

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09816

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における転移関連 microRNA の探索

研究課題名(英文) Metastasis-related microRNAs in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

徳善 紀彦 (TOKUZEN, NORIHIKO)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10723843

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)：本研究では口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移予測に有用となるmicroRNA(miRNA)を探索した。口腔扁平上皮癌組織を用いて miRNA マイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、腫瘍部において5倍以上の有意な発現変動を示す15種類のmiRNAを同定した。そのうち頸部リンパ節転移と関連し有意な発現変動を示すmiRNAとして唯一miRNA-375(miR-375)を同定した。同定したmiR-375の発現からリンパ節転移予測マーカー検討したところ、有用なマーカーとなる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、口腔扁平上皮癌細胞の臨床的にリンパ節転移を認めていない症例については経過観察もしくは予防的頸部郭清術が行われている。経過観察を行った20%の症例では頸部リンパ節に転移を認め、予防的頸部郭清を行った80%ではオーバートリートメントとなってしまう。今回の研究で miR-375 の発現でリンパ節転移の予測マーカーとしての有用性が示唆された。そのため cNO 症例においては生検時にmiR-375 の発現を評価し、miR-375 高発現群は経過観察とし、miR-375 低発現群は予防的頸部郭清を行うことができれば、より治療成績の向上につながることを期待できる可能性が示唆される

研究成果の概要(英文)：In this study, we have attempted to identify metastasis-related miRNAs in human OSCC. We performed the miRNA array analysis using total RNA from OSCC and normal tissues. As a result, we found that 5 miRNAs were significantly up-regulated and 10 miRNAs were down-regulated more than 5-fold changes in OSCC compared to normal tissues. We identified down-regulation of miRNA-375 expression was significantly associated with lymph node metastasis. Subsequently, we investigated the expression levels of miR-375 in primary tumor tissues with the presence or absence of lymph node metastasis by quantitative RT-PCR. The usefulness as a predictor of lymph node metastasis was evaluated by digital PCR. When the reference value was set to 145.50 copies / μ l, the sensitivity was 74.2%, the specificity was 89.5%, and the accuracy was 80.0%. These results suggest that miR-375 has potential as predicting lymph node metastasis and prognostic biomarker in OSCC.

研究分野：口腔扁平上皮癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 microRNA リンパ節転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は進行に伴い、頸部リンパ節に転移を認める事が多く、頸部リンパ節転移の有無は重要な予後因子である。頸部リンパ節転移には様々な画像検査が用いられるが、微小な転移などの診断は困難であり、画像診断の限界と考えられる。miRNA は 18~25 塩基からなる小分子 RNA で、標的 mRNA に結合することで、その蛋白質への翻訳を阻害する。現在までに 1,996 種類のヒト miRNA がデータベース (miRBase Ver.21) に登録されており、これら miRNA の発現あるいは機能異常が種々の疾患に関与していることが明らかにされている。特に、癌領域では miRNA マイクロアレイを用いた網羅的発現解析により発現亢進および発現低下している miRNA が多数同定されている。口腔扁平上皮癌において、頸部リンパ節転移を予測する miRNA についての報告は乏しく、miRNA を用いて頸部リンパ節転移を予測する事ができるのであれば、口腔扁平上皮癌の治療成績の向上に寄与できるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では口腔扁平上皮癌組織および隣接正常口腔粘膜から total RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析を行い、口腔扁平上皮癌において有意に発現変動する miRNA を抽出する。さらにそれらの miRNA の発現とリンパ節転移や遠隔転移との関連性、標的遺伝子および口腔扁平上皮癌細胞株に及ぼす影響を明らかにし、口腔扁平上皮癌の転移予測マーカーとしての有用性を検討することを目的としている。

3. 研究の方法

臨床的頸部リンパ節転移を認めなかった早期癌(cT1、T2)症例の原発腫瘍組織から Total RNA を抽出し、Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix) を用いてマイクロアレイ解析を行う。口腔扁平上皮癌組織で発現異常を認めた miRNA については、選択的頸部郭清術で頸部リンパ節に転移を認めた症例および後発リンパ節転移や遠隔転移を認めた症例を転移陽性群と転移を認めなかった転移陰性群との間における発現について検討を行い、転移関連 miRNA を同定する。マイクロアレイ解析の結果を検証するために、頸部リンパ節転移の有無によって症例を分類し、それぞれの原発腫瘍組織での転移関連 miRNA の発現を miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) を用いてリアルタイム定量化 RT-PCR 法にて定量する。

