

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K15695  
研究課題名(和文)非コードRNA-RNA相互作用ネットワークによる口腔扁平上皮癌の癌形質制御の試み  
  
研究課題名(英文)Study of the non-cord RNA-RNA Interaction Network in Oral Squamous Cell Carcinoma for anticancer therapy  
  
研究代表者  
清島 保(Kiyoshima, Tamotsu)  
  
九州大学・歯学研究院・教授  
  
研究者番号：20264054  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、蛋白質に翻訳されないRNA(非コードRNA)が細胞形質に影響するといわれている。そこで、非コードRNA-RNA相互作用ネットワークを応用して癌形質変化を誘導させ、癌特異的発現による新規治療法の開発を目的とした基礎的研究を行った。標的とした因子や微小環境変化により影響を受ける癌形質変化に關与する非コードRNA候補が見出された。また、口腔扁平上皮癌に特異的発現を示すKRT17の機能解析と発現機構について一部明らかになった。口腔扁平上皮癌におけるKRT17の発現がGLIを介した抗アポトーシス作用による腫瘍形成の促進が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, non-coding RNAs (ncRNAs), which are not translated to protein, have gained a great interest owing to their functions implicated in various biological processes including tumorigenesis and carcinogenesis. In order to develop a new anti-cancer therapy made by applying ncRNA functions under the regulatory expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC), we investigated the interaction between ncRNAs and examined the regulatory expression of genes that specifically express in OSCC. Some ncRNAs were found as putative RNAs that regulated cancer cell behaviors to be affected by factors and the microenvironment. In addition, squamous cell carcinoma antigen, cytokeratin 17 (KRT17), p63 and so on have been suggested as reliable diagnostic markers of OSCC. Analyses of its function and expression of KRT17 in OSCC suggested that KRT17 promoted tumor cell growth, at least partially, through its anti-apoptotic effect as a result of the KRT17 overexpression by GLIs in OSCC.

研究分野：口腔病理学

キーワード：非コードRNA 口腔扁平上皮癌 癌形質 癌特異的発現因子 癌特異的発現制御機構

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は1990年に米国で臨床研究が開始され、標的タンパク質の発現や機能抑制が主な戦略となってきた。そして、現在 microRNA (miRNA) や short interfering RNA (siRNA) の RNA interference (RNAi) 経路を介した癌化機構の解明による癌診断法や治療法などの研究も加わっている。

2003年のゲノム塩基配列完全解読によると、ヒトの遺伝子総数は線虫のような下等生物とほぼ同数で、タンパク質をコードする遺伝子は数%にしか過ぎず、大部分はジャンクDNAと呼ばれる領域であった。また、RNAに転写されるヒトのゲノム情報もほとんどが非コードRNA (ncRNA) であることが明らかになった。これらncRNAの機能は十分には解明されていないが、近年、miRNAやsiRNAの機能制御に内在性の長鎖mRNA型ncRNAやmRNAが関与し、細胞形質に影響するという新しい概念が報告された (Poliseno et al., Nature, 2010)。さらにmiRNAを捕捉して、その機能を抑制する内在性非コード長鎖RNAやmRNA (内在性RNA sponge) の存在が明らかとなった (Poliseno et al., Nature, 2010; Kumar et al., Nature, 2014)。

遺伝子治療は、患部への遺伝子導入効率の低さや標的遺伝子の特異的発現効率が問題とされる。そこで、上記の内在性RNA spongeの発現が通常のタンパク質をコードする遺伝子と同様にRNA polymerase II (Pol-II) により転写されることから、我々が研究している口腔扁平上皮癌におけるS100A7、p63やKRT17の扁平上皮癌組織特異的発現プロモーターの応用が可能と思われる。

よって、本研究では癌細胞形質変化を誘導する非コードRNA-RNA (ncRNA-RNA) 相互作用ネットワークを解明する。そして、局所投与した遺伝子治療ベクターによる癌組織特異的に標的内在性RNA spongeの発現を図り、その新規概念による口腔扁平上皮癌の非観血的治療法の確立を目指した基礎的研究を行う。また、本研究成果は発生的にもゲノム情報伝達に対する新たな知見を導くと期待される。そして、口腔扁平上皮癌のみならず、種々の悪性腫瘍への応用や正常な細胞の分化機構の理解を深め、癌治療や再生医学といった領域にも大きな貢献をもたらすと考えられる。

## 2. 研究の目的

ヒトのゲノム塩基配列完全解読により、RNAに転写されるヒトのゲノム情報はほとんどが非コードRNA (ncRNA) で、数%しかタンパク質をコードしていないことが明らかになった。miRNAやsiRNAなどの短鎖RNAもncRNAに含まれ、RNAi経路を介した癌化機構の解明による癌診断法や治療法などの研究が大に進められている。ところが近年、これらmiRNAやsiRNAの機能制御に内在性の長鎖mRNA型ncRNAやmRNAが関与し、細胞形質に影響するという新しい概念とそれを裏付ける研究報告がなされた。

