

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：17301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792360  
 研究課題名（和文） 癌幹細胞マーカーとしての EpCAM をターゲットとした口腔癌分子標的治療の研究  
 研究課題名（英文） Molecular targeting therapy targeted to EpCAM as cancer stem cell marker in oral cancer  
 研究代表者  
 柳本 惣市（YANAMOTO SOUICHI）  
 長崎大学・大学病院・講師  
 研究者番号：10315260

研究成果の概要（和文）：癌細胞浸潤に関する EpCAM をターゲットとして機能している miR-21 に注目した。miR-21 のターゲットのうち癌細胞浸潤に関与する分子を決定するために、予測プログラム miRanda を用いた。舌扁平上皮癌細胞において、miR-21 を特異的にブロックする LNA プローブを用いてノックダウンし、Matrigel invasion assay と Western blot で評価し、mi-21 が癌細胞浸潤を担っているかどうかを検討した。癌細胞浸潤を担う Wnt アンタゴニストとして DKK2 を選択した。miR-21 のノックダウンで DKK2 の発現増加に伴う細胞浸潤能の低下を認めたことから、miR-21 は舌扁平上皮癌の治療標的として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：I focused microRNA-21 (miR-21) targeting EpCAM as a molecular related tumor invasion. To determine the miR-21 target, I searched for molecular gene that involved in tumor invasion by using commonly cited prediction program miRanda. In oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC) cell line, SCC25 cells, I further evaluated whether miR-21 contributes to cell invasiveness by blocking its expression with a specific knock down LNA probe and validated direct target by Matrigel invasion assay and Western blot. I selected DKK2, as a Wnt/antagonist that involved in tumor invasion. miR-21 overexpression was significantly correlated with DKK2/ $\beta$ -catenin immunohistochemical phenotype. Knock down of miR-21 significantly decreases the invasion potential of SCC25 cells with up-regulated DKK2. These results suggest that miR-21 may provide potential therapeutic target for OTSCC treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

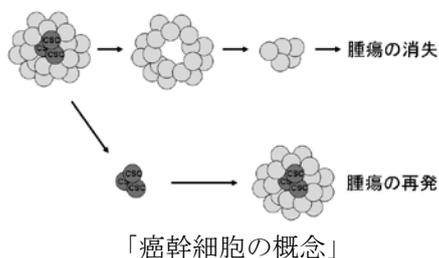
キーワード：口腔癌, EpCAM, 癌幹細胞, マイクロ RNA

## 1. 研究開始当初の背景

最近、EpCAM は癌幹細胞マーカーとしても注目されており、肝臓癌においては癌幹細胞をターゲットとした治療における分子標的とされている。口腔癌治療の臨床において、化学放射線療法で根治したかにみえた症例

で、数年経過した後に再発する症例、あるいは頸部所属リンパ節に比較的長期の期間を経て出現する後発リンパ節転移を経験し、治療に苦慮することが少なくない。このような臨床像の背景にも「癌幹細胞の概念」が関与していると考えており研究を進めてきた。そ

してその分子制御機構として、マイクロ RNA (microRNA; miR) が関与していることに注目している。miR は 18-25 ヌクレオチドからなるタンパクをコードしない small RNA である。mRNA の 3' 非翻訳領域に特異的に結合することで翻訳の抑制、もしくは標的となる mRNA を直接分解するという 2 つの経路により、複数の遺伝子発現を調節し、mRNA の働きを抑制的に制御し遺伝子機能の調整を行っていると言われている。



miR は遺伝子、転写因子と複雑な遺伝子発現調節ネットワークを構成し、発生・細胞増殖・分化・発癌に関わる重要な因子とされ、現在 700 程度が同定されており、ヒトには約 1000 の miR が存在するともいわれているが、miR の機能異常と癌との関連については不明な点も多い。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、癌幹細胞に特異的に存在する EpCAM によって口腔癌の浸潤が制御されており、その分子機構には、ある特定の miR が関与しているのではないかと考えている。

まず第 1 段階として癌幹細胞マーカーとして EpCAM が有効であるかどうかを検討することを目標とした。これまでの研究で癌幹細胞を多く含む SP 細胞分画では、EpCAM 過剰発現がみられたが、EpCAM をマーカーとして分離した細胞分画が癌幹細胞様性質を示すかどうかを検証する必要があると考

えられる。第 2 段階として、癌細胞浸潤に関与することが予想される miR-21 について、miR データベース (miRanda) を用いて、他のターゲット分子を検索して口腔癌の浸潤メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) EpCAM の過剰発現がみられ高浸潤能を有することが分かっている舌癌細胞株 SCC25 を用いて、EpCAM 陽性細胞をポジティブセレクション法 (ビオチン標識捕捉用 EpCAM 抗体と反応させストレプトアビジン標識ビーズとマグネットを使用することにより分離する方法) で分離した。分離した各細胞分画について Western blot で EpCAM 発現について検索した。