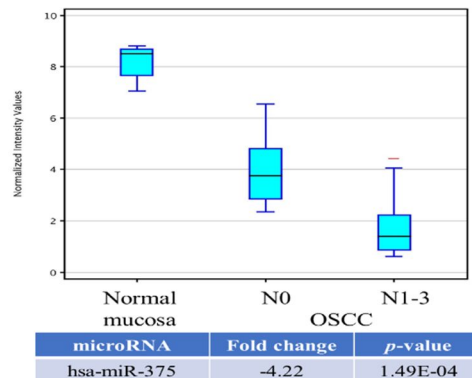
同定した転移関連 miRNA の機能阻害 locked nucleic acid (LNA) アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび模倣型合成 miRNA をヒト口腔扁平上皮癌細胞に導入する。これら合成核酸導入後、Dojindo 社製の WST-8 にて細胞数を定量することにより細胞増殖への影響を評価し、Corning BioCoat 癌細胞浸潤アッセイシステムを用いて浸潤遊走能を評価する。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌における microRNA 発現

口腔扁平上皮癌組織で発現変動する miRNA を同定するために、手術標本の腫瘍および隣接正常部より抽出した total RNA を用いて miRNA マイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、腫瘍部と正常部におけるそれぞれの発現量を比較した。その結果、腫瘍部において 5 倍以上発現亢進する miRNA を 5 種類、1/5 以下に発現低下する miRNA を 10 種類同定した(図 1)。さらに、これら miRNA と悪性度すなわちリンパ節転移や遠隔転移との関連性を検討したところ、リンパ節転移と有意な相関を示す microRNA として miR-375 を同定した(図 2)。

miRNA	Fold Change	p-value
hsa-miR-424-3p	11.87465	1.18E-10
hsa-miR-31-3p	8.339533	0.001011
hsa-miR-196a-5p	7.574111	0.00294
hsa-miR-21-3p	6.212132	1.46E-11
hsa-miR-4417	5.202301	7.70E-04
hsa-miR-6504-3p	-5.2296	1.35E-08
hsa-miR-1224-5p	-6.33952	2.33E-06
hsa-miR-6875-5p	-6.58058	2.18E-06
hsa-miR-451a	-6.64615	0.003848
hsa-miR-4462	-7.61517	9.00E-09
hsa-miR-3935	-7.6508	2.41E-06
hsa-miR-6746-5p	-15.7211	2.32E-08
hsa-miR-617	-17.8892	9.22E-24
hsa-miR-5580-3p	-38.1652	2.97E-19
hsa-miR-375	-52.6635	3.78E-09

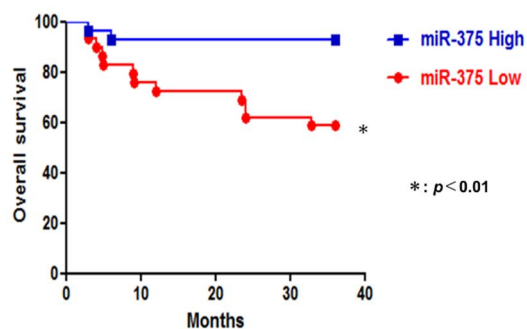
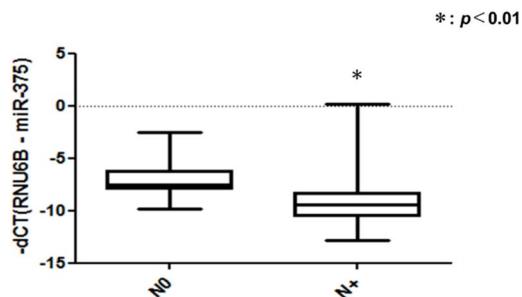


(図 1 口腔扁平上皮癌における miRNA の発現異常)

(図 2 転移関連 miRNA の探索)

