

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592964

研究課題名(和文) SDF-1/CXCR4システムを介した口腔癌の転移機構におけるmiRNAの役割

研究課題名(英文) The role of miRNA on the mechanism of metastasis induced by the SDF-1/CXCR4 system in oral cancer

研究代表者

内田 大亮 (UCHIDA, Daisuke)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：20335798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の転移機構の一つであるCXCR4システムの下流に存在するマイクロRNAをマイクロアレイにて検索した。その結果、膀胱癌でOncomiRとして報告されているmiR-518c-5pの発現上昇を確認した。miR-518c-5p阻害剤は、CXCR4システム依存的な口腔癌細胞の遊走を有意に抑制した。miR-518c発現ベクターを導入したB88-518c細胞は細胞増殖能と細胞遊走能が有意に上昇し、ヌードマウス移植モデルにおける、原発巣の増殖とリンパ節転移、遠隔転移を有意に亢進させた。以上より、miR-518c-5pはCXCR4システムの下流で口腔癌細胞の転移を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the microRNA downstream of CXCR4 system that is one of a metastatic system in oral cancer. We identified the upregulation of miR-518c-5p, which is reported as an oncomiR in bladder cancer. A miR-518c-5p inhibitor significantly inhibited the CXCR4 system-dependent migration of oral cancer cells. The growth and migration of B88-518c cells, transfected by the miR-518c expression vector, were significantly enhanced. Furthermore, tumor volume, lymph nodes metastasis, and lung metastasis were significantly increased in the nude mice inoculated with B88-518c cells. These results indicated that miR-518c-5p regulates the metastases of oral cancer as a downstream target of CXCR4 system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：CXCR4 miR-518c-5p 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

われわれは、ケモカインレセプターCXCR4を発現している口腔癌細胞 B88 にリガンドstromal cell-derived factor (SDF)-1 を導入した B88-SDF-1 細胞を作製し、口腔癌の遠隔転移には転移リンパ節での SDF-1 の発現獲得が重要であることを見いだした (Mol Cancer Res 5:685,2007、図 1)。従来、SDF-1/CXCR4 システムは癌細胞の走化性亢進により転移を惹起すると考えられてきたが、本システムが一連の複雑な転移過程をどのようなメカニズムで制御しているかは不明であった。この問題を解決すべく、われわれは B88-SDF-1 細胞における遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイにより解析したが、既存の転移関連分子の発現変化を検出できなかった。近年、タンパク質に翻訳されない RNA 分子の一種として、マイクロ RNA (miRNA) が発見され、miRNA は主に標的 mRNA のタンパクへの翻訳を阻害することが明らかにされた。従って、上述の cDNA マイクロアレイにて検出されなかった転移関連分子が、実際は miRNA による制御を受け、mRNA の発現上昇を介さずタンパクレベルで作用している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、SDF-1/CXCR4 システムの下流に存在し、転移関連分子の発現を制御する miRNA を同定することで、本システムの miRNA を介した転移機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) miRNA マイクロアレイ

対数増殖期の B88-mock 細胞と B88-SDF-1 細胞より small RNA を採取し、TORAY 社製 3D Gene アレイによるマイクロアレイ解析を行った。

(2) 定量性 PCR

上述の RNA を TaqMan™ MicroRNA RT Kit または miScript II RT Kit で逆転写後、TaqMan™ Gene Expression Assay または miScript Primer Assay を使用し、ABI StepOnePlus Real-Time PCR System による定量性 PCR を行った。

(3) 細胞増殖能の検討

細胞を 96 ウェルプレートに播種後、miRCURY LNA™ microRNA inhibitor を Lipofectamine RNAiMax により細胞に導入後、MTT 法にて検討した。

(4) 細胞遊走能の検討

上述の LNA inhibitor を細胞に導入後、Transwell の upper chamber に細胞を播種し、細胞遊走能に与える影響を検討した。

(5) miR-518c-5p の gain of function assay

B88 細胞に miR-518c 発現ベクター (origene 社より購入) を導入後、G418 に

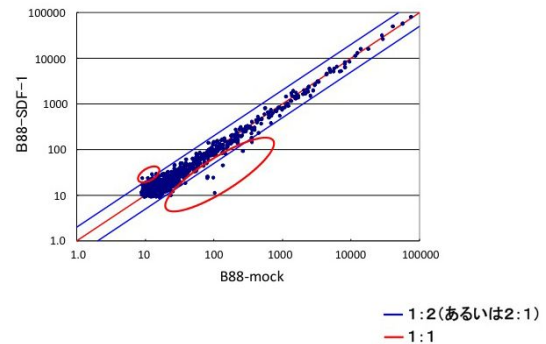
て 2 週間処理し、安定発現株 B88-518c を得た。前述の方法を用い、B88-518c 細胞の増殖能と遊走能を検討した。さらに、B88-518c 細胞をヌードマウス咬筋内へ同所性移植、あるいは静脈内移植し、腫瘍増殖能と転移能に与える影響を検討した。また、実験系の陽性対象として、肺転移能を有することが文献的に証明されている唾液腺癌細胞株 ACC-M を用い、同時に CXCR4 依存的な転移に与える影響を CXCR4 阻害剤である AMD3100 を用い検討したところ、未処理での肺転移と AMD3100 による転移抑制を確認した (下図)。



