

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861736

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌幹細胞と関連するマイクロRNAの機能解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of oral cancer stem cell-related microRNAs and development of novel therapies

研究代表者

吉田 遼司 (Yoshida, Ryoji)

熊本大学・生命科学研究部・講師

研究者番号：10632458

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)：癌において転移は多段階かつ複雑な機構を経て成立し、がん患者の予後に大きな影響を与える。近年、microRNA (miRNA)による遺伝子調節が癌の発生・進展に寄与していることが示唆されている。今回、口腔扁平上皮癌の悪性形質、特に転移における腫瘍抑制的miRNAの機能的意義を検討するとともに、新たな転移関連分子および新規分子ネットワークの同定を試みた。研究の結果、転移関連miRNAであるmiR-Xは転移関連分子の遺伝子発現の調節を介してOSCCの転移機構において抑制的に作用することが明らかとなり、miR-Xが新たな診断・治療標的となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The progression of treatment resistant cancer cells is a multistep and complicated process, frequently leading to a poor prognosis in cancer patients. Recently, growing evidence has indicated that deregulation of microRNAs (miRNAs) contributes to tumor progression in oral squamous cell carcinoma (OSCC), such as metastasis, chemoresistance and radioresistance. The purpose of this study was to investigate the functional significance of tumor-suppressive miRNA in cancer cells and to identify novel miRNA-mediated cancer pathways and responsible genes in treatment resistant OSCC, especially metastasis. In the present study, metastasis-related miRNA (tentative name; miR-X) has a tumor-suppressing role in metastasis in OSCC via regulating metastasis related molecules, suggesting miR-X as a potential new diagnostic and therapeutic target for the treatment of OSCC.

研究分野：口腔扁平上皮癌

キーワード：口腔癌 マイクロRNA 治療抵抗性 転移

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma: OSCC) は口腔癌の 80%を占める疾患であり、診断・治療法が進歩した現在でも治療成績に劇的な向上はみられない。その原因として癌細胞が有する高増殖能、高浸潤・転移能や治療抵抗性の存在があり、その制御機構の解明が腫瘍制御において重要である。

近年、低分子 RNA である microRNA (miRNA) が見いだされ、癌の発生・進展・転移・治療抵抗性獲得の各局面で深く関わることが明らかとなっている。miRNA は蛋白質をコードしない 18-24 塩基程度の内在性 small RNA として発見され (Pasquinelli et al. Nature 2000) 標的遺伝子の転写阻害と転写後の翻訳阻害を介して生命現象に関与することが知られている (Kloosterman et al. Dev Cell 2006, Stefani et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2008)。また、miRNA の発現異常は細胞内における蛋白質の攪乱を引き起こし、癌などの疾患において重要な役割を担っていることが明らかにされ (Calin et al. Nat Rev Cancer 2006) 口腔癌においても近年報告がなされている。

しかし、OSCC において高悪性度を有する腫瘍細胞における miRNA の発現様式とその悪性形質制御機構については、未だにその詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では OSCC の病態解明および OSCC 癌幹細胞を標的とした新たな診断・治療法の開発を目的として、OSCC の発生・進展における miRNA を中心とした新規分子ネットワークの解明を目指した。

3. 研究の方法

OSCC の転移に関与する miRNA を同定するため、高転移 OSCC 細胞株の網羅的 miRNA アレイ解析を行い候補となる癌抑制型 miRNA を検索した。同定した miRNA (仮称; miR-X) を強制発現する OSCC 細胞株を 2 株樹立し、増殖能、遊走能、浸潤能を *in vitro* で評価した。また、樹立した miR-X 高発現 OSCC 細胞株とマウス同所異種移植モデルを用いて miR-X が転移に与える影響について評価した。続いて miR-X の標的遺伝子を同定するために親株と miR-X 高発現 OSCC 細胞株の cDNA マイクロアレイ解析および公共データベースによる *in silico* 解析を行った。同定された miR-X 標的遺伝子の OSCC の浸潤・転移における機能的意義を機能抑制実験にて検証した。

