

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593038

研究課題名(和文) マイクロRNAの制御を介した新たな口腔癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for oral cancer through control of microRNA

研究代表者

山本 一彦 (YAMAMOTO, KAZUHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20243842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換、食品成分、酸化ストレスという口腔扁平上皮癌の発生・進展に影響を及ぼす因子と密接な関連を有すると位置づけられるmiRNAを抽出した。抽出されたmiR-29b, miR-494、およびmiR-21のmiRNAについては標的遺伝子を絞り込み、その作用機序について解明を行った。研究期間内に治療実験の結果を報告するところまでに至らなかったが、現在施行している培養系および動物モデルを用いたこれらのmiRNAの標的化ならびに化学療法・放射線療法との併用により今後の新規治療戦略に結び付けることが期待される。

研究成果の概要(英文)：miRNAs closely related to the factors influencing the development and the progression of oral squamous cell carcinoma such as epithelial-mesenchymal transition, food ingredients and oxidative stress were extracted. In miR-29b, miR-494 and miR-21 extracted, the target genes of them were identified and the mechanism of their actions was analyzed. Although the mechanism was not clarified enough to report in the period of research, the on-going experiments using culture cells and animal models are expected to lead to the novel strategy in future by targeting these miRNAs and in combination with chemotherapy and radiotherapy.

研究分野：外科系歯学

キーワード：マイクロRNA 口腔がん 化学療法 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔癌に対する化学療法は一定の効果がみられるが、再発や転移を生じた癌では十分な効果は得られず制御が不可能になることもしばしばである。これは癌細胞の中に治療抵抗性を有する細胞が存在するため、これらの細胞に対する効果の増強が治療の成功のカギとなる。近年、miRNA が癌の浸潤や転移さらに治療抵抗性にかかわる癌幹細胞 (CSCs) や上皮間葉転換 (EMT) の制御に関与する事が明らかとなってきた。そこで、miRNA の発現を制御することにより治療抵抗性を示す癌細胞に対する化学療法の効果を高める事ができるのではないかと の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は miRNA の発現を制御することにより、EMT や CSCs による治療抵抗性の獲得を抑制し、癌細胞の抗癌剤に対する感受性を高めることを目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) 上皮系悪性腫瘍の EMT に強く関連する c-met/HGFR を標的遺伝子とするとされる miR29b について、CK19 との関連をヒト口腔扁平上皮癌組織で検討した。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞を用い miR29b 発現と inhibitor による影響を検討した。

(2) 口腔扁平上皮癌においても食品成分による影響が示唆されるため、生理活性物質としての脂肪酸の miRNA 発現に及ぼす影響を細胞株を用い、miRNA アレイにより検討し、候補 miRNA の作用を mimic や inhibitor を用い検討した。

(3) 酸化ストレスの口腔扁平上皮癌に対する影響はよく知られており、酸化ストレスにより誘導される miRNA を miRNA アレイにより検討し、候補 miRNA の作用を mimic や inhibitor を用い検討した。

4. 研究成果

(1) 癌幹細胞と関係するとの報告がある CK 19 について 38 例の口腔扁平上皮癌患者標本を用いて IHC を行い、種々の臨床的、病理学的因子、miR-29b の発現と EMT との関連について検討した。その結果、CK19 は癌の悪性度にはある程度の間接性を認めたと、miR-29b との関係は乏しく、EMT との関係は認められなかった。

口腔癌に関連する miRNA として miR-29b に着目し、その target 遺伝子の検索を行なった。まず、qRT-PCR により miR-29b のレベル

が高いと確認された 5 例と低い確認された 5 例の計 10 例を用い、EpCAM および Claudin1 について IHC を行い、これらの発現強度を検討した。その結果、Claudin1 は、miR-29b による EMT 効果をもたらす target 遺伝子としては否定的であった。次いで、ヒト扁平上皮癌細胞株 HSC2、HSC3、HSC4 および KON を用い、miR-29b の target 因子とされている BMP1 について miR-29b の発現との関係について検討した。これらの細胞に miR-29b negative、inhibitor、precursor 処理を行い、qRT-PCR にて miRNA 発現レベルを検討したところ、miR-29b と BMP1 との間に明らかな関連は認められなかった。同様に、miR-29b の target 因子とされている TGF- β についても miR-29b の発現との関係を検討したが、miR-29b と TGF- β との間に明らかな関連は認められなかった。しかし、TGF- β 誘導 EMT における EpCAM および Claudin1 の発現低下が miR-29b inhibitor 処理により抑制されたことから、miR-29b は EMT 関連タンパクの発現調節を直接行うのではなく、EMT 関連タンパク間の相互作用を促進する因子に関与する可能性が示唆された。