4. 研究成果

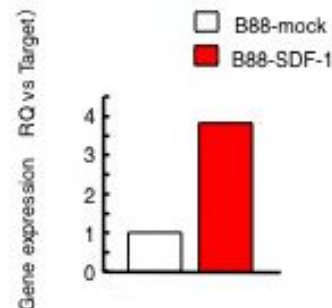
(1) 研究の主な成果

miRNA マイクロアレイ



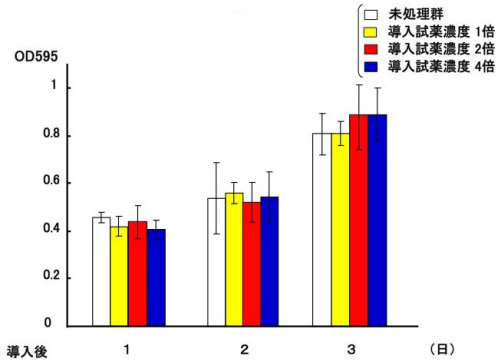
丸印で示す miRNA の発現変動を認めた。

B88-SDF-1 細胞における miR-518c-5p の発現上昇



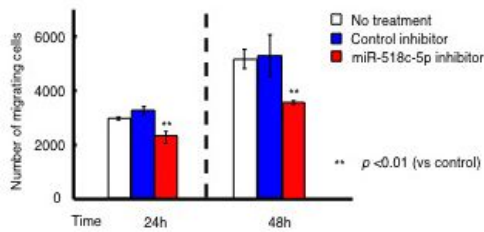
定量性 PCR にて B88-SDF-1 細胞における miR-518c-5p の発現上昇が再確認された。

miR-518c-5p inhibitor が B88-SDF-1 細胞の増殖に与える影響



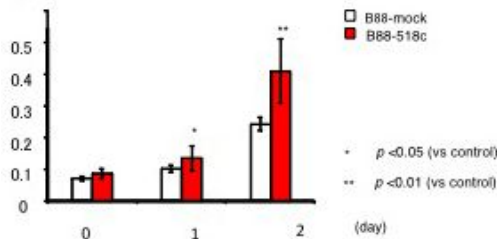
miR-518c-5p inhibitor は B88-SDF-1 細胞の増殖に影響を与えなかった。

miR-518c-5p inhibitor が B88-SDF-1 細胞の遊走に与える影響



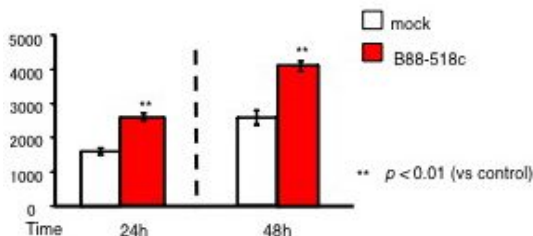
miR-518c-5p inhibitor は B88-SDF-1 細胞の遊走を有意に抑制したことから、miR-518c-5p は SDF-1/CXCR4 システム依存的な細胞遊走を制御している可能性が示唆された。

miR-518c の過剰発現が B88 細胞の増殖に与える影響



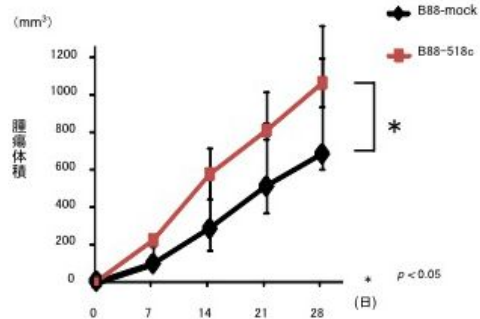
miR-518c を過剰発現させた B88-518c 細胞では細胞増殖能が有意に亢進していた。

