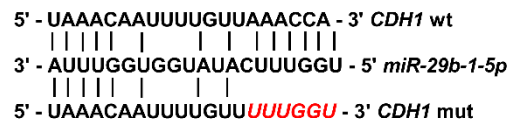


図 2 口腔癌細胞株に本結果は、NCAPH が OSCC におけ

健常者と比較して口腔癌患者では miR-29b-1-5p の発現量は有意に高かった。また、口腔癌において miR-29b-1-5p は組織学的に低分化な症例、EMT を示す症例、および c-Met の発現が高い症例ほど高発現しており、miR-29b-1-5p の発現を示す症例は予後不良であった。In vitro の検討において、EMT 表現型を示す口腔癌細胞では miR-29b-1-5p のノックダウンにより EMT が抑制されたが、c-Met の強制発現により EMT 形質が回復した。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、EMT と密接に関与する CDH1 が miR-29b-1-5p の直接的な標的遺伝子であることが明らかとなった(図2)。以上より、miR-29b-1-5p は、c-Met と相乗的に口腔癌細胞の EMT を誘導する腫瘍促進性 microRNA として働くことが示唆された。

(3) NCAPH と口腔癌について

NCAPH は腫瘍促進性の分子と考えられており、その過剰発現は、卵巣癌および大腸癌において、それぞれカルボプラチンおよび放射線に対する抵抗性と関連している。さらに、NCAPH はホルモン感受性前立腺癌において去勢抵抗性にも関与している。しかしながら、口腔癌における NCAPH は不明な点が多い。口腔癌 142 例を用いた検討をおこなったところ、NCAPH の発現はリンパ節転移およびリンパ管浸潤と強く相関しており、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析において、NCAPH の発現は口腔癌の独立した予後不良因子であった。口腔癌細胞株を用いた in vitro の検討において、NCAPH は血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞の遊走・増殖と口腔癌細胞株の接着を促進させ、さらには口腔癌細胞株における白金製剤(シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン)に対する耐性獲得に関与していることも明らかとなった(図3)。本結果は、NCAPH が口腔癌における新規診断・治療標的となりうることを示唆するものである。

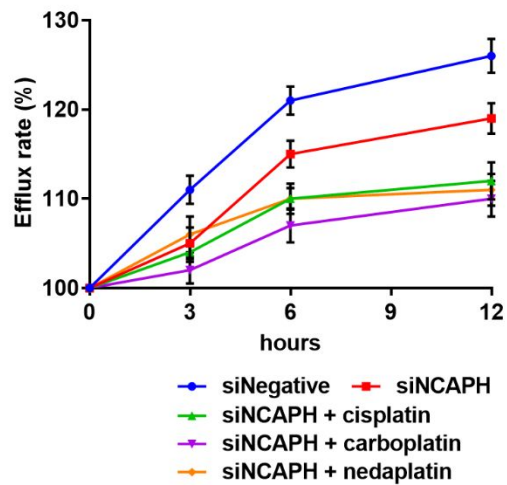


図3 口腔癌の白金製剤耐性と NCAPH

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasahira T, Kurihara-Shimomura M, Nishiguchi Y, Shimomura H, Kirita T	4. 巻 21
2. 論文標題 Sushi repeat containing Protein X-linked 2 Is a downstream signal of LEM domain containing 1 and acts as a	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E3655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103655	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 Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Shimomura H, Kirita T	4. 巻 21
2. 論文標題 Peroxisome plays a tumor-promoting role in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol	6. 最初と最後の頁 E5416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155416	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 Sasahira T, Kurihara-Shimomura M, Shimomura H, Bosserhoff AK, Kirita T	4. 巻 147
2. 論文標題 Identification of oral squamous cell carcinoma markers MUC2 and SPRR1B downstream of TANGO	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1659-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-021-03568-9	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 Shimomura H, Sasahira T, Nakashima C, Kurihara-Shimomura M, Kirita T	4. 巻 9
2. 論文標題 Non-SMC condensin I complex subunit H (NCAPH) is associated with lymphangiogenesis and drug resistance in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 pii: E72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9010072	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 該当する

1. 著者名 Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Shimomura H, Bosserhoff AK, Kirita T	4. 巻 56
2. 論文標題 Mast cell chymase promotes angiogenesis and lymphangiogenesis mediated by activation of melanoma inhibitory activity gene family members in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 1093-1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.4996	査読の有無 無
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 Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Nakamura H, Nakashima C, Kuniyasu H, Kirita T	4. 巻 71
2. 論文標題 Zinc finger AN1-type containing 4 is a novel marker for predicting metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Pathol	6. 最初と最後の頁 436-441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2017-204770	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 Sasahira T, Nishiguchi Y, Kurihara-Shimomura M, Nakashima C, Kuniyasu H, Kirita T	4. 巻 144
2. 論文標題 NIPA-like domain containing 1 is a novel tumor-promoting factor in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sasahira T, Nishiguchi Y, Kurihara-Shimomura M, Nakashima C, Kuniyasu H, Kirita T	6. 最初と最後の頁 875-882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-018-2612-x	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 Shimomura H, Sasahira T, Nakashima C, Shimomura-Kurihara M, Kirita T	4. 巻 50
2. 論文標題 Downregulation of DHRS9 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology	6. 最初と最後の頁 642-647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pathol.2018.06.002	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 Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Nakashima C, Kuniyasu H, Shimomura H, Kirita T	4. 巻 19
2. 論文標題 The Multifarious Functions of Pyruvate Kinase M2 in Oral Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 pii: E2907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19102907	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 Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Shimomura H, Nakashima C, Kirita T	4. 巻 8
2. 論文標題 The Oncogenic Activity of miR-29b-1-5p Induces the Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 pii: E273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8020273	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笹平智則、栗原 都、下村弘幸、桐田忠昭
2. 発表標題 SRPX2はLEMD1の下流シグナルであり、口腔癌において腫瘍促進性に作用する新規分子である
3. 学会等名 第31回日本臨床口腔病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹平智則、栗原 都、下村弘幸、桐田忠昭
2. 発表標題 SRPX2は口腔癌における新規腫瘍促進因子である
3. 学会等名 第39日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村弘幸、栗原 都、桐田忠昭、笹平智則
2. 発表標題 NCAPHは口腔癌のリンパ管新生、抗癌剤耐性に関与する
3. 学会等名 第39日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 都、笹平智則、桐田忠昭
2. 発表標題 Mast cell chymaseはMIA gene familを介した脈管新生を促進する
3. 学会等名 第39日本口腔腫瘍学会総会
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
研究 分担 者	笹平 智則 (Sasahira Tomonori) (90405374)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	

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