

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10099

研究課題名(和文) 治療抵抗性口腔癌に対するmt-tRNA修飾を標的とした新たな治療戦略の構築

研究課題名(英文) New therapeutic strategies targeting mt-tRNA modification for treatment-resistant oral cancer

研究代表者

高橋 望 (Takahashi, Nozomu)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

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)：ms2i6A修飾酵素であるCDK5RAP1を抑制した口腔扁平上皮癌細胞株SASおよび5FU耐性口腔扁平上皮癌細胞株FR2-SASにおいて、5-FUを投与した際の生細胞数の減少、死細胞数の割合の増加が確認された。さらにi6Aには抗腫瘍効果が存在することが知られており、今回、SASおよびFR2-SASにi6Aを投与することによって増殖能の減少を確認した。また、FR2-SASにおいてそれはより顕著であった。また、トリパンプルー染色を用いて生細胞と死細胞を測定したところ、i6A投与することにより濃度依存的に細胞死を誘導していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は全頭頸部癌の約40%を占める癌であり、その80%以上を口腔扁平上皮癌が占めている。近年、免疫療法も含めた集学的治療が確立してきているが、診断・治療法の進歩にも関わらず、数十年の間、5年生存率に大きな改善はみられていない。近年、他領域ではあるが一部のtRNA修飾において子宮頸癌細胞と抗癌剤感受性との関連性に関する報告やグリオーマ幹細胞の性質維持との関連に関する報告など新たな知見が示されている。一方でOSCCとtRNA修飾との関連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長期間改善のみられないOSCCの治療成績向上の一助になり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In oral squamous cell carcinoma cell line SAS and 5FU-resistant oral squamous cell carcinoma cell line FR2-SAS, in which the ms2i6A modifying enzyme CDK5RAP1 was suppressed, a decrease in the number of viable cells and an increase in the percentage of dead cells were observed when 5-FU was administered. Furthermore, i6A is known to have an antitumor effect, and in this study, we confirmed a decrease in proliferative capacity when i6A was administered to SAS and FR2-SAS. This was more pronounced in FR2-SAS. In addition, the measurement of live and dead cells using trypan blue staining showed that i6A treatment induced cell death in a concentration-dependent manner.

研究分野：外科系歯学

キーワード：tRNA修飾 口腔扁平上皮癌 SAS ミトコンドリア 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は全頭頸部癌の約 40%を占める癌であり、その 80%以上を口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma: OSCC) が占めている。近年、免疫療法も含めた集学的治療が確立してきているが、診断・治療法の進歩にも関わらず、数十年の間、5 年生存率に大きな改善はみられていない (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)。Transfer RNA (tRNA) は 73-93 塩基の小さな RNA であり、34-36 位の塩基はアンチコドンと呼ばれ、DNA から転写された messenger RNA (mRNA) のコドン配列を認識し結合させることで対応するアミノ酸を運搬し、タンパク質を生成する。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 種類以上の修飾が原核生物及び真核生物の tRNA の塩基に見出されている (Machnicka et al. Nucleic Acids Res. 2013)。tRNA 修飾は特にアンチコドン内及びその近傍に多く見られ、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をこれまでに申請者らは明らかにした (Wei et al. J. Clin. Invest. 2011, Wei, Takahashi et al. Cell Metab. 2015, Takahashi et al. Nucleic Acids Res. 2017) (図 1)。また、他領域ではあるが一部の tRNA 修飾において子宮頸癌細胞と抗癌剤感受性との関連性に関する報告 (Okamoto et al. PLOS Gen. 2014) やグリオーマ幹細胞の性質維持との関連に関する報告 (Yamamoto et al. iScience. 2019) など新たな知見が示されている。一方で OSCC と tRNA 修飾との関連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長期間改善のみられない OSCC の治療成績向上の一助になり得ることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は治療抵抗性 OSCC において mt-tRNA の i⁶A がチオメチル化修飾を受けることによる影響を明らかにし、治療抵抗性 OSCC に対する新規治療を創出することである。申請者らは過去の論文に mt-tRNA のチオメチル化修飾によって、ATP 産生やタンパク合成が制御されることを報告しており (Wei, Takahashi et al. Cell Metab. 2015)、先述したように OSCC 臨床検体や抗癌剤耐性細胞株において ms²i⁶A が増加していることを考慮すると、mt-tRNA のチオメチル化修飾が OSCC の悪性形質獲得や治療抵抗性等に影響を及ぼしている可能性は十分に考えられる。また、大変興味深いことに i⁶A には抗腫瘍効果があることが知られており (Laezza et al. FEBS J. 2007, Rajabi et al. DNA Cell Biol. 2010, Castiglioni et al. Anticancer Agents Med. 2013)、CDK5RAP1 を欠失させることにより i⁶A が増加しグリオーマ幹細胞の自己複製能力、腫瘍形成能を抑制できることが報告されている (Yamamoto et al. iScience. 2019)。OSCC においても mt-tRNA の i⁶A がチオメチル化修飾を受けることにより i⁶A による抗腫瘍効果が抑制され、治療抵抗性を獲得している可能性は十分に考えられる。現在まで OSCC における tRNA 修飾を標的とした研究は皆無であり、この研究は従来と全く違ったアプローチで OSCC と向き合う新しい試みであり、これらが証明されれば早期診断や新規治療、個別化治療の創出の一助となり得ることが大いに期待できると考える。

