

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463046

研究課題名(和文) CXCR4システムを介した口腔癌の転移機構におけるmiR-518c-5pの役割

研究課題名(英文) Role of miR-518c-5p on the metastasis of oral cancer via CXCR4 system

研究代表者

内田 大亮(Uchida, Daisuke)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20335798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CXCR4の標的マイクロRNAとして同定したmiR-518c-5pが口腔癌の転移に与える影響を検討した。口腔癌細胞CAL27とB88にmiR-518c発現ベクターを導入し、安定発現株を樹立した。これらの細胞の増殖能と遊走能は有意に亢進し、miR-518c-5p阻害剤はその効果を阻害した。これらの細胞をヌードマウス咬筋内あるいは静脈内に移植したところ、リンパ節転移と肺転移が有意に増強した。miR-518c発現細胞では、cDNAマイクロアレイにて増殖や転移に関わる遺伝子の発現増強がみられた。以上よりCXCR4はmiR-518c-5pの誘導を介して転移を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified the miR-518c-5p as a downstream target of the CXCR4 system. In this study, we examined the function of miR-518c-5p on the metastasis of oral cancer. We transfected miR-518c expression vector into oral cancer cells, CAL27 and B88, and isolated stable transfectants. The growth and migration of both cells were significantly enhanced in compared with those of mock cells. LNA-based miR-518c-5p inhibitor significantly impaired the enhanced cell growth and migration of these cells. miR-518c or mock transfectants were inoculated into the masseter muscle or the blood vessels of nude mice. Lymph nodes metastasis and lung metastasis were significantly increased in the mice inoculated with miR-518c transfectants. Some of the genes involved in the cell growth and metastasis were upregulated in the B88-518c cells in cDNA microarray. These results indicate that CXCR4 system regulates the metastases of oral cancer via induction of miR-518c-5p.

研究分野：oral surgery

キーワード：miR-518c-5p 口腔癌 CXCR4 転移

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が口腔癌の転移システムの一つであることを明らかにしてきた。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、転移に重要とされる癌微小環境に与える影響は不明である。われわれは、CXCR4 の標的分子の同定が重要であると考え、CXCR4 の標的マイクロ RNA (miRNA) を検索した。その結果、標的 miRNA として miR-518c-5p を同定し、miR-518c-5p 阻害剤が CXCR4 依存的な細胞遊走を抑制すること、miR-518c を CXCR4 高発現株である口腔癌細胞 B88 に過剰発現させると、in vitro での細胞増殖能・遊走能が亢進し、in vivo での転移能が亢進することを見出した (H23-26 年度科学研究費補助金成果報告書に記載)。これらの結果は、miR-518c-5p が CXCR4 の下流で OncomiR として働くことを示唆しているが、癌微小環境への作用は明らかではなかった。miR-518c-5p が癌微小環境に与える影響は不明であるが、miR-518c-5p が局在する miRNA クラスタは、exosome に包埋され発生や癌の進展に関与する分泌型 miRNA を含んでいる。従って、miR-518c-5p も、CXCR4 シグナルの下流で発現する分泌型の転移促進 miRNA として癌微小環境へ作用している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、miR-518c-5p が CXCR4 システムの下流に存在する真の転移促進 miRNA であるか、口腔癌細胞への直接的影響と exosome を介した癌微小環境への間接的影響を中心に検証する。

3. 研究の方法

(1) miR-518c 安定発現株の樹立

上述のごとく、CXCR4 高発現株である B88 細胞における miR-518c-5p の作用は明らかにされたが、この結果は CXCR4 シグナルを介した他の分子の影響をみている可能性も否定できない。そこで、miR-518c 発現ベクターとコントロールベクターを、CXCR4 の発現がなく、in vivo での転移能がない舌癌細胞株 CAL27 に導入した。細胞を 700 μ g/ml の Geneticin で 2 週間処理することにより、安定発現株を樹立した。

(2) CAL27 安定発現株における miR-518c-5p の発現

得られた安定発現株より Trizol (Life Technologies) にて total RNA を抽出した。TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription (RT) Kit (Life Technologies) により逆転写後、StepOnePlus (Life Technologies) と TaqMan[®] MicroRNA Assays (Life Technologies) による定量性 PCR 法を用いて miR-518c-5p の発現を確認した。また、miR-518c-5p の miRCURY LNA[™] microRNA inhibitor を Lipofectamine RNAiMax により細胞に導入し、発現した miR-518c-5p が完全