(2) 口腔扁平上皮癌における miR-375 の発現

リアルタイム定量化 RT-PCR 法にて原発腫瘍組織における miR-375 の発現量と頸部リンパ節転移との関連について検討を行ったところ、マイクロアレイ解析と同様に頸部リンパ節転移を有する症例では有意に miR-375 の発現低下を認めた(図 3)。さらに miR-375 の発現から、miR-375 高発現群と低発現群の 2 つのグループに分けて予後について検討を行ったところ、miR-375 低発現群は高発現群と比較し、有意に予後不良であった(図 4)。リンパ節転移予測マーカーとし

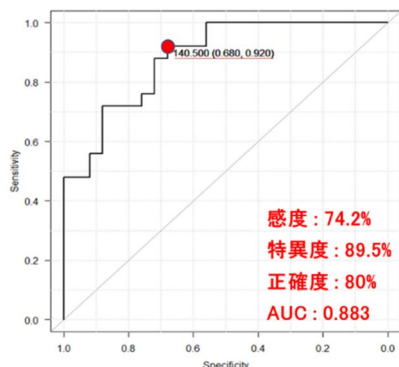


(図 3 頸部リンパ節転移と miRNA-375 の発現)

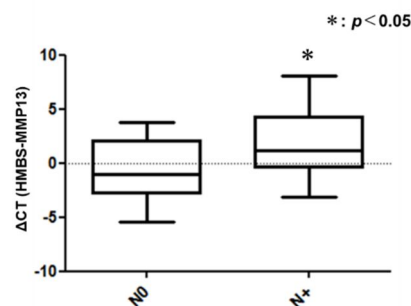
(図 4 miR-375 の発現と予後)

での miR-375 の有用性を検討するために、当科で口腔扁平上皮癌と診断した 50 症例の原発組織から Total RNA を抽出し、cDNA を作成したのちに、QuantStudio™ 3D デジタル PCR システ

Δを用いて症例毎の miR-375 の発現を絶対定量した。miR-375 の発現から ROC 曲線を用いてカットオフポイントを設定した。その結果、miR-375 の基準値を 145.5 copies/μl と設定すると感度 74.2%、特異度 89.5%、正確度 80.0%、AUC は 0.883 であった(図 5)。さらに miR-375 の標的遺伝子報告されている MMP13 (Int J Oncol. 2016; 49(6):2255-2264) の発現を口腔扁平上皮癌組織で qRT-PCR 法で検討した。その結果、リンパ節転移を有する症例では MMP13 が有意に発現亢進をしていた(図 6)。



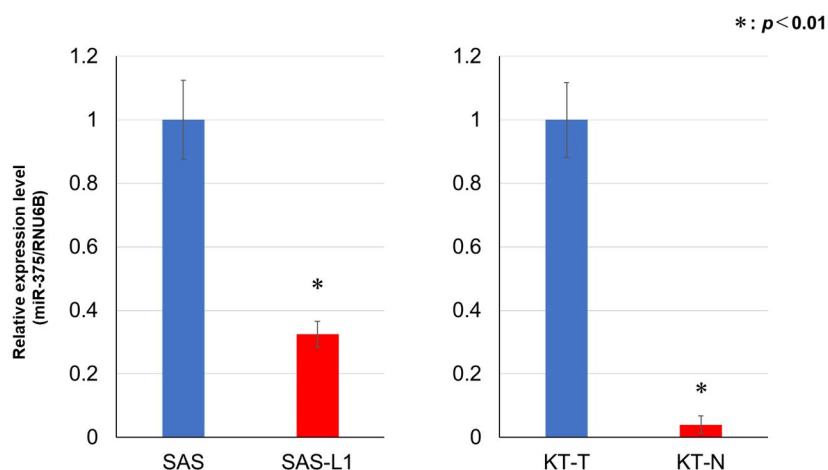
(図 5 ROC 曲線)



(図 6 頸部リンパ節転移と MMP13 の発現)

