

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：16301  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26861727  
研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるCDCA5の発現と機能解析

研究課題名(英文) Expression and function of CDCA5 in OSCC

## 研究代表者

徳善 紀彦 (Tokuzen, Norihiko)

愛媛大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：10723843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔扁平上皮癌に新規治療標的分子として cell division cycle associated 5 (CDCA5) の発現および機能について検討を行った。ヒト口腔扁平上皮癌細胞株および口腔扁平上皮癌組織では CDCA5 の発現亢進を認めた。また、癌組織における CDCA5 高発現群では有意に再発が多く、予後不良であった。次に、ヒト口腔扁平上皮癌細胞に CDCA5 発現抑制を行ったところ、著明な細胞増殖抑制効果を認めた。以上の結果より、CDCA5 が口腔扁平上皮癌の新たな治療標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified cell division cycle associated 5 (CDCA5) as a cancer-related gene which was overexpressed in all the human OSCC cells tested by microarray analysis. In this study, we investigated the expression and function of CDCA5 in OSCC. First, we confirmed that CDCA5 was overexpressed in human OSCC cell lines and OSCC tissues. We then tested the effect of synthetic small interfering RNAs specific for CDCA5 on the growth and invasion of human OSCC cells. Knockdown of CDCA5 markedly inhibited the growth of OSCC cells in vitro and in vivo. We also examined the expression of CDCA5 protein in 80 cases of OSCC immunohistochemically and found a significant association between CDCA5 expression levels and overall survival. These results suggest that CDCA5 functions as a critical gene supporting OSCC progression and that targeting CDCA5 may be a useful therapeutic strategy for OSCC.

研究分野：口腔扁平上皮癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 CDCA5 予後 治療標的分子

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、悪性腫瘍に対する様々な分子標的薬の創薬が進み、臨床応用されてきたが、口腔扁平上皮癌の治療に適応を有する分子標的薬は未だ epithelial growth factor receptor (EGFR) を標的としたセツキシマブのみである。そこで、われわれは口腔扁平上皮癌の新規治療標的となる分子を探索するために、ヒト不死化角化上皮細胞株 (HaCaT) とヒト口腔扁平上皮癌細胞株 9 種類 (Ca9-22, HSC2, HSC3, HSC4, GFP-SAS, SCC111, SCC25, SCC66, SCC9) から total RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、HaCaT と比較し、全てのヒト口腔扁平上皮癌細胞株に共通して 3 倍以上の発現亢進を認める癌関連遺伝子を 465 種類同定し (Tanaka H, et al. Oral Oncol 49:551-559,2013)、その中から著明に発現亢進を認めた Cell Division Cycle Associated 5 (CDCA5) に着目した。

(2) CDCA5 は姉妹染色分体接着調節因子として同定された蛋白質であり (Rankin S, Ayad NG, Kirschner MW. Mol Cell 18:185-200,2005) この蛋白質は分裂後期を通し分解され、G1 期における複合体依存性のユビキチン化を促進する。CDCA5 はクロマチンにおける接着に相互作用し、S 期および G2 期における接着の確立に必要であることが報告されている (Schmitz J, et al. Curr Biol 17:630-636,2007)。また、CDCA5 は肺癌において高発現しており、癌の増殖および悪性化に関与する分子であり、肺癌の新規治療標的分子としての可能性が示唆されている (Nguyen MH, Koinuma J, Ueda K, Ito T, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y. Cancer Res 70:5337-5347,2010)。さらに、種々の癌腫において癌抑制型 microRNA とされている miR-34a が CDCA5 の発現を制御しているとの報告がある (Pang RT, Leung CO, Lee CL, Lam KK, Ye TM, Chiu PC, Yeung WS. BMC Cancer 13:25,2013)。以上より、口腔扁平上皮癌においても CDCA5 が有用な治療標的分子となりうる可能性を有している。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では口腔扁平上皮癌における CDCA5 の発現および機能解析を行い、口腔扁平上皮癌の増殖、浸潤、転移における CDCA5 の役割を明らかにした上で、口腔扁平上皮癌の新規治療標的分子としての有用性を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株における CDCA5 の発現をリアルタイム定量化 RT-PCR (qRT-PCR) 法および Western blotting 法で確認する。次に、口腔扁平上皮癌組織における CDCA5 の発現と局在を免疫組織化学染色法にて確認した上で、臨床病理組織学的因子