にブロックされるか検討した。

(3) miR-518c-5p が細胞増殖に与える影響

得られた CAL27 安定発現株を 96-well プレート上に播種し、24 時間、48 時間後の足場依存性増殖能を MTT 法にて検討した。なお、本研究で使用した miR-518c 発現ベクターは、miR-518c-5p 以外にも相補 miRNA である miR-518c-3p も同時に発現するため、細胞増殖や細胞遊走に miR-518c-3p の影響が関与する可能性も考えられる。そこで、上記実験時に高い特異性を有する locked nucleic acid (LNA) にて構成される miR-518c-5p アンチセンスオリゴ (Exiqon) を使用し、実験結果が miR-518c-5p 特異的なものであるかを確認した。また、B88 と CAL27 双方の安定発現株における足場非依存性増殖能に関して、NanoCulture Dish (SCIVAX 社) に細胞を播種し、検討した。

(4) miR-518c-5p が細胞遊走に与える影響

細胞遊走能は migration chamber assay と wound healing assay にて評価した。すなわち、前者は Transwell (Corning) の upper chamber 上に安定発現株を播種し、メンブレンを通過した遊走細胞数を HE 染色後にカウントした。後者は、通常のプラスチック dish 上にほぼコンフルエントに増殖した細胞上に、200 μ l のピペットチップにて wound を形成し、wound 上を遊走する細胞の面積を NIH image 1.60 を用いた densitometric analysis にて解析した。

(5) miR-518c-5p が in vivo の転移に与える影響

すでに当研究室では、マウスリンパ節転移モデルとして咬筋内同所性移植法 (Int J Cancer 70:120, 1997, 図 5) を、遠隔転移モデルとして静脈内移植法を確立している (Mol Cancer Res 5:685, 2007)。そこで、CAL27 安定発現株をヌードマウス咬筋内に移植し、コントロール細胞と比較することで、miR-518c が転移に与える影響を検討した。細胞数は、従来通り咬筋内移植で 200 万個、静脈内移植で 100 万個とし、咬筋内移植では 1 週間ごとに腫瘍体積を測定し、移植後 28 日で屠殺し、HE 染色にて病理組織学的な転移の有無を確認した。

(6) miR-518c 安定発現株が癌微小環境としての脈管内皮細胞に与える影響

Transwell (Corning) の upper chamber 上にリンパ管内皮細胞 TR-LE (Cell Tissue Res 326:749, 2006) あるいは血管内皮細胞 HUVEC を播種し、lower chamber に CAL27 安定発現株由来の培養上清を添加した。24, 48 時間後にメンブレンを通過した遊走細胞数を HE 染色後にカウントした。また、TR-LE 細胞の管腔形成に与える影響を上述の CAL27 由来培養上清を添加することで検討した。

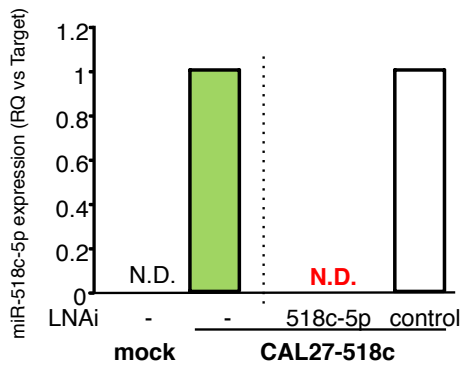
(7) miR-518c の標的 mRNA の検索

B88 安定発現株とコントロール細胞における mRNA 発現を Affymetrix 社の GeneChip HG-U219 を用いて cDNA マイクロアレイによ

り比較検討した。

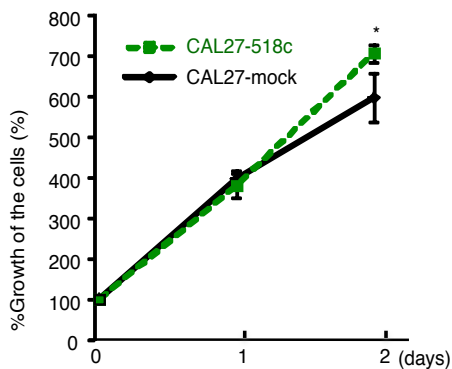
4. 研究成果

(1) CAL27 安定発現株における miR-518c-5p の発現



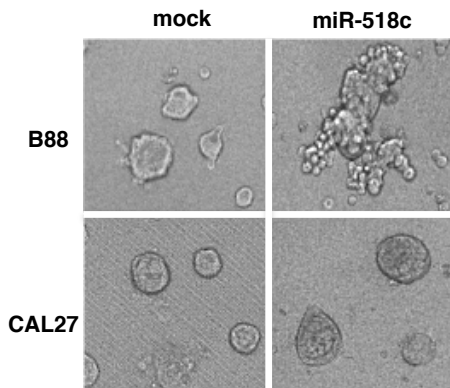
CAL27 の安定発現株では、miR-518c-5p の過剰発現を認めた。miR-518c-5p の LNA 阻害剤は、その発現を完全にブロックしたが、コントロール阻害剤では抑制されなかった。

