

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05038

研究課題名(和文) 口腔がん関連microRNAの総合的機能解析と新規治療法の探索

研究課題名(英文) Functional characterization of oral cancer related microRNA and identification of novel therapeutics

研究代表者

武川 寛樹 (Bukawa, Hiroki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80173558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がんの凍結検体とヒト正常口腔粘膜組織を用いて、2500種類のmicroRNA (miRNA) の網羅的発現解析を行い、がん遺伝子として働くOnco-miRNAおよびがん抑制遺伝子として働くTumor-suppressor miRNAを抽出した。miR-205-5pはTIMP-2の発現を抑制してMMP-2の酵素活性を制御することが明らかとなった。MMP-2が細胞外基質を分解し、がん細胞が浸潤すると考えられるため、miR-205-5pは上記の経路を制御することで口腔がんのTumor-suppressor miRNAとして働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify oral cancer-associated microRNAs (miRNA), samples (tumor and normal tissue) were analyzed with microRNA microarray. Candidate miRNAs with expression levels that were significantly altered in oral cancer samples or selected from a literature review were identified as Onco-miRNA or Tumor-suppressor miRNA. We found that miR-205-5p functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma (OSCC), that miR-205-5p directly regulates TIMP-2 expression, and that miR-205-5p suppresses pro-MMP-2's activation by regulating the TIMP-2 expression in OSCC cells. Thus, it may be possible to use miR-205-5p to regulate specific tumor-progressive genes as a novel therapeutic approach to treating OSCC.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔がん microRNA miR-205-5p Tumor-suppressor miRNA

### 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は約 22 ヌクレオチドの RNA で、標的遺伝子の mRNA の翻訳を抑えることで発生や分化の調節にかかわり、その機能の異常はがんの発生に関与することが明らかにされてきた。これらの miRNA の機能を標的とした診断・治療法が現在模索されており、過剰発現や発現低下している miRNA を抑制あるいは補うことで、がんの治療が可能となることが期待されている。

我々は以前の研究で、正常組織に比べて口腔がん細胞株や口腔がん臨床検体で発現が増強している miRNA と減弱している miRNA を見つけてきた。また血清中あるいは唾液中に分泌される miRNA とがん細胞内にとどまる miRNA も同定してきた。しかし、口腔がん関連 miRNA は報告者によってまだ異論も多く、癌促進型 miRNA (Onco-miR)、癌抑制型 miRNA (Tumor suppressor-miR) の傾向さえ示されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、多くの臨床検体とより多くの miRNA について総合的機能解析を行うことで、reference data として口腔がん関連 miRNA を提示し、さらには遺伝子の発現制御をつかさどる miRNA を応用した新しい口腔がんの診断・治療法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

miRNA の網羅的発現解析口腔扁平上皮癌 9 検体 (うち転移を伴う検体: 3 検体) と正常口腔粘膜組織 4 検体の凍結検体を用いて、total RNA を抽出し miRNA マイクロアレイにて 2565 種の miRNA の発現解析を行った。

ホルマリン固定パラフィン包埋生検検体 (FFPE) を用いての発現解析筑波大学附属病院歯科口腔外科で口腔がん (扁平上皮癌) と診断され、初回治療を受けた 72 症例から無作為抽出した非転移症例 40 例および転移症例 30 例の計 70 例の組織の FFPE から total RNA を抽出して qRT-PCR による発現解析を行った。

#### 口腔がん細胞株の形質転換

miRNA mimic や inhibitor を転移 / 非転移性口腔がん細胞株に導入して形質転換を行い、口腔がん細胞株の増殖能・浸潤能の変化を観察した。

主要な口腔がん関連 microRNA の標的遺伝子の検索

以上の実験で得られた主要な miRNA に対して、複数のアルゴリズム (DIANA-MICROT、miRDB、Micro RNA.org、TargetScan-VERT) を用いて、その標的となる mRNA を決定し、シングルアッセイを行った。

### 4. 研究成果

miRNA の発現を網羅的に解析し、口腔がん

移に関連する miRNA を同定した。これまでの研究により、既にリンパ節転移並びに予後と発現状態が関連する miRNA を絞り込んでいるが、さらに多くの miRNA を探索し、悪性度に関連する miRNA をある程度絞り込んだ。この結果より、リンパ節転移の制御に関連する可能性のある miRNA として miR-7-5p、miR-31-3p、miR-224-5p を抽出した (図 1)。

正常組織と比較してがん組織で 4 倍以上発現していた miRNA

miRNA	発現量(がん/正常)
hsa-miR-31-5p	21.17
hsa-miR-7-5p	16.47
hsa-miR-424-5p	12.54
hsa-miR-31-3p	12.45
hsa-miR-21-3p	10.13
hsa-miR-503-5p	8.27
hsa-miR-21-5p	8.27
hsa-miR-135b-5p	6.71
hsa-miR-450a-5p	6.08
hsa-miR-155-5p	5.23
hsa-miR-455-3p	5.12
hsa-miR-524-5p	4.99
hsa-miR-455-5p	4.98
hsa-miR-526a	
hsa-miR-520c-5p	4.54
hsa-miR-518d-5p	
hsa-miR-431-3p	4.51
hsa-miR-224-5p	4.18
hsa-miR-146b-5p	4.17
hsa-miR-301a-3p	4.14
hsa-miR-142-3p	4.07
hsa-miR-142-5p	3.96
hsa-miR-223-3p	3.93