本研究では、癌細胞形質を変化させる非コードRNA-RNA (ncRNA-RNA) 相互作用ネットワークの解明を利用した新規概念に基づく口腔扁平上皮癌の治療法の確立を目指した挑戦的戦略研究を行う。

以下の3点を基本として研究を展開する。

口腔扁平上皮癌にて発現変化がみられるmiRNAの機能制御に関わる長鎖mRNA型ncRNAやmRNA (内在性RNA sponge) による新規ネットワークの同定

内在性RNA spongeを口腔扁平上皮癌特異的に発現するベクター作製と*in vitro*評価

で作製したベクターの担癌動物における腫瘍組織特異的発現と癌細胞形質変化の*in vivo*評価

## 3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌にて発現変化がみられるmiRNAの機能制御に関わる長鎖mRNA型ncRNAやmRNA (内在性RNA sponge) の同定を試みる。

- (1) 扁平上皮癌特有に発現しているmiRNAでmiRNAクラスター形成しているものに着目し、長鎖のmRNA型ncRNAやmRNA (内在性RNA sponge) 候補を挙げる。また、同一患者由来で形質の異なる扁平上皮癌細胞株を保有しているので、その細胞株間で差異的発現を認めるmiRNAの検索を通して、内在性RNA sponge 候補の追加検索を行う。
- (2) 候補とした内在性RNA spongeの発現がどのように制御されているかを、内在性RNA spongeの転写開始点周辺のプロモーター領域の機能解析を行う。これは内在性RNA spongeのプロモーター領域を

Pol-IIが認識することによる。加えてエピジェネティック発現制御解析を行う。

- (3) 扁平上皮癌における内在性RNA sponge候補の機能解析を行う。

内在性RNA sponge を口腔扁平上皮癌特異的に発現するベクター作製と*in vitro*評価を行う。

- (1) 扁平上皮癌特異的に発現させるプロモーター領域の構築のため、S100A7、p63やKRT17を標的として解析を行う。
- (2) 上記にて同定した内在性RNA spongeを前頁下段の実験で解析したS100A7、p63やKRT17のプロモーター領域にて扁平上皮癌特異性に発現させる新規癌治療用ベクターによる癌細胞形質変化およびアポトーシス誘導の*in vitro*選択特異性を検討する。正常角化上皮細胞、扁平上皮癌や腺癌由来癌細胞に本ベクターを導入し、以下の方法で検討する。

で作製したベクターによる担癌動物における腫瘍組織特異的発現と癌細胞形質変化の*in vivo* 評価を行う。

口腔扁平上皮癌由来および腺癌由来の癌細胞株を背部皮下に移植した担癌マウスに新規扁平上皮癌治療用ベクター処理を施し、組織を摘出後RNA やタンパク質抽出および固定後に組織切片作製を行う。処置後一定期間毎に試料を採取して癌抑制効果を検討する。

これらの結果を検討して改善点の焙り出し、転写因子に限らず、癌細胞の形質変化や特異的発現機構あるいは器官形成期の一過性発現に関与する因子を検討しつつ、これらの結果と併せて、今後の戦略の構想を練っていく。

#### 4. 研究成果

近年、microRNAやshort interfering RNA ( siRNA ) のRNA interference ( RNAi ) 経路を介した機能制御に内在性の長鎖mRNA型ncRNAやmRNAが関与し、細胞形質に影響するという新しい概念が唱えられている。そこで本研究では、この非コードRNA-RNA相互作用ネットワークを応用して口腔扁平上皮癌特異的に癌形質変化を誘導させる発現ベクター作製し、非観血的治療法の開発を目的とした基礎的研究を行った。期間内

に展開した実験結果と成果報告は以下の通りである。

標的遺伝子を増減させた細胞株間におけるmiRNA発現変化の検索： -1) 新たながん促進性/抑制性iRNAを見出すため、操作する標的遺伝子には、がん発生初期に発現やがん形質変化に関連するとされる因子で、2011年にHanahanとWeinbergによってレビューされた“がんのホールマーク(特徴)”との関連が未だ明らかになっていないもの数種を用いて検討した。 -2) -1)で遺伝子発現の増減によるgain/loss of functionや阻害剤を用いるなどして実験を行った。結果、標的とした因子により“がんのホールマーク”である細胞死誘導あるいは薬剤耐性、細胞移動能や細胞増殖などの能力に影響することが見出され、それに関与するいくつかの非コードRNA候補が挙がった。しかし、使用した細胞株によりその変化の大きさに差が生じ、症例間における共通項と多様性を因子とに分ける必要性が示唆された。

口腔扁平上皮癌特異的発現系ベクターの作製：がん促進がん促進性miRNAを捉えるRNA sponge発現系を試みるため、口腔扁平上皮癌特異的発現因子の5'上流域の単離を行い、これら因子の発現制御機構の解析を行った。内在性RNA spongeのプロモーター領域をPol-IIが認識するので、扁平上皮癌に特異的に発現するS100A7、p63やKRT17を標的として、それらのプロモーター領域を検索した。