(2) miR-518c-5p が CAL27 細胞の足場依存性増殖に与える影響



CAL27 の安定発現株では、mock 細胞と比較して、足場依存性細胞増殖能が有意に更新していた。

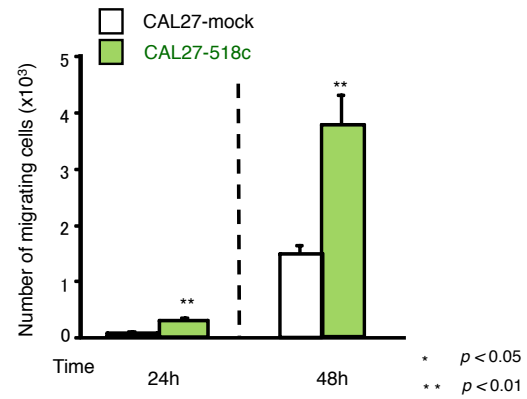
(3) miR-518c-5p が B88 細胞と CAL27 細胞の足場非依存性増殖に与える影響



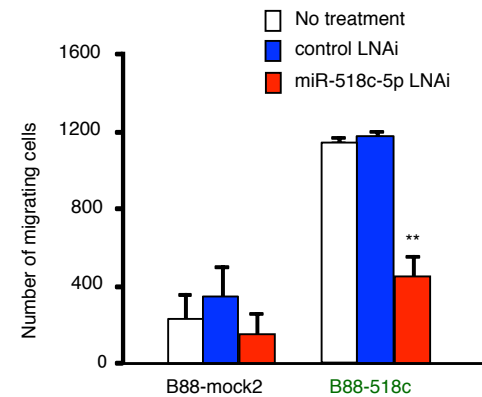
B88 の安定発現株では、mock 細胞と比較し

て、ブドウの房状の大きめのスフェロイドを形成する傾向があった。CAL27 の安定発現株では、mock 細胞と同様の球形のスフェロイドを形成するがサイズが大きい傾向にあった。

(4) miR-518c-5p が B88 細胞と CAL27 細胞の遊走に与える影響 (migration chamber assay)

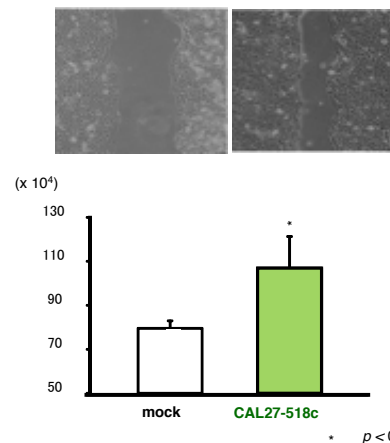


CAL27 の安定発現株では、mock 細胞と比較して、24 時間、48 時間ともに lower chamber への細胞遊走が有意に亢進していた。



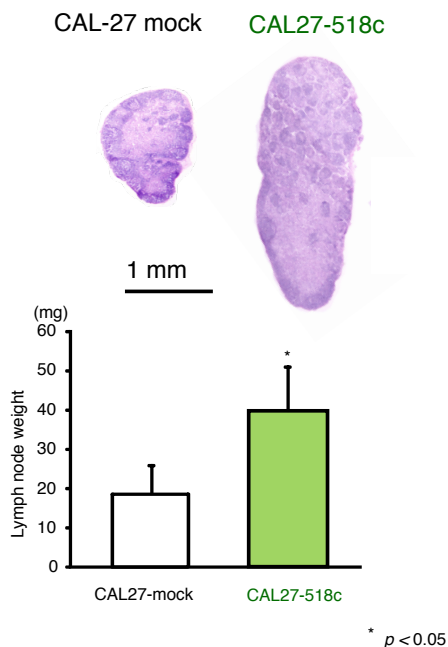
B88 の安定発現株では、mock 細胞と比較して、48 時間後の細胞遊走が亢進しており、その効果は、miR-518c-5p 阻害剤により有意に抑制された。

