

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861725

研究課題名(和文) CXCR4標的分子mGluR5を介した口腔癌の転移機構におけるmiR-30の役割

研究課題名(英文) Regulation of metabotropic glutamate receptor 5 expression by the miR-30 downregulation induced by the SDF-1/CXCR4 system in oral cancer cells.

研究代表者

栗林 伸行 (Kuribayashi, Nobuyuki)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80617332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、口腔癌細胞がCXCR4を利用し転移することを明らかにした。また、CXCR4の標的分子として、mGluR5を同定し、mGluR5特異的阻害剤がCXCR4システム依存的な口腔癌細胞の転移を抑制することを明らかにした。さらにわれわれは、mGluR5の発現誘導機構に關与するmiRNAを網羅的に検索し、miR-30ファミリーを同定し、CXCR4システム依存的な発現低下を確認した。さらに、CXCR4システムによるmGluR5の発現誘導機構におけるmiR-30ファミリーの中で、miR-30a-5pおよびmiR-30c-5pが、mGluR5における転移機構に關与している事を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the miRNA association involved in the mGluR5 expression using oral cancer cells, B88, which express functional CXCR4 and exhibit highly metastatic potentials. We examined the metastasis-related miRNAs in SDF-1 stimulated B88 cells by use of a miRNA microarray analysis. Consequently, we isolated miR-30 family which has predictive binding sites in 3'-UTR of mGluR5 mRNA in silico analysis. Among these miRNAs, we confirmed the downregulation of all miR-30 family in SDF-1 stimulated B88 cells by the real-time PCR analysis. Next, we transfected these miR-30 families in SDF-1 stimulated B88 cells. We confirmed the downregulation of mGluR5 by the miR-30a-5p and miR-30c-5p overexpression. These results indicated that SDF-1/CXCR4 system might regulate the metastases of oral cancer by the upregulation of mGluR5 via downregulation of miR-30 family.

研究分野：外科系歯学

キーワード：microRNA mGluR5 CXCR4

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の予後不良因子は転移である。当研究室では転移抑制療法の開発を目指し、口腔癌の転移機構について研究を行ってきた。その中で、ケモカインレセプターCXCR4を発現している口腔癌細胞がリンパ節間質で産生されるリガンドstromal cell-derived factor (SDF)-1に引き寄せられながらリンパ節転移を起こすこと(Exp Cell Res290:289, 2003; Lab Invest 84:1538, 2004; Int J Oncol 25:65, 2004; Int J Oncol 29:1133, 2006)、CXCR4を高発現している口腔癌細胞の転移が、CXCR4阻害剤により抑制できることを明らかにしてきた(Mol Cancer Res 5:1, 2007; Mol Cancer8:62, 2009; Eur J Cancer 47:452 2011)。これら一連の結果は、CXCR4阻害剤による口腔癌の転移抑制療法の可能性を示唆するものである。しかしながら、CXCR4阻害剤は近年、造血幹細胞の動員薬として米国で臨床応用されており(Pharmacol Ther 128:509, 2010)、正常マウスに長期間投与した場合、慢性的な白血球増多症を誘発することが明らかとなった(PLoS One 13;8(11): e80773)。そこで、われわれは、cDNAマイクロアレイにより血球系細胞に発現のない癌細胞特異的なCXCR4の標的分子を網羅的に検索した。その結果、CXCR4システムの下流に存在する転移関連候補分子として、metabotropic glutamate receptor(mGluR)5を同定した。mGluR5は、グルタミン酸を唯一のリガンドとする代謝型グルタミン酸受容体の一つであり、神経系の細胞で高発現しているが、血球系細胞では発現していない(Histochem Cell Biol 132:435, 2009)。実際、mGluR5特異的阻害剤を正常マウスに連日投与しても血液毒性は認めなかった。さらにわれわれは、mGluR5特異的阻害剤がCXCR4システム依存性の口腔癌細胞の遊走を有意に抑制すること、ヌードマウス転移モデルにおけるリンパ節転移および肺転移を有意に抑制することを明らかにした。これら一連の結果は、mGluR5特異的阻害剤が癌細胞特異的にCXCR4システム依存性の転移を抑制することを示唆するものであるが、将来的な臨床応用を考えた場合、CXCR4システムを介したmGluR5の発現調節機構を解明することが重要である。われわれは様々な癌の進展に関与することが明らかにされたマイクロRNA(miRNA)によるmGluR5の制御を予想し、miRNAマイクロアレイにより、CXCR4システムの標的miRNAを網羅的に解析した。その結果、SDF-1処理は、mGluR5に対するseed配列を有するmiR-30ファミリー5種すべての発現を低下させた。近年、miR-30ファミリーの発現低下が、転移に重要とされる癌細胞の上皮間葉移行を促進することが報告された(Oncogene 2013 in press)。従って、mGluR5はCXCR4システムの下流でmiR-30