その過程で、口腔扁平上皮癌において特異的発現を示すKRT17の機能解析ならびにその発現機構について一部明らかになった。KRT17を高発現する口腔扁平上皮癌細胞株においてKRT17の発現をノックダウンすると、残存細胞数の減少とcleaved caspase-3陽性細胞数の増加を認め、また同細胞株においてGLI-1およびGLI-2の機能を抑制させると、KRT17の発現抑制とアポトーシスの誘導が確認された。一方、この細胞数の減少は、KRT17の過剰発現により部分的に回復した。口腔扁平上皮癌におけるKRT17の発現がGLIを介した抗アポトーシス作用による腫瘍形成の促進が示唆された。

その他、癌形質に関与する因子やその制御機構に関して一部成果を得た。これらは、今後の検索の展開に寄与すると思われる。

次期研究では、現在注目される腫瘍内ヘテロ不均一性を鑑みると、内在性RNA spongeの

検索も癌化の基盤となり、共通項となるもの（腫瘍内ヘテロ不均一性でいわれる“founder”変異に相当するものと想定）や多様化に関わるもの（“progressor”変異に相当するものと想定）に分けての検討が必要と思われる。加えて、より厳密な口腔扁平上皮癌特異的発現制御機構の共通項および症例特異的解析によりどのようなシグナル伝達系が働いているかの解明が重要な課題となろう。このような検索から得られた問題点や改善点を踏まえて、さらに研究を展開していく。

#### 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 5 件）

Mikami Y, Fujii S, Nagata K, Wada H, Hasegawa K, Abe M, Yoshimoto RU, Kawano S, Nakamura S, Kiyoshima T.

GLI-mediated Keratin 17 expression promotes tumor cell growth through the anti-apoptotic function in oral squamous cell carcinomas.

J Cancer Res Clin Oncol. *in press* (2017)

DOI: 10.1007/s00432-017-2398-2.

Sakamoto T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Kaneko N, Hashiguchi Y, Hattori T, Tanaka S, Kitamura R, Kiyoshima T, Nakamura S.

Critical roles of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma and production of matrix metalloproteinase-2 via  $\Delta$ Np63 $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition.

Oral Oncol. 69: 15-25 (2017)

DOI: 10.1016/j.oraloncology.2017.03.019.

Kubota K, Moriyama M, Furukawa S, Rafiul HASM, Maruse Y, Jinno T, Tanaka A, Ohta M, Ishiguro N, Yamauchi M, Sakamoto M, Maehara T, Hayashida JN, Kawano S, Kiyoshima T, Nakamura S.

CD163+CD204+ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma.

Sci Rep. 7(1): 1755 (2017)

DOI: 10.1038/s41598-017-01661-z.

Hasegawa K, Wada H, Nagata K, Fujiwara H, Wada N, Someya H, Mikami Y, Sakai H, Kiyoshima T.

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) region gene 1 (FRG1) expression and possible function in mouse tooth germ development.

J Mol Histol. 47(4): 375-87 (2016).

DOI: 10.1007/s10735-016-9680-5.

Kawano S, Zheng Y, Oobu K, Matsubara R, Goto Y, Chikui T, Yoshitake T, Kiyoshima T, Jinno T, Maruse Y, Mitate E, Kitamura R, Tanaka H, Toyoshima T, Sugiura T, Nakamura S.

Clinicopathological evaluation of pre-operative chemoradiotherapy with S-1 as a treatment for locally advanced oral squamous cell carcinoma.

Oncol Lett. 11(5): 3369-3376 (2016)

DOI: org/10.3892/ol.2016.4411

〔学会発表〕（計 7 件）

Wada H, Hasegawa K, Nagata K, Wada N, Mikami Y, Sakai H, Kiyoshima T.

The expression pattern of the FRG1 in the mouse developing tooth germ.

The 95<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR

2017/3/22-25, Poster presentation

San Francisco, Calif (USA)

三上友理恵、清島保

GLI-KRT17 連関は口腔扁平上皮癌における腫瘍形成を促進する

第 93 回九大病理研究会

2016/12/19, 口頭発表

九州大学（福岡）

久保田恵吾、森山雅文、古川祥子、Haque A.S.M. Rafiul、丸瀬靖之、石黒乃理子、坂本瑞樹、川野真太郎、林田淳之介、太田美穂、清島保、中村誠司

口腔扁平上皮癌における免疫回避機構と腫瘍随伴性マクロファージとの関連

第 44 回日本臨床免疫学会総会

2016/9/8-10, 口頭発表

京王プラザホテル(東京)

三上友理恵、永田健吾、和田裕子、藤井慎介、安部みさき、吉本怜子、清島保、中村誠司

口腔扁平上皮癌において Gli 阻害剤(GANT61)は細胞死を誘導する

第 58 回歯科基礎医学会学術大会総会

2016/8/24-26, ポスター発表

札幌コンベンションセンター(北海道)

合島怜央奈、吉本怜子、