3. 研究の方法

【1. OSCC における tRNA チオメチル化修飾の臨床的意義の解明】

OSCC 患者 60 名より得られた組織検体 (腫瘍及び周囲正常組織) を用いて i⁶A、ms²i⁶A を測定し、患者ごとのそれらの値と腫瘍サイズ、分化度、転移の有無、放射線・化学療法に対する感受性、無病生存期間などの臨床データと統計学的な解析を行う。

【2. mt-tRNA のイソペンテニル化修飾、チオメチル化修飾が口腔癌細胞株に与える影響の解明】

5-FU 耐性細胞株を用いて mt-tRNA チオメチル化修飾酵素である CDK5RAP1 を siRNA を用いて抑制し、意図的に i⁶A から ms²i⁶A への修飾を阻害した状態での増殖能、抗癌剤感受性を評価する。また、ミトコンドリアの機能障害を評価するため、ミトコンドリアタンパクの発現等も測定する。

【3. mt-tRNA 修飾の制御及び新たな治療戦略の開発】

OSCC が mt-tRNA の i⁶A をチオメチル化修飾することによって治療抵抗性を獲得しているのであれば、同修飾を制御することにより新たな治療戦略の足がかりとなることが期待できる。治療抵抗性が抗腫瘍効果を持つ i⁶A の減少により引き起こされているのであれば、外部より i⁶A を投与することにより治療感受性の向上が見込まれる。また、CDK5RAP1 を抑制することによって、治療抵抗性の減弱を図る。

4. 研究成果

①口腔癌細胞株 SAS および 5-FU 耐性株 FR2-SAS 細胞を用いて 5-FU に対する感受性の確認を行った。SAS においては $5\ \mu\text{M}$ の 5-FU においても細胞増殖が抑制されている (図 1) 一方で、FR2-SAS においては $15\ \mu\text{M}$ でも細胞の増殖を認めた (図 2)。

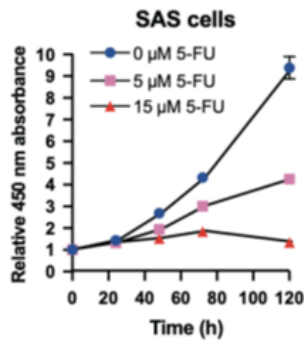


図 1

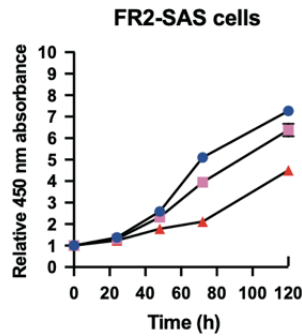


図 2

②SAS および FR2-SAS において m^6A 修飾酵素である CDK5RAP1 を抑制したところ、5-FU を投与した際の生細胞数の減少、死細胞数の割合の増加が確認された (図 3)。また、同様に過去に樹立された 5FU 耐性口腔扁平上皮癌細胞株 FR2-SAS を用いて CDK5RAP1 を抑制したが、SAS と比較すると 5FU の効果上昇はわずかであった (図 4)。