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株における miR-375 の発現

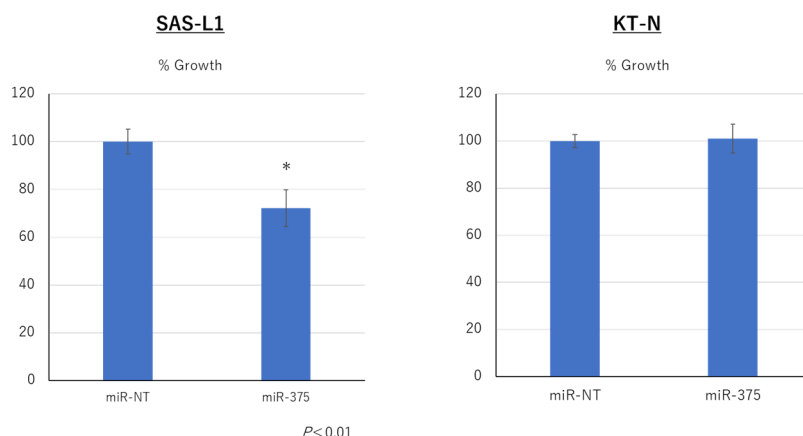
口腔扁平上皮癌細胞株 SAS をマウスの舌に移植し、頸部リンパ節転移巣から樹立した SAS-L1 細胞および当科で治療を行った下顎歯肉癌原発組織およびリンパ節転移巣から初代培養を行い、細胞を樹立した。原発巣から樹立した細胞を KT-T 細胞、リンパ節転移巣から樹立した細胞を KT-N 細胞とした。それぞれ細胞株から total RNA を抽出し、qRT-PCR にて miR-375 の発現量を比較検討した。その結果、原発腫瘍と比較し、転移巣由来の細胞株では有意に miR-375 の発現低下が認められた(図 7)。



(図 7 原発腫瘍および転移巣由来の細胞株における miRNA-375 の発現量)

(4) 口腔扁平上皮癌細胞における miR-375 の増殖に与える影響

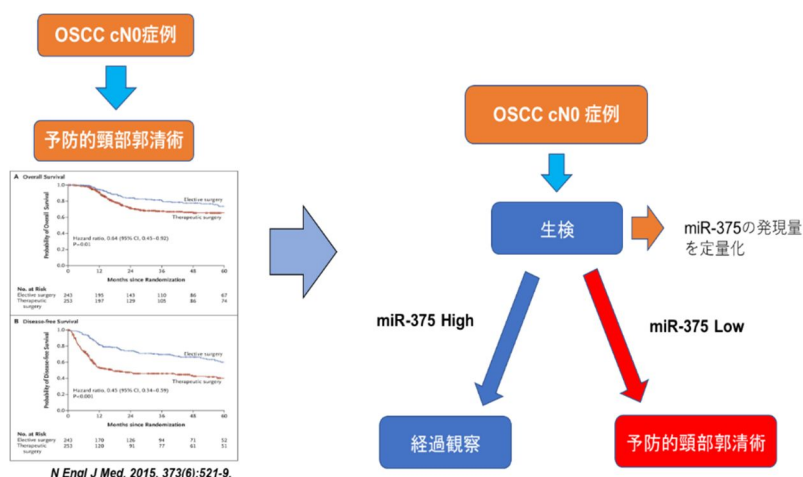
SAS-L1 細胞および KT-N 細胞に合成 miR-non target、合成 miR-375 をそれぞれ 20nM の濃度で Lipofectamine® RNAiMAX を用いてリバーストランスフェクションし、3 日間処理し、WST-8 Assay を用いて増殖抑制効果を評価した。その結果、SAS-L1 細胞において増殖抑制効果を認めたと、KT-N 細胞においては増殖抑制効果は認めなかった (図 8)。



(図 8 口腔扁平上皮癌細胞における miR-375 の増殖抑制効果)

(5) 考察

現在、口腔扁平上皮癌細胞の臨床的にリンパ節転移を認めていない症例については経過観察もしくは予防的頸部郭清術が行われている。2015 年には経過観察と予防的頸部郭清を行った群においては予防的頸部郭清を行った方が、予後がよいと報告された。今回の研究で miR-375 の発現でリンパ節転移の予測マーカーとしての有用性が示唆された。そのため cN0 症例においては生検時から Total RNA を抽出し、miR-375 の発現を評価する。miR-375 高発現群は経過観察とし、miR-375 低発現群は予防的頸部郭清を行うことができれば、より治療成績の向上につながることを期待できる可能性が示唆される (図 9)。



(図 9 cN0 症例における miR-375 の発現に応じた頸部治療の方針)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳善紀彦、中城公一、栗林伸行、合田啓之、内田大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における転移関連 microRNA の探索
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2019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
---------	---------