(5) miR-518c-5p が CAL27 細胞の遊走に与える影響 (wound healing assay)



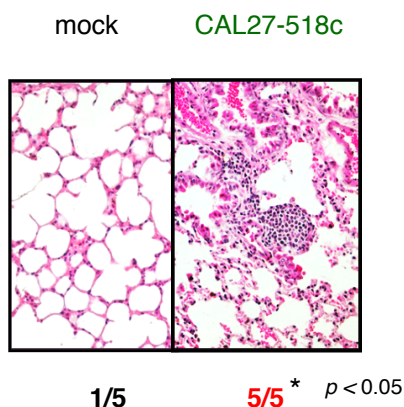
CAL27 の安定発現株では、mock 細胞と比較して、wound への細胞遊走が有意に亢進していた。

(6) miR-518c-5p が CAL27 細胞のリンパ節転移に与える影響



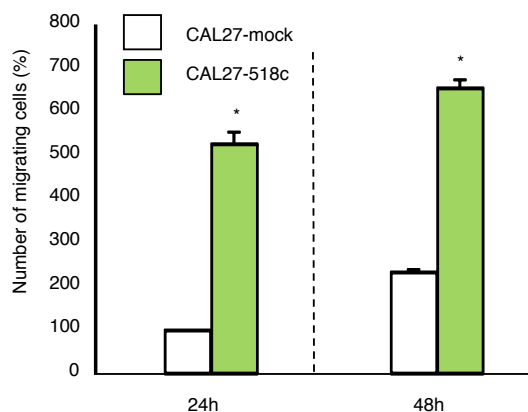
CAL27 の安定発現株では、mock 細胞と比較して、リンパ節転移細胞数とリンパ節サイズが多い傾向にあり、リンパ節重量は有意に亢進していた。

(7) miR-518c-5p が CAL27 細胞の肺転移に与える影響

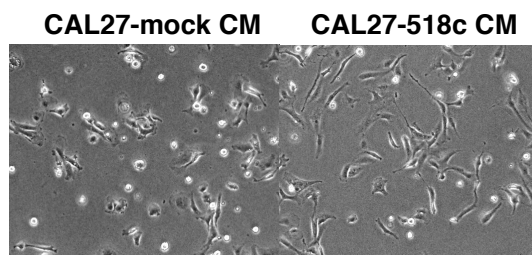


CAL27 の安定発現株では、全例で肺転移が認められ、肺転移能が mock 細胞と比較して、有意に亢進していた。

(8) miR-518c 安定発現株が癌微小環境としての脈管内皮細胞に与える影響



CAL27 の安定発現株由来の培養上清は、TR-LE 細胞の遊走を有意に亢進した ($p < 0.05$). CAL27 安定発現株を lower chamber に添加した実験系と血管内皮細胞 HUVEC を用いた実験系でも同様の結果を認めた (データは示していない).



CAL27 の安定発現株由来の培養上清は、TR-LE 細胞の管腔形成を亢進させる傾向があった (上図).

(9) miR-518c の標的 mRNA の検索

Upreguration		Downreguration	
Fold Change	Gene Title	Fold Change	Gene Title
41.36	HMGN5	-3.08	TLL1
22.45	SH3BGRL	-3.25	HLA-DMA
15.47	ASZ1	-3.58	LOX
12.96	PLAT	-4.37	EMR1
10.25	DUSP5	-4.75	FAM46C
9.20	ASZ1	-5.07	IFI27
8.10	KLRC1	-6.19	ST6GAL1
7.74	AKAP2	-6.70	MEOX1
6.83	RBP4	-10.64	PTGS2
4.80	PSCA	-12.81	WFDC1
4.25	TGFBR3	-18.93	RNF182
3.88	NT5E		
3.40	EFEMP1		
3.20	NTN4		

B88 細胞の安定発現株では、細胞増殖や遊走に関わる分子の変動が認められた。

(10) exosome 由来内因性 miR-518c-5p が TR-LE 細胞に与える影響

miR-518c-5p 阻害剤を添加した B88-SDF-1 細胞由来の培養上清を用いて同様の実験を行い, CXCR4 により誘導される内因性 miR-518c-5p の効果を検討したが, TR-LE 細胞の遊走と管腔形成の抑制効果は乏しかった. そこで, B88-SDF-1 細胞と B88-miR-518c 細胞から exosome を抽出し, miR-518c-5p の発現を検討した. B88-miR-518c 細胞では exosome 中に miR-518c-5p が検出されたが, B88-SDF-1 細胞由来の exosome には内因性の miR-518c-5p は一般的な分泌型 miRNA の 2 オーダー低い微量しか検出されなかった.