非転移性がんと比較して転移性がん

miRNA	発現量(転移/非転移)
hsa-miR-376b-3p	9.09
hsa-miR-495-3p	7.35
hsa-miR-376a-3p	5.64
hsa-miR-376c-3p	4.75
hsa-miR-31-3p	4.66
hsa-miR-7-5p	4.38
hsa-miR-224-5p	4.15
hsa-miR-654-3p	4.12

いずれの場合も4倍以上発現していた miRNA

- miR-7-5p
- miR-31-3p
- miR-224-5p

図 1. miRNA の網羅的発現解析

網羅的解析において口腔がんの発現と転移を促進すると思われる miRNA であったが、qRT-PCR では非転移群の方が miRNA の発現量が多いという結果となった。また、発現量と生存期間の比較においては、有意な差は認めなかった (図 2)。

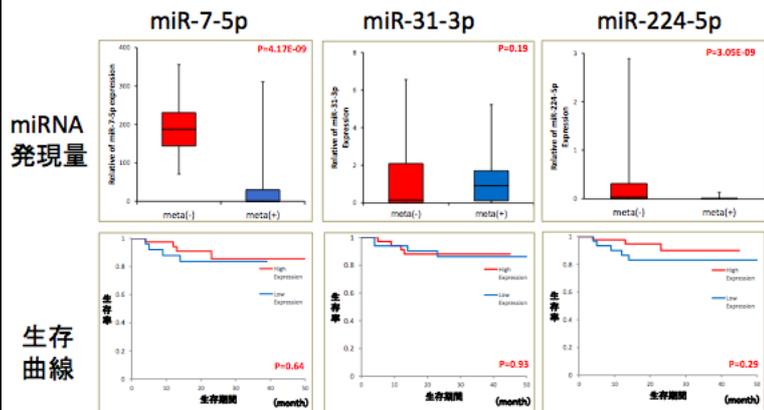


図 2. FFPE における各 miRNA の発現解析と生存曲線

口腔がん細胞株で miR-205-5p の形質転換を行い、機能解析を行った。

上記の結果より、以前の研究において、口腔がん由来細胞株の非転移性株において転移性株より発現が有意に高い miR-205-5p に着目して、発現および機能解析を行った。miR-205-5p の発現は qRT-PCR で測定し、口腔がん組織検体および転移性・非転移性口腔がん細胞株で網羅的解析と矛盾のない結果を得た (図 3)。

## がん組織中のmiR-205-5pの発現量

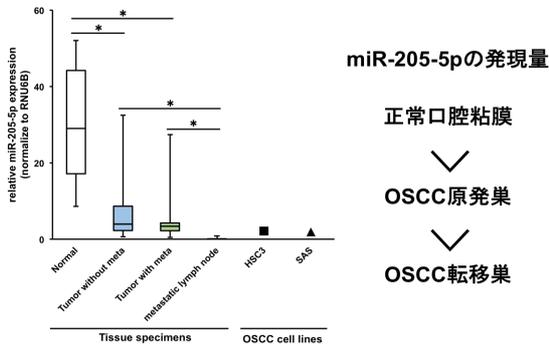
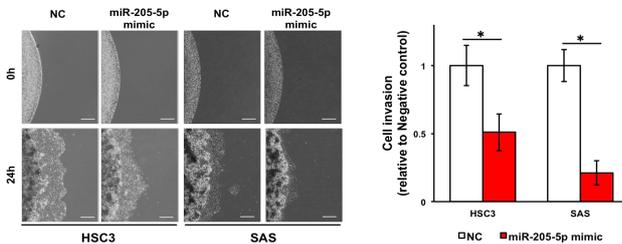