との関連性を検討する。

(2) 模倣型合成 miR-34a および合成 siCDCA5 をヒト口腔扁平上皮癌細胞株にトランスフェクションし、細胞増殖能および浸潤遊走能、細胞周期への影響について検討を行う。

(3) 合成 miR-34a および siCDCA5 を送達媒体と混合し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞を移植したヌードマウスに局所投与し、それらの生体における抗腫瘍効果と安全性について評価する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (GFP-SAS, Ca9-22, HSC2, HSC3) およびヒト不死化角化上皮細胞株 (HaCaT) を用いて、リアルタイム定量化 RT-PCR (qRT-PCR) 法、ウェスタンブロット法にて、CDCA5 mRNA および蛋白質の発現量を比較検討したところ、全てのヒト口腔扁平上皮癌細胞株は HaCaT と比較し、CDCA5 mRNA および蛋白質の発現亢進を認めた (図 1)。

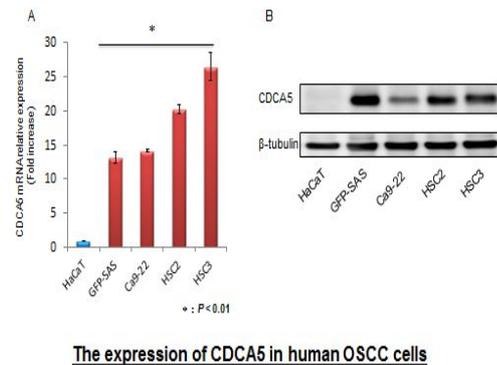
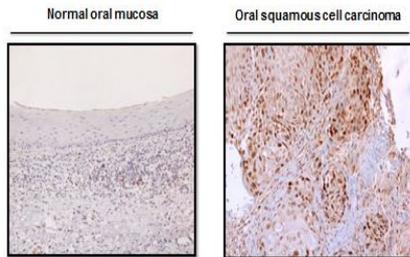


図 1 口腔扁平上皮癌細胞株における CDCA5 の発現

また、免疫組織染色にて CDCA5 は口腔扁平上皮癌組織の核および細胞質に局在を認め、正常口腔粘膜での発現は認めなかった (図 2)。CDCA5 の発現により CDCA5 高発現群と低発現群の 2 群に分類し、臨床病理学的検討を行ったところ、CDCA5 高発現群では低分化な症例が多く認められ、さらに、CDCA5 高発現症例では全生存率が有意に不良であり、CDCA5 の発現と予後との相関を認めた (表 1、図 3)。

(2) CDCA5 発現抑制に伴うヒト口腔扁平上皮癌への影響を検討するために、CDCA5 を標的とした合成 small interfering RNA (siCDCA5) および模倣型合成 miR-34a を導入し、CDCA5 発現抑制効果を Western blotting 法にて検討した。その結果、siCDCA5 は著明に CDCA5 蛋白質の発現抑制

を認めたが、miR-34a の発現抑制効果はごくわずかであり、それ以降の機能解析には siCDCA5 を用いることとした。



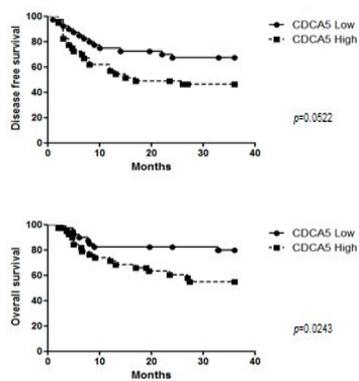
Expression of CDCA5 in OSCC tissues

図 2 口腔扁平上皮癌組織における CDCA5 の局在

Association between CDCA5 expression and clinicopathological parameters

	CDCA5 Low (n=40, %)	CDCA5 High (n=40, %)	p value
Age (year)			
Median (range)	70 (48-93)	69.8 (39-91)	0.478
Sex			
Male	23 (57.5)	23 (57.5)	1
Female	17 (42.5)	17 (42.5)	
Primary site			
Tongue	17 (42.5)	14 (35)	0.25
Maxillary gingiva	7 (17.5)	5 (12.5)	
Mandibular gingiva	9 (22.5)	14 (35)	
Floor of mouth	1 (2.5)	4 (10)	
Buccal mucosa	5 (12.5)	3 (7.5)	
Lower lip	1 (2.5)	0 (0)	
Differentiation			
well	33 (82.5)	24 (60)	0.05
moderate	6 (15)	10 (25)	
poor	1 (2.5)	6 (15)	
TNM stage			
Stage I + II	24 (60)	18 (45)	0.262
Stage III + IV	16 (40)	22 (55)	
Recurrence/metastasis			
No	27 (67.5)	18 (42.9)	
Yes	13 (32.5)	22 (57.1)	0.070
Local recurrence	3 (7.5)	10 (25)	0.069
Lymph node metastasis	6 (15)	7 (17.5)	1
Distant metastasis	4 (10)	5 (12.5)	1