ファミリーによって発現誘導を受け、転移調節分子として作用している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究ではCXCR4システムによるmGluR5の発現誘導機構におけるmiR-30ファミリーの関与を検討し、mGluR5による転移機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

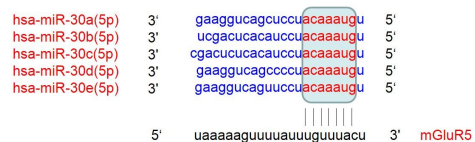
(1)CXCR4高発現株である口腔癌細胞B88をSDF-1処理し、TrizolにてtotalRNAを抽出した。TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (RT) Kit (Life Technologies)により逆転写後、StepOnePlusとTaqMan® MicroRNA Assaysによる定量PCR法を用いてmiR-30ファミリーの発現を確認した。その際、miR-30の発現低下の検討としてはmiRマイクロアレイでの測定絶対値、およびratioを考慮して検討した。

(2)上述したmiR-30ファミリーに対し、mGluR5の発現調整を検討した。口腔癌細胞B88にoligoを添加しmGluR5の発現低下の検討を定量PCRにて検討した。さらに、われわれの研究では、mGluR5の発現誘導は、MEK阻害剤であるU0126では完全に、PI3K阻害剤であるwortmanninでは部分的に抑制されていた。従って、mGluR5の下流では主にras-ERK pathwayが活性化していることを見出している。今回、miR-30ファミリーがこれらのpathwayとのつながりの有無を、MEK阻害剤であるU0126と、PI3K阻害剤であるwortmanninを用いて、定量PCRにて検討した。

4. 研究成果

(1)まず、われわれは、図1のようにSDF-1処理後のB88細胞、つまりmGluR5を高発現している細胞におけるmiR-30ファミリーの発現低下を確認したマイクロアレイの結果に対し、定量PCRにて発現低下を確認したところ、miR-30ファミリーすべてにおいてmGluR5の発現低下を確認した(図2)。

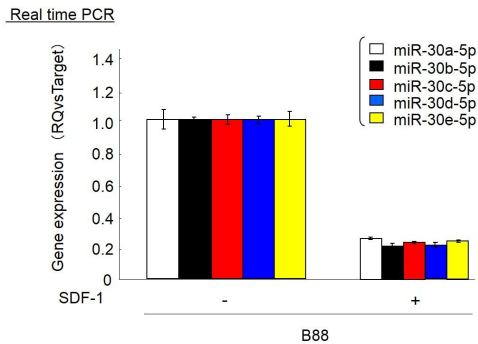
図1



microRNA	Raw data		ratio
	No treat	+SDF1	
hsa-miR-30a 367 (5p)	3171	1641	0.52
hsa-miR-30b 367 (5p)	937	370	0.39
hsa-miR-30c 366 (5p)	2787	1173	0.42
hsa-miR-30d 367 (5p)	1672	944	0.56
hsa-miR-30e 367 (5p)	193	60	0.31

Expression of miR-30 family which have the seed sequence of mGluR5 were downregulated by the treatment with SDF-1.

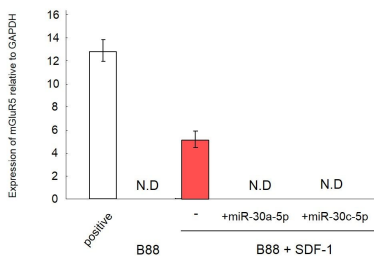
図 2



We confirmed the downregulation of miR-30 family in SDF-1 stimulated B88 cells by the real-time PCR analysis.