4. 研究成果

本研究は、口腔扁平上皮癌のがん幹細胞性に関連する悪性形質のうち転移能・治療抵抗性に関連する miRNA の解析を行った。申請者が当科で樹立した高転移 OSCC 細胞株 (Tanaka et al. Cancer Sci 2012) や抗癌剤耐性 OSCC

細胞株 (Nagata et al. Br J Cancer 2011) の各細胞株の網羅的解析を行ったが、抗癌剤耐性株では安定した結果が得られなかった。そこで、浸潤・転移能に関して引き続き研究を行った。

【miR-X は高転移性 OSCC で低発現している】

当科にて樹立した高転移 OSCC 細胞株 (GSAS/N5) を親株である GSAS/N0 の miRNA アレイを行ったところ、高転移株で miR-X が著明に発現低下を示すことを見出した。

このことから、miR-X は転移に関係する miRNA であることが示唆された。

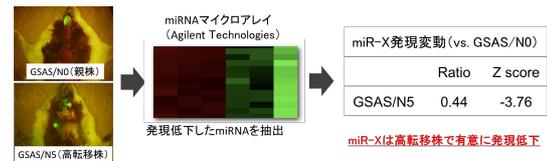


図 1: miRNA マイクロアレイの結果

【miR-X は OSCC の悪性形質に関与する】

miR-X の機能的意義を検討するためにヒト検体及び OSCC 細胞株で発現解析を行った。結果、miR-X はヒト検体において腫瘍で有意に発現が減少していた。更に、高転移性 OSCC 細胞株で減少する傾向を認めた。

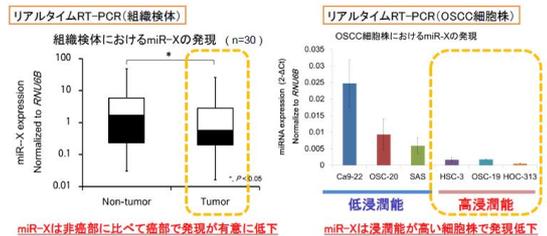


図 2: miR-X の発現解析

【miR-X は OSCC 細胞の浸潤能を抑制する】

miR-X 高発現 OSCC 株を樹立し、miR-X の機能解析を遊走能・浸潤能に着目して行った。*in vitro* において miR-X 高発現細胞株は遊走能・浸潤能の有意な低下を示した。

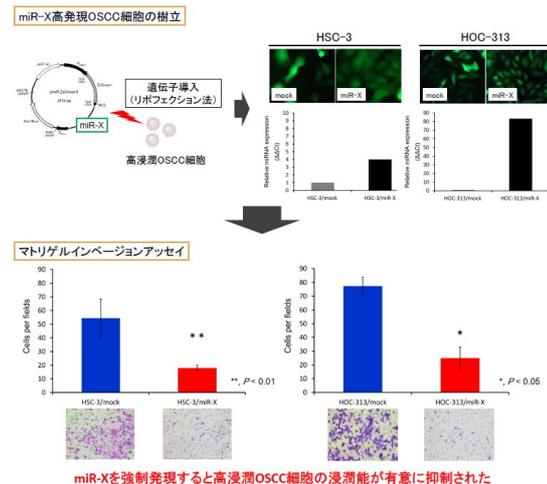


図 3: miR-X 高発現細胞株樹立と機能解析

【miR-X は動物モデルでも転移を抑制する】  
*in vitro*における表現型を同所異種移植モデルにおいて検証したところ、miR-X 高発現 OSCC 細胞ではリンパ節転移の有意な減少を認めた(表1)。一方、腫瘍体積には有意差は認めなかった(図4)。このことからこの現象が腫瘍の転移能に大きく依存していることが示唆された。