以上の結果より, miR-518c-5p は発現量に依存して細胞増殖や転移を促進する OncomiR であることが示唆された. しかしながら, CXCR4 シグナルの下流では, 癌細胞への直接的作用が主であり, 癌微小環境へ間接的作用は乏しく, 分泌型 miRNA としては, その他の miRNA が作用している可能性が示唆された. 本研究結果は, miR-518c-5p のように細胞抽出物にて発現上昇があっても, 分泌型 miRNA として作用するとは限らないことを示唆している. 次年度は, 培養上清からのアプローチにより CXCR4 シグナルの下流に存在する新規分泌型 miRNA を同定し, CXCR4 シグナルの癌微小環境への作用機序を明らかにしたいと考えている.

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 3 件)

- ① Uchida D, Kawamata H, Inaba F, Fukasawa I, Fujimori T. Chemoresistance of cancer cells: Oncogenic mutation of the p53 tumor suppressor gene. *Curr Signal Transduct Ther*, 査読有, 11, 2016, 3-8 DOI:10.2174/1574362411999160606163438
- ② Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Miwa Y, Horiuchi H, Furihata T, Tachibana M, Fujimori T. Overexpression of TSC-22 (transforming growth factor- β -stimulated clone-22) causes marked obesity, splenic abnormality and B cell lymphoma in transgenic mice. *Oncotarget*, 査読有, 7, 2016, 14310-23 DOI: 10.18632/oncotarget.7308
- ③ Kinouchi M, Uchida D, Kuribayashi N, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y. Involvement of miR-518c-5p to growth and metastasis in oral cancer. *PLoS One*, 査読有, 9, 2014, e115936 DOI:10.1371/journal.pone.0115936

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kuribayashi N, Uchida D, Kinouchi M,

Izumi S, Kuribayashi K, Kawamata H: Mechanism of transcriptional regulation of metabotropic glutamate receptor-5 induced by the CXCR4 signaling pathway, 109th AACR Annual Meeting, Washington, 2017. 4/1-5

- ② Kinouchi M, Uchida D, Kuribayashi N, Komiyama Y, Tsuchida S, Kawamata H: MicroRNA-518c-5p promotes the metastasis of oral cancer, 109th AACR Annual Meeting, Washington, 2017. 4/1-5
- ③ Kinouchi M, Uchida D, Kuribayashi N, Tamatani T, Nagai H, Kawamata H, Miyamoto Y: miR-518c-5p promotes the metastasis of oral cancer cells in a CXCR4-dependent and -independent manner. 106th AACR annual meeting, Philadelphia, 2015. 4/18-22
- ④ 内田大亮: シンポジスト「口腔癌研究のシーズを探す-4, 口腔癌に対する転移抑制療法の可能性-」第 68 回日本口腔科学会, 東京, 2014. 5. 9
- ⑤ Kinouchi M, Uchida D, Kuribayashi N, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: Isolation of a novel metastasis-related microRNA, miR-518c-5p, induced by the stromal cell-derived factor (SDF)-1/CXCR4 system in oral cancer. American Association for Cancer Research 105th Annual Meeting, San Diego, 2014. 4/5-9

[その他]

ホームページ等

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

(2014 年 9 月 30 日以前)

獨協医科大学・医学部・准教授

(2014 年 10 月 1 日以降)

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

(削除: 2014 年 10 月 9 日)

永井 宏和 (Nagai, Hirokazu)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 50282190

(削除: 2014 年 10 月 9 日)

玉谷 哲也 (Tamatani, Tetsuya)
徳島大学・大学病院・講師
研究者番号：30274236
(削除：2014年10月9日)

大江 剛 (Ohe, Go)
徳島大学・大学病院・助教
研究者番号：60432762
(削除：2014年10月9日)

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
(削除：2014年10月9日)

泉 さや香 (Izumi, Sayaka)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：30406227
(追加：2014年10月9日)

博多 研文 (Hakata, Kembun)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：40566642
(追加：2014年10月9日)

木内 誠 (Kinouchi, Makoto)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：00759483
(追加：2015年5月21日)

栗林 伸行 (Kuribayashi, Nobuyuki)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：80617332
(追加：2016年3月17日)