(2)さらに、miR-30 が mGluR5 に与える影響として miR-30a-5p および miR-30c-5p の過剰発現における mGluR5 の発現低下の検討を、oligo を用いて定量性 PCR で検討したところ、miR-30a-5p および miR-30c-5p にて mGluR5 の発現低下を認めた (図 3)。

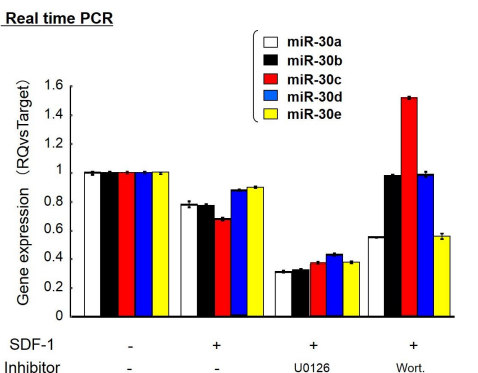
図 3



We confirmed the downregulation of mGluR5 by the miR-30a-5p and miR-30c-5p overexpression.

次いで、発現誘導機構の関係性として、mGluR5 の下流で働いている ras-ERK pathway および PI3K-AKT pathway について検討したところ、MEK 阻害剤である U0126 では、SDF-1 処理にて低下した miR-30 family の回復は認められなかった。PI3K 阻害剤である wortmannin では PI3K において miR-30b-5p, miR-30c-5p, miR-30d-5p においてに対し、mGluR5 の発現回復を認めた (図 4)。

図 4



Although miR-30 families were downregulated by the treatment with SDF-1, unexpectedly, blockade of MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways did not restore the expression of miR-30 families.

これらより、miR-30family は一部、mGluR5 の発現誘導機構として関与しているが、主要となる経路ではないことが示唆された。研究者は miR-30family の強制発現における mGluR5 の発現誘導機構および口腔癌の転移に関しての検討を継続して行っているが、まだ再現性が得られておらず、もう少し検索が必要である。

しかしながら、本研究において miR-30a-5p, および miR-30c-5p の発現低下は CXCR4 システムの下流に存在する miRNA として、独創的であった。さらに、mGluR5 はグルタミン酸の過剰産生が原因で生じる様々な疾患に関与することが示唆されており、種々の mGluR5 阻害剤が開発されている。従って、mGluR5 の発現誘導に関わるこれらの解析は、癌研究のみならず、これらの疾患研究にも役立つと思われる。

## 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida, Makoto Kinouchi, Chikako Koshiji, Sayaka Izumi, Kembun Hakata, Yusuke Komiyama, Shuji Tsuchida, Tomonori Hasegawa, Hitoshi Kawamata, Regulation of metabotropic glutamate receptor 5 expression by the miR-30 downregulation induced by the SDF-1/CXCR4 system in oral cancer cells.

AACR Annual Meeting 2016

2016年4月16-20日(4/18発表)Abstract Number 1925 New Orleans

栗林伸行, 木内 誠、内田大亮  
CXCR4 新規経口阻害剤 AMD070 による口腔癌の転移抑制 第 28 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2015.12.3~4 埼玉、川越東武ホテル(12.4発表 WS2-3)

栗林伸行, 内田大亮、木内 誠、宮本洋二、川又 均

SDF-1/CXCR4 システムを介した口腔癌の転移における新規経口 CXCR4 阻害剤 AMD070 の有用性 第 74 回日本癌学会学術総会 愛知 名古屋国際会議場 2015年10月8-10日(発表日 10月9日 P-2053)

Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida, Makoto Kinouchi, Tetsuya Tamatani, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto. The role of metabotropic glutamate receptor 5 on the lymph node metastases in oral cancer. AACR Annual Meeting 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

栗林 伸行 (KURIBAYASHI, Nobuyuki)  
獨協医科大学医学部・助教  
研究者番号：80617332

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：