表1: miR-X 高発現 OSCC の転移能

	OSC-19/mock	OSC-19/miR-X
Metastasis (-)	1	6
Metastasis (+)	7	2

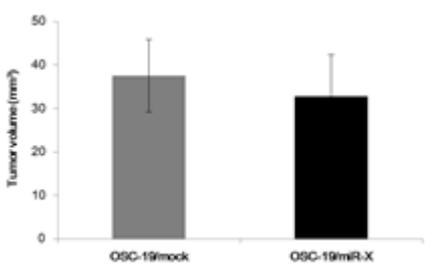


図4: miR-X 高発現 OSCC 細胞株の腫瘍体積

【IMR-1 は miR-X の標的遺伝子である】  
 網羅的解析から miR-X の標的遺伝子 IMR-1 (仮称) を同定した。

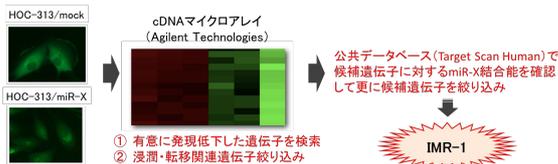


図5: miR-X 標的遺伝子の検索

miR-X 高発現 OSCC 細胞では、IMR-1 の発現は mRNA レベル、タンパクレベルいずれにおいても減少していた。

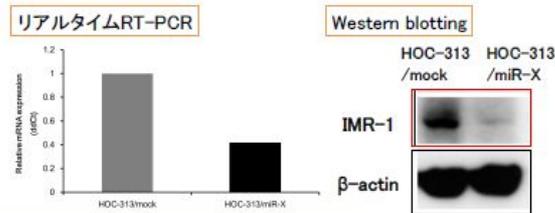


図5: IMR-1 発現解析

【IMR-1 は OSCC の浸潤能を制御する】  
 IMR-1 発現抑制によって、OSCC 細胞の遊走能、浸潤能は有意に抑制された。

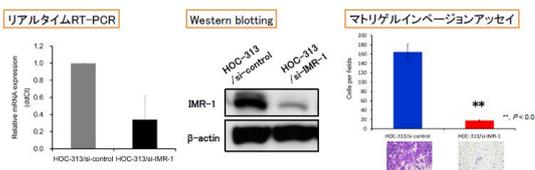


図6: IMR-1 の発現抑制と浸潤能の関係

【IMR-1 は患者の病態・予後と関連する】  
 OSCC 臨床検体における解析を行った結果、IMR-1 高発現は腫瘍の浸潤様式および患者の予後を強く関連した。

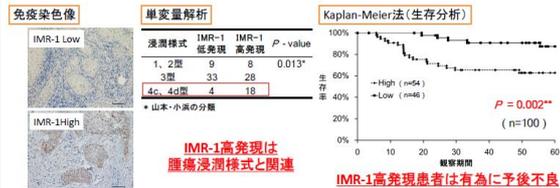


図7: IMR-1 の OSCC 患者における臨床的意義

以上の知見から、下図に示すような miR-X を中心とした新たな浸潤・転移機構の分子ネットワークの一端が明らかとなった。

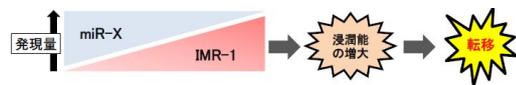


図8: miR-X を中心とした転移制御機構

今後、IMR-1 の下流でどのような分子が転移に関わるかを明らかにするとともに、miR-X の他の標的分子についても解析を進める予定である。尚、本研究成果は検証実験を進めた後、海外学術雑誌へ投稿予定である。

一方、抗癌剤耐性、放射線耐性に関する miRNA の同定及び機能解析については今回の研究期間中に明らかにすることはできなかった。これに対しては新たに抗癌剤および放射線耐性 OSCC 細胞株を樹立し、複数の miRNA アレイ解析から候補となる miRNA の絞り込みおよび機能解析を行う予定である。

尚、本研究過程に関連し、がん幹細胞に関連する悪性形質制御に関わる複数の miRNA が Notch シグナル関連分子やインターロイキン 6 (IL-6) を標的としていることを見出した。このことから、Notch1 や IL-6 ががん悪性形質に与える影響や臨床的意義についても着目し、いくつかの知見をえた。現在それらについても更に検討を行っている。

## 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 6 件)

Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, Kameyama H, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Ito T Notch1 controls cell chemoresistance in small cell lung carcinoma cells. Thorac Cancer. 2016 Jan;7(1):123-8. 査読有り  
 doi: 10.1111/1759-7714.12297.