(2) リノール酸(LA)やエライジン酸(EA)のような脂肪酸は食品中に含まれ、癌幹細胞に対し促進性の影響を与える。これら脂肪酸による miRNA 発現の変化を検討し癌幹細胞への影響を検討した。CT26 大腸癌細胞をリノール酸(LA)またはエライジン酸(EA)で処理し miRNA アレイにより検討し、両脂肪酸で発現亢進を示したもののうち miR-494 について検討を行った。両脂肪酸により増加が見られた miR-494 について、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 への影響を検討した。HSC3 を miR-494 mimic または inhibitor を処理し、sphere assay により幹細胞性を検討したところ sphere density は LA, EA により増加したが、mimic 処理により強い増加が認められた。一方、inhibitor 処理により sphere density は低下し、LA, EA による density の増加も抑制された。Sphere assay による癌幹細胞マーカーの発現を検討すると、CD44 は LA と mimic で増加し、nucleostemin(NS)は EA と mimic で増加した。一方、inhibitor 処理により、両脂肪酸で CD44・NS の発現は消失した。さらに、miR-494 標的遺伝子候補で癌幹細胞分化に関係する PPAR coactivator 1A、PTEN、activin A receptor 1C、FGFR2 について mRNA 発現を検討すると FGFR2 以外では、EA, LA, mimic では発現低下が、inhibitor では発現亢進が認められた。このように、miR-494 は脂肪酸により発現が促進され、分化促進因子を抑制し癌幹細胞性の維持に関与することが示唆された。

(3) 酸化ストレス耐性に関与する miRNA を抽出するため、HSC3 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を酸化ストレス・ドナーである gloxal 処理

し、miRNA の発現変化を miRNA アレイで検討した。発現が増加していた miRNA の中でも抗アポトーシス効果が知られ口腔扁平上皮癌との関連が報告されている miR-21 について検討を行った。

miR-21 は gloxal 処理により約 2.4 倍に発現が亢進しており、ビタミン E により ROS を減少させると発現はコントロールレベルに低下した。miR-21 の標的遺伝子として in silico で同定されるものの中から、幹細胞関連遺伝子として Notch, CD44, Krüppel-like factor-1 (KLF1), Thrombomodulin (THBD)、アポトーシス抑制系の遺伝子として programmed cell death 4 (PDCD4)、増殖系の遺伝子として RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1) の各遺伝子の発現の検討を、無処理、gloxal 処理、および、gloxal 処理 + miR-21 inhibitor 処理の各群に対して RT-PCR により行った。

gloxal 処理により、Notch, THBD は低下し、CD44, RASA1, KLF1, PDCD4 の発現はいずれも増加した。また、gloxal 処理による変化は、miR-21 inhibitor 処理の同時処理により消失した。

CD44 は最近抗酸化ストレス作用が注目されており、miR-21 の作用は口腔扁平上皮癌細胞における酸化ストレス耐性の促進とアポトーシス抑制と考えられ、幹細胞への有意な作用は明らかではなかった。酸化ストレス耐性促進とアポトーシス抑制は抗癌剤耐性にも関連すると考えられ、miR-21 は口腔扁平上皮癌の分子標的として有用と考えられた。

上記のように、EMT、食品成分、酸化ストレスという口腔扁平上皮癌の発生・進展に影響を及ぼす因子と密接な関連を有すると位置づけられる miRNA を抽出した。抽出された miR-29b, miR-494、および、miR-21 の miRNA については標的遺伝子を絞込み、その作用機序について解明を行った。研究期間内に治療実験の結果を報告するところまでに至らなかったが、現在施行している、培養系および動物モデルを用いたこれらの miRNA の標的化ならびに化学療法・放射線療法との併用により、今後の新規治療戦略に結び付けることが期待される。

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 7 件)

Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Ueda N, Shimomoto T, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H. Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer. Br J Cancer 107(4):

700-706, 2012

Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Bhawal UK, Kurihara M, Kirita T, Kuniyasu H. Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. Clin Exp Metastasis 30(2): 165-176, 2013