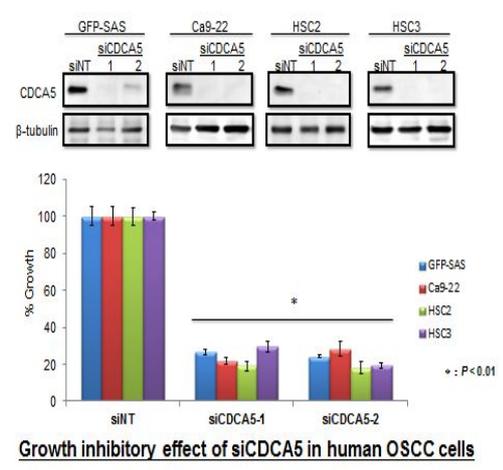
表 1 CDCA5 の発現と臨床病理学的因子との関連



Association between CDCA5 expression level and prognosis

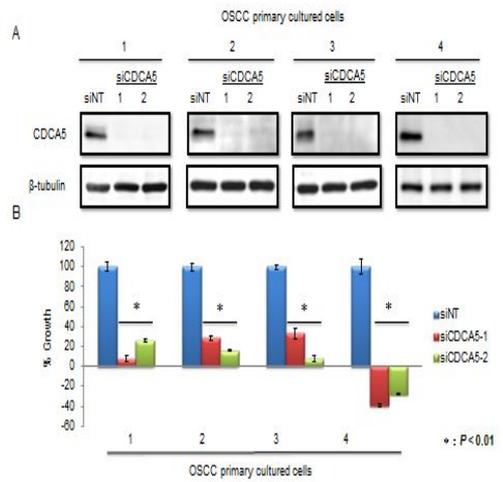
図 3 CDCA5 の発現と予後との関連

口腔扁平上皮癌細胞に siCDCA5 を導入し、CDCA5 発現抑制による増殖抑制効果を WST-8 assay にて評価したところ、著明な細胞増殖抑制効果を認めた (図 4)。さらに、当科で樹立した口腔扁平上皮癌初代培養細胞についても同様に増殖抑制効果を認めた (図 5)。CDCA5 発現抑制による浸潤能への影響について BD BioCoat 癌細胞浸潤アッセイシステムを用いて評価した。GFP-SAS 細胞に siCDCA5 をトランスフェクションし、24 時間後、48 時間後にメンブレンを通過した細胞数を評価したが、CDCA5 発現抑制による浸潤能への影響は認めなかった。



Growth inhibitory effect of siCDCA5 in human OSCC cells

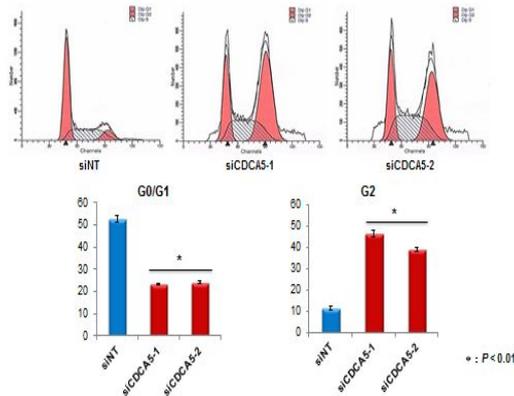
図 4 CDCA5 発現抑制による増殖抑制効果



Effect of targeting CDCA5 in human OSCC primary cultured cells

図 5 口腔扁平上皮癌初代培養細胞における siCDCA5 の増殖抑制効果

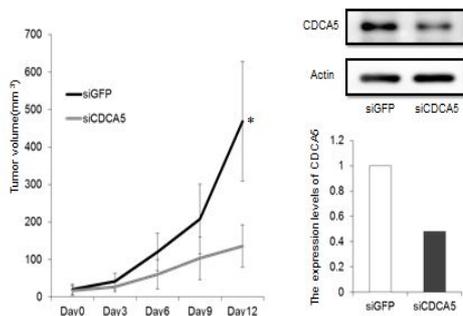
次に、口腔扁平上皮癌細胞に siCDCA5 を導入し、フローサイトメトリーを行い、CDCA5 抑制による細胞周期への影響について検討した。フローサイトメトリーでは CDCA5 の発現抑制により G1 期の細胞数の増加および G2 期の細胞数の増加を認めた (図 6)。