Nakashima H, Matsuoka Y, Yoshida R, Nagata M, Hirose A, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Hiraki A, Nakayama H. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte

ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study.  
BMC Cancer. 2016 Jan 26;16:41.  
査読有り  
doi: 10.1186/s12885-016-2079-6.

Matsuoka Y, Yoshida R, Nakayama H, Nagata M, Hirosue A, Tanaka T, Kawahara K, Nakagawa Y, Sakata J, Arita H, Hiraki A, Shinohara M.  
The tumour stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma.  
APMIS. 2015 Mar;123(3):205-14.  
査読有り  
doi: 10.1111/apm.12344. Epub 2014 Dec 31.

Nakamura T, Shinriki S, Jono H, Ueda M, Nagata M, Guo J, Hayashi M, Yoshida R, Ota T, Ota K, Kawahara K, Nakagawa Y, Yamashita S, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Ando Y.  
Osteopontin-integrin (v) (3) axis is crucial for 5-fluorouracil resistance in oral squamous cell carcinoma.  
FEBS Lett. 2015 Jan 16;589(2):231-9.  
査読有り  
doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.004.

Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Ito T.  
Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines.  
Lung Cancer. 86(3):304-10. (2014)  
査読有り  
doi: 10.1016/j.lungcan.2014.10.007.

Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Ito T.  
Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. Lung Cancer. 85(2):131-40. (2014)  
査読有り  
doi: 10.1016/j.lungcan.2014.05.001.

〔学会発表〕(計 6 件)

Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirosue, Takuya Tanaka, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Hidetaka Arita, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Hidenao Ogi, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama  
IL-6 confers radioresistance via Nrf2

antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma cells  
2015 International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Melbourne, Australia 2015年10月26日~2015年10月30日 ポスター

Hikaru Nakashima, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirosue, Kenta Kawahara, Jyunki Sakata, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki and Hideki Nakayama  
Investigation of the clinical significance of circulating miRNAs in oral squamous cell carcinoma  
第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日-11日  
名古屋国際会議場、愛知、ポスター

Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirosue, Takuya Tanaka, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Hidetaka Arita, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Hidenao Ogi, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama  
IL-6 confers radioresistance via Nrf2 antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma cells  
第74回日本癌学会学術総会 愛知・名古屋 2015年10月8日~10日 ポスター

松岡 祐一郎、吉田 遼司、廣末 晃之、田中 拓也、永田 将士、川原 健太、有田 英生、坂田 純基、平木 昭光、篠原 正徳、中山 秀樹  
口腔扁平上皮癌細胞において腫瘍随伴マクロファージおよび IL-6 は放射線耐性に寄与する  
第39回日本頭頸部癌学会・第4回アジア頭頸部癌学会 兵庫・神戸 2015年6月4日~6日 ポスター

川原健太、吉田遼司、廣末晃之、田中拓也、永田将士、松岡祐一郎、湯野晃、有田英生、坂田純基、平木昭光、中山秀樹、篠原正徳  
Radioresistance of metastatic tumor cells in oral squamous cell carcinoma  
第39回日本頭頸部癌学会/第4回アジア頭頸部癌学会、2015年6月4-6日  
神戸国際会議場、兵庫、ポスター

中嶋 光、吉田 遼司、永田 将士、川原 健太、廣末 晃之、松岡 祐一郎、有田 英生、坂田 純基、平木 昭光、中山 秀樹  
口腔扁平上皮癌患者における Neutrophil Lymphocyte Ratio の臨床的意義に関する検討  
第69回日本口腔科学会学術集会、2015年5月13日-15日  
大阪国際会議場、大阪、口演

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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

吉田 遼司 (YOSHIDA Ryoji)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師  
研究者番号：10632458

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

伊藤 隆明 (ITO Takaaki)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：70168392

中山 秀樹 (NAKAYAMA Hideki)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：70381001