Sasahira T, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Ohmori H, Fujii K, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H. Tropomyosin receptor kinase B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. Hum Pathol 44(6): 1098-1106, 2013

Kurihara M, Kirita T, Sasahira T, Ohmori H, Matsushima S, Yamamoto K, Bosserhoff AK, Kuniyasu H. Protumoral roles of melanoma inhibitory activity 2 in oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer 108(7): 1460-1469, 2013

Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Kurihara M, Matsushima S, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. Prox1 and FOXC2 act as regulators of lymphangiogenesis and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. PLoS One 9(3): e92534, 2014

Sasahira T, Kirita T, Yamamoto K, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Bhawal UK, Bosserhoff AK, Kuniyasu H. Transport and Golgi organisation protein 1 is a novel tumour progressive factor in oral squamous cell carcinoma. Eur J Cancer 50(12): 2142-2151, 2014

Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, Ueda N, Nakashima C, Matsushima S, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. HuD promotes progression of oral squamous cell carcinoma. Pathobiology 81(4): 206-214, 2014

[学会発表](計 19 件)

栗原 都、笹平智則、山本一彦、ウジャー・バワール、桐田忠昭、國安弘基、ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現。第 101 回日本病理学会総会 2012. 4. 26-28, 東京

笹平智則、栗原 都、バワール・ウジャー、上田順宏、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基。FOXC2 が口腔癌に及ぼす影響についての検討。第 101 回日本病理学会総会 2012. 4.

26-28, 東京

笹平智則、栗原 都、パワール・ウジャール、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌における Prox1 の発現と役割. 第 101 回日本病理学会総会 2012. 4. 26-28, 東京

栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌における has-miR29b-1 の発現と c-met および EMT との関連. 第 21 回がん転移学会 2012. 7. 12-13, 広島

栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現. 第 21 回がん転移学会 2012. 7. 12-13, 広島

栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012. 9. 19-21, 札幌

笹平智則、パワール ウジャール、栗原 都、上田順宏、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌における TANGO の発現. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012. 9. 19-21, 札幌

栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現. 第 23 回日本消化器癌発生学会総会 2012. 11. 15-16, 鳴門

笹平智則、栗原 都、上田順宏、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌と大腸癌における Trk の役割の差異. 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2013. 1. 24-25, 東京

笹平智則、栗原 都、山本一彦、パワール・ウジャール、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌における HuD の発現と役割. 第 102 回日本病理学会総会 2013. 6. 6-8, 札幌

笹平智則、山本一彦、パワール・ウジャール、栗原 都、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌の新規腫瘍進展マーカーである TANGO の機能と役割. 第 102 回日本病理学会総会 2013. 6. 6-8, 札幌

栗原 都、笹平智則、山本一彦、國安弘基、桐田忠昭. 口腔扁平上皮癌における MIA2 の発現. 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013. 6. 13-14, 東京

笹平智則、栗原 都、山本一彦、上田順宏、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌における Trk の機能および発現解析. 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013. 6. 13-14, 東京

栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌におけるピルビン酸キナーゼ作用の多様性. 第 24 回日本消化器癌発生学会総会 2013. 9. 5-6, 金沢

栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. Protumoral roles of melanoma inhibitory activity 2 in oral squamous cell carcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013. 10. 3-5, 横浜

栗原 都、笹平智則、山本一彦、ウジャール・パワール、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌における MIA 2 の役割. 第 103 回日本病理学会総会 2014. 4. 24-26, 広島

栗原 都、笹平智則、山本一彦、松島紗弥子、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるピルビン酸キナーゼ・アイソザイム変換の意義. 第 103 回日本病理学会総会 2014. 4. 24-26, 広島

栗原 都、笹平智則、山本一彦、國安弘基、桐田忠昭. 口腔癌におけるピルビン酸キナーゼ作用の多様性. 第 38 回日本頭頸部癌学会 2014. 6. 12-13, 東京

Kurihara M, Nakajima C, Matsushima S, Sasahira T, Yamamoto K, Bhawal UK, Sasaki T, Kirita T, Kuniyasu H. Expression of isozymes of pyruvate kinase in esophageal cancer. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014. 9. 25-27, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本一彦 (YAMAMOTO KAZUHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：2014384

(2) 研究分担者

國安弘基 (KUNIYASU HIROKI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00253055

桐田忠昭 (KIRITA TADAAKI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70201465