Role of CDCA5 in the cell cycle of GFP-SAS cells

図 6 CDCA5 発現抑制における細胞周期への影響

(3) *in vivo* における siCDCA5 の腫瘍抑制効果について検討を行った。GFP-SAS 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、3 日後に siRNA とアテロコラーゲンを混和し、腫瘍周囲への局所投与を行い、腫瘍抑制効果を評価した。その後、ヌードマウスを犠牲死させた後に、形成された腫瘍を取り出し、Western blotting 法にて CDCA5 蛋白質の発現抑制効果について検討した。その結果、siCDCA5 投与群はコントロール群と比較し、有意な抗腫瘍効果を認め、CDCA5 蛋白質の発現低下を認めた (図 7)。

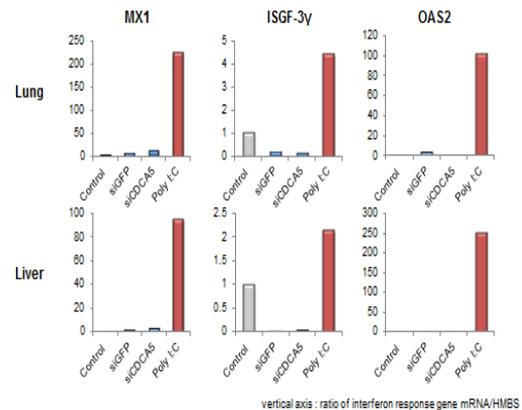


*In vivo* growth inhibitory effect of siCDCA5

図 7 *in vivo* における siCDCA5 の抗腫瘍効果

また、犠牲死させたマウスの肺、肝臓より total RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて合成核酸投与によるインターフェロン応答の

有無について評価した。その結果、合成核酸投与群ではインターフェロン応答を認めなかった (図 8)。



Expression of interferon response genes detected by qRT-PCR

図 8 siRNA 投与によるインターフェロン応答

以上より、CDCA5 は口腔扁平上皮癌において有意に発現亢進しており、CDCA5 の発現阻害は G2 arrest による著明に口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制を認めており、CDCA5 が口腔扁平上皮癌の新たな治療標的分子となる可能性が示唆された。

#### 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 1 件)

Norihiko Tokuzen, Koh-ichi Nakashiro, Hiroshi Tanaka, Kazuki Iwamoto, Hiroyuki Hamakawa  
Therapeutic potential of targeting cell division cycle associated 5 for oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 査読有、7 巻、2016、2343-2353、DOI : 10.18632/oncotarget.6148.

〔学会発表〕(計 4 件)

Norihiko Tokuzen, Koh-ichi Nakashiro, Hiroshi Tanaka, Kazuki Iwamoto, Hitoshi Akiyama, Hiroyuki Hamakawa, CDCA5 is a novel therapeutic target molecule in oral squamous cell carcinoma, AACR Annual Meeting 2016, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, USA

Norihiko Tokuzen, Koh-ichi Nakashiro,

Hiroshi Tanaka, Kazuki Iwamoto, Hiroyuki Hamakawa, CDCA5 is a potential therapeutic target for oral squamous cell carcinoma、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日～10日、名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県

徳善紀彦、中城公一、岩本和樹、田中宏史、浜川裕之、口腔扁平上皮癌における新規治療標的分子 CDCA5 の同定、19回日本がん分子標的治療学会、2016年6月10日～12日、松山全日空ホテル、松山市、愛媛県

徳善紀彦、中城公一、田中宏史、岩本和樹、浜川裕之、口腔扁平上皮癌における Cell Division Cycle Associated 5 の発現機能解析、第51回日本口腔組織培養学会学術大会、2014年11月15日、九州歯科大学講堂、北九州市、福岡県

〔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

愛媛大学大学院医学系研究科 口腔顎顔面外科学分野ホームページ

[www.m.ehime-u.ac.jp/school/dentistry](http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/dentistry)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳善 紀彦 (Tokuzen, Norihiko)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10723843