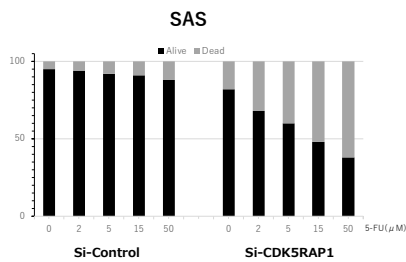


図 3

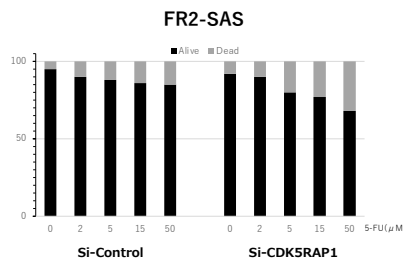


図 4

③CDK5RAP1 を抑制した SAS および FR2-SAS において、ミトコンドリア呼吸鎖複合体のタンパク量減少を認め、ミトコンドリア機能の低下が疑われた (図 5)。さらに、SAS においてリン酸化 JNK やカスパーゼ 3 の増加も見られ、アポトーシスを誘導していることが疑われた (図 6)。

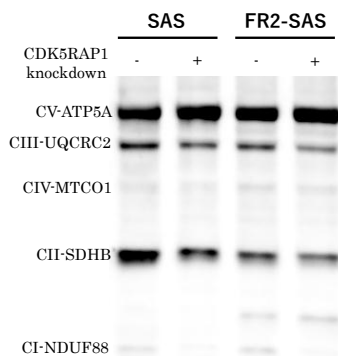


図 5

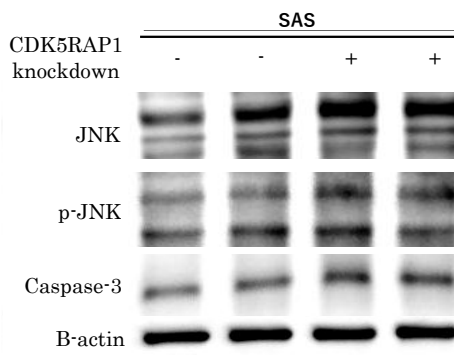


図 6

④ i^6A には抗腫瘍効果が存在することが知られており、SAS (図 7) および FR2-SAS (図 8) に i^6A を投与することによって増殖能の減少を確認した。また、FR2-SAS においてそれはより顕著であった。また、トリパンブルー染色を用いて生細胞と死細胞を測定したところ、 i^6A を投与することにより濃度依存的に細胞死を誘導していることが示された (図 9, 10)。