miR-518c の過剰発現が B88 細胞の遊走に与える影響



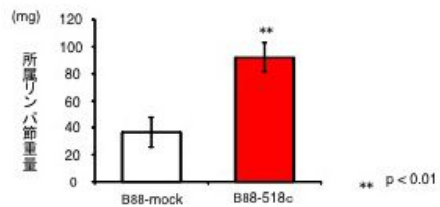
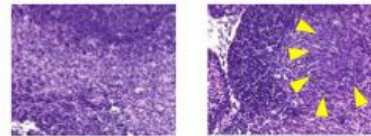
miR-518c を過剰発現させた B88-518c 細胞では細胞遊走能が有意に亢進していた。

miR-518c の過剰発現が B88 細胞移植腫瘍の増殖に与える影響

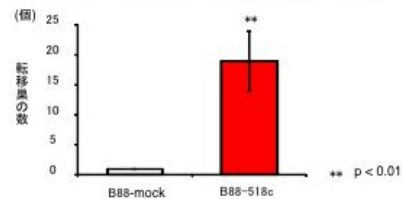
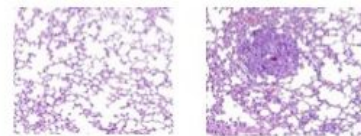


B88-518c 細胞をヌードマウス咬筋内に移植したところ、mock 細胞と比較して腫瘍サイズが有意に増加した。

miR-518c の過剰発現が B88 細胞移植マウスのリンパ節転移、肺転移に与える影響



B88-518c 細胞をヌードマウス咬筋内に移植したところ、mock 細胞と比較してリンパ節重量が有意に増加した。



B88-518c 細胞をヌードマウス静脈内に移植したところ、mock 細胞と比較して肺転移巣が有意に増加した。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究結果の一部は、後述のごとく癌転移関連の有名誌である Clinical Experimental Metastasis (2012 年度 impact factor 3.46) に掲載されたことより、国内外における位置づけは重要と考える。また、miR-518c-5p の口腔癌における働きや CXCR4 システムとの関

与に関する報告はなく、口腔癌研究のみならず、miRNA 研究における本研究のインパクトは大きいと考える。

(3)今後の展望

本研究実施前、SDF-1/CXCR4 システムの下流には多くの miRNA が変動すると予想していたが、以外にも今回の実験系で変動したものは 20 種類程度であった。この結果は、口腔癌における SDF-1/CXCR4 システムが限定された経路を使用していることを示唆するものであるが、使用したアレイシステムの検出感度に依存するものかもしれない。現在は miRNA の搭載数がさらに増加したアレイも販売されており、今後このようなシステムを使い、再実験を行ってもよいと思われる。しかしながら、本研究にて miR-518c-5p が SDF-1/CXCR4 システムの下流で転移を制御している可能性を明らかにできた。一方、今回の研究では、miR-518c-5p の標的分子、B88 細胞以外の CXCR4 システムを有しない細胞における働き、分泌型 miRNA としての作用などを明らかにすることができなかった。これらに関しては、2014 年度以降の研究費で継続した解析を行う予定としている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Uchida D, Kuribayashi N, Kinouchi M, Ohe G, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: Expression and function of CXCR4 in human salivary gland cancers. Clin Exp Metastasis, 査読あり, 30:133-142, 2013.

DOI: 10.1007/s10585-012-9518-9

[学会発表](計 4 件)

木内誠, 内田大亮, 栗林伸行, 玉谷哲也, 永井宏和, 宮本洋二: 口腔癌における CXCR4 システムにより誘導される新規転移関連 microRNA の同定. 第 72 回日本癌学会学術大会総会, 2013, 10.4. パシフィコ横浜(神奈川県)

木内誠, 内田大亮, 栗林伸行, 玉谷哲也, 永井宏和, 宮本洋二: Stromal-cell derived factor(SDF)-1/CXCR4 システムにより誘導される口腔癌の転移関連マイクロ RNA の検索. 第 37 回日本頭頸部癌学会, 2013, 6.1. 京王プラザホテル(東京都)

Kinouchi M, Uchida D, Kuribayashi N, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: Functional analysis of metastasis-related microRNA induced by the stromal-cell derived factor (SDF)-1/CXCR4 system in oral cancer. American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting, 2013,

4.9, Washington convention center (USA)

Uchida D: Chemokine receptor CXCR4 as a potential therapeutic target for lymph node metastases in oral cancer. 62 KONGRESS der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 2012, 6.10, Konzerthaus Freiburg (Germany)

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 大亮 (UCHIDA, Daisuke)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 20335798

(2)研究分担者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 20200214

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)
徳島大学・大学病院・講師
研究者番号: 30274236

大江 剛 (OHE, Go)
徳島大学・大学病院・助教
研究者番号: 60432762

栗林 伸行 (KURIBAYASHI Nobuyuki)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 80617332