図 3. miR-205-5p の発現解析

次に、miR-205-5p の mimic を導入し、その発現を増強させ、浸潤能を測定したところ、有意に抑制された (図 4)。

## miR-205-5p mimic/inhibitorの機能解析

### Cell invasion assay



mimic 導入→HSC3, SASで浸潤能が有意に抑制

図 4. miR-205-5p の機能解析

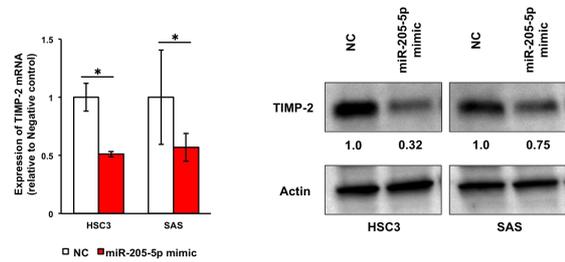
主要な口腔がん関連 microRNA の標的遺伝子の検索

データベースをもとに miR-205-5p の塩基配列との相補性から標的となりうる遺伝子を検索した。抽出された複数の標的遺伝子の候補のうち上皮系がん細胞の浸潤に関わる「上皮間葉転換(EMT)」に関連する遺伝子とされる ZEB を分析対象とした。miR-205-5p と ZEB の関連の有無を検証するため、転移性口腔がん由来細胞株を用いて miR-205-5p の強制発現およびノックダウンによる両者の mRNA レベルの発現変化を RT-PCR にて測定した。結果は miR-205-5p の強制発現により ZEB の発現はコントロール群と比較して有意に低下していることが確認された。さらに ZEB が転写因子として作用する E-cadherin に関しては ZEB とは逆相関の関係で発現の増加が認められた。

さらに、細胞外基質分解酵素である MMP-2 の酵素活性に關与する TIMP-2 も、miR-205-5p の制御を受けているため分析した。TIMP-2 は miR-205-5p の強制発現によって、mRNA・タンパク質ともに発現現弱することが確認された (図 5)。また、口腔がん細胞株において TIMP-2 のノックダウンをしたところ、浸潤能が有意に抑制された (図 5)。

## TIMP-2がmiR-205-5pのtarget geneであることの検証

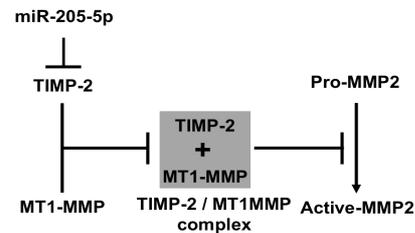
### mRNAとタンパク質の発現解析



mRNA・タンパク質の両レベルで発現量低下

図 5. miR-205-5p 強制発現による TIMP-2 の発現状態

## miR-205-5pのMMP-2酵素活性制御の作用機序



miR-205-5pはTIMP2の発現を抑制を介してMMP2の酵素活性を抑制する

図 6. miR-205-5p による MMP-2 活性制御

miR-205-5p mimic 導入細胞株では Active-MMP2 の割合が減少したため、miR-205-5p は TIMP-2 の発現抑制を介して MMP2 の酵素活性を抑制することが示唆された (図 6)。

以上より、口腔がんにおいて miR-205-5p は Tumor suppressor-miRNA として作用しており、TIMP-2 は miR-205-5p の Target gene であることを明らかにした。がん細胞は過剰に MMP-2 を活性化させ基底膜を破壊し、浸潤・転移していくことが考えられているが、miR-205-5p がその抑制を行っている key gene であ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3件)

1. Nagai H, Hasegawa S, Uchida F, Terabe T, Ishibashi Kanno N, Kato K, Yamagata K, Sakai S, Kawashiri S, Sato H, Yanagawa T, Bukawa H. MicroRNA-205-5p suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP-2 expression. *Int J Oncol*, 52:841-850. doi: 10.3892/ijo.2018.4260, 2018

2. Terabe T, Uchida F, Nagai H, Omori S, Ishibashi-Kanno N, Hasegawa S, Yamagata K,

Gosho M, Yanagawa T, Bukawa H. Expression of autophagy-related markers at the surgical margin of oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and tumor recurrence.

*Hum Pathol*, 73:156-163, doi: 10.1016/j.humpath.2017.11.019, 2018

3. Baba O, Hasegawa S, Nagai H, Uchida F, Yamatoji M, Kanno NI, Yamagata K, Sakai S, Yanagawa T, Bukawa H. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *J Oral Pathol Med*, 45:248-55. doi: 10.1111/jop.12351, 2016

〔学会発表〕(計3件)

1. 飯泉誠一郎、内田文彦、長井宏樹、寺邊健人、高岡昇平、武内保敏、菅野直美、山縣憲司、柳川 徹、武川寛樹

口腔がん組織における microRNA 発現の網羅的解析の意義

第62回(公社)日本口腔外科学会総会・学術集会(2017年10月21日 京都府京都市国立京都国際会館)

2. 長谷川正午、内田文彦、長井宏樹、川尻秀一、加藤広禄、

口腔癌細胞における microRNA の MT1-MMP 制御機構の解明

金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム(2017年2月14日 金沢大学)

3. 長井宏樹、長谷川正午、寺邊健人、内田文彦、加藤広禄、菅野直美、山縣憲司、柳川 徹、川尻秀一、武川寛樹

microRNA-205 は TIMP-2 の発現抑制を介して ECM の分解を制御する

第61回(公社)日本口腔外科学会総会・学術集会(2016年11月25日 千葉県千葉市幕張メッセ)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

武川 寛樹 (BUKAWA, Hiroki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号： 80173558

(2)研究分担者

柳川 徹 (YANAGAWA Toru)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号： 10312852

正田 純一 (SHODA Junichi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号： 90241827