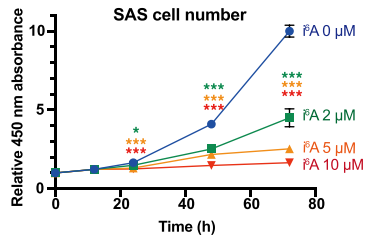


図 7

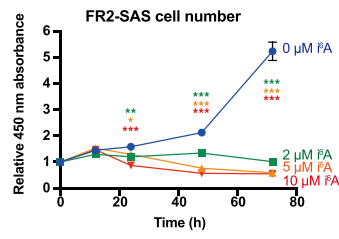


図 8

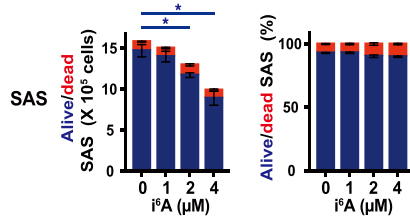


図 9

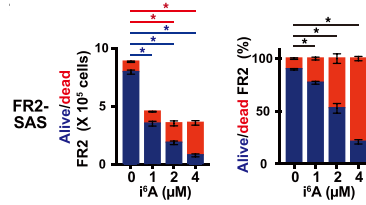


図 10

以上の結果より、 i^6A は口腔癌細胞を細胞死へと導くことが示唆され、CDK5RAP1 を抑制することにより、細胞内で i^6A から ms^2i^6A への変化が減少して i^6A が増加するため、外部から i^6A を投与したのと同様に細胞死へと誘導されることが示唆された。これらの mt-tRNA 修飾に着目することで口腔癌の新たな治療戦略になり得ることが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ryo Miyazaki, Natsuko Kimoto, Satsuki Okamoto, Asami Tsuji, Yusuke Nishigushi, Tomoya Miyahara, Nozomu Takahashi, Tetsuji Omata	4. 巻 16
2. 論文標題 Breast carcinoma metastasis to the cheek: a case report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of medical case reports	6. 最初と最後の頁 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-022-03326-6	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 Masatoshi Hirayama, Kazushige Inoue, Hidetaka Arita, Nozomu Takahashi, Hikaru Nakashima, Junki Sakata, Manabu Maeshiro, Yuka Nagao, Shunsuke Gohara, Keisuke Yamana, Yuichiro Matsuoka, Akira Yuno, Masafumi Nakamoto, Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Daiki Fukuma, Ryoji Yoshida, Hideki Nakayama	4. 巻 34
2. 論文標題 Three-dimensional volumetric analysis of the efficiency of marsupialization in patients with mandibular dentigerous cysts involving impacted third molars	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY MEDICINE AND PATHOLOGY	6. 最初と最後の頁 690-697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2022.03.008	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 Asami Tsuji, Ryo Miyazaki, Natsuko Kimoto, Nozomu Takahashi, Tomoya Miyahara, Yusuke Nishiguchi, Satsuki Okamoto, Nobuo Morita, Tetsuji Omata	4. 巻 34
2. 論文標題 Metastatic renal cell carcinoma in the maxilla: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 542-546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2022.01.008	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 Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Kenta Kawahara, Junki Sakata, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Nozomu Takahashi, Masatoshi Hirayama, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Yoshikazu Kuwahara, Manabu Fukumoto, Ryo Toya, Ryuji Murakami, Hideki Nakayama	4. 巻 102
2. 論文標題 The antioxidative stress regulator Nrf2 potentiates radioresistance of oral squamous cell carcinoma accompanied with metabolic modulation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology	6. 最初と最後の頁 896-907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-022-00776-w.	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 Maya Yakita, Takeshi Chujo, Fan-Yan Wei, Mayumi Hirayama, Koji Kato, Nozomu Takahashi, Kenta Naganuma, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Hideki Nakayama, Kazuhito Tomizawa	4. 巻 28
2. 論文標題 Extracellular N6-isopentenyladenosine (i6A) addition induces co-transcriptional i6A incorporation into ribosomal RNAs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1013-1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.079176.122.	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 Nozomu Takahashi, Akimitsu Hiraki*, Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Takuya Tanaka, Yuko Obayashi, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Hidetaka Arita, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama	4. 巻 14
2. 論文標題 Postoperative delirium in patients undergoing tumor resection with reconstructive surgery for oral cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2021.2222.	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 Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirose, Takuya Tanaka, Yuichiro Matsuoka, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Junki Sakata, Keisuke Yamana, Sho Kawaguchi, Shunsuke Gohara, Yuka Nagao, Masatoshi Hirayama, Nozomu Takahashi, Mayumi Hirayama, Hideki Nakayama	4. 巻 21
2. 論文標題 miR-30a attenuates drug sensitivity to 5-FU by modulating cell proliferation possibly by downregulating cyclin E2 in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101114.	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0件

〔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
---------	---------