(2) miR-21 について、臨床検体を用いて *in situ* hybridization でその発現を検討し、ターゲット分子である DKK2,  $\beta$  カテニンおよび E カドヘリンについては免疫組織化学的染色を行いタンパクレベルでの発現を検討した。

(3) miR データベースを用いたターゲット分子の検索

miR-21 について、データベースを用いて浸潤に関与する可能性のあるターゲット分子を検索した。検索にあたってはデータベースのみならず、最新の論文なども参考に行った。

(4) miR-21 ノックダウンによるターゲット分子の発現変化の検討

特定された miR-21 のノックダウン probe を作製し、舌扁平上皮癌細胞 SCC25 細胞に導入した。導入後の miR-21 の発現変化をリアルタイム RT-PCR で検討した。さらにターゲットとして抽出された分子 DKK2 は mRNA レベル

では影響しないこともあるので、Western blot も行いタンパクレベルでも検討した。

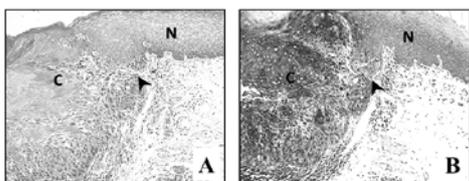
(5) miR-21 ノックダウンによる癌細胞生物学的特性の変化の検討

miR-21 のノックダウン probe 導入後の癌細胞浸潤能を Matrigel invasion chamber を用いて評価した。

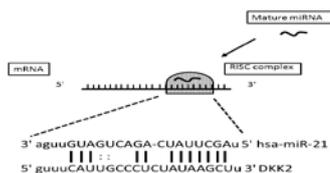
#### 4. 研究成果

(1) ポジティブセレクション法で分離された細胞集団は EpCAM 強陽性であり、癌幹細胞特性を有していた。また EpCAM を制御すると思われる miR-21 を過剰発現していることから、EpCAM による口腔癌の浸潤制御の分子機構には、miR-21 が関与しているのではないかと考えた。

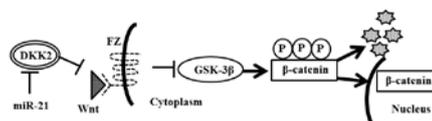
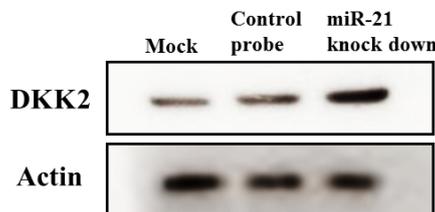
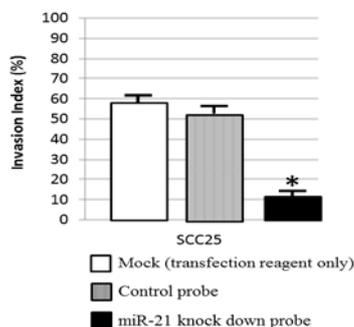
(2) in situ hybridization にて舌癌組織で miR-21 が過剰発現していることが明らかとなった (図 2)。さらに浸潤パターンとの相関性が認められた。しかしながら予後因子とは成り得なかった。



(2) miR-21 のターゲットのうち癌細胞浸潤に関与する分子を決定するために、予測プログラム miRanda を用いた。ターゲットとして癌細胞浸潤を担う Wnt アンタゴニストとして DKK2 を選択した。



(3) 舌扁平上皮癌細胞において、miR-21 を特異的にブロックする LNA プローブを用いて ノックダウンし、Matrigel invasion assay と Western blot で評価し、mi-21 が癌細胞浸潤を担っているかどうかを検討したところ、miR-21 のノックダウンで DKK2 の発現増加に伴う細胞浸潤能の低下を認めたことから、miR-21 は舌扁平上皮癌の治療標的として有用であることが示唆された。



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2件)

(1) Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yamada, S., Yoshitomi, I., Kawano, T., Yonezawa, H., Rokutanda, S., Naruse, T., Umeda, M. : Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. Oral Oncology, 47, 855-860, 2011.  
DOI:10.1016/j.oraloncology.2011.06.501

(2) Yanamoto, S., Yamada, S., Takahashi, H., Yoshitomi, I., Kawasaki, G., Ikeda H., Minamizato T., Shiraishi, T., Fujita, S., Ikeda, T., Asahina, I., Umeda, M. Clinicopathological risk factors for local recurrence in oral squamous cell carcinoma. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 41, 1195-1200, 2012.  
DOI: 10.1016/j.ijom.2012.07.011

[学会発表] (計1件)

(1) 川北晃子, 柳本惣市, 山田慎一, 川崎五郎, 梅田正博. miR-21はDKK2/Wnt pathway を介して口腔癌浸潤能を制御する. 第56回日本口腔外科学会総会, 2011年10月21-23日, 大阪.

[図書] (計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳本 惣市 (YANAMOTO SOUICHI)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号: 1 0 3 1 5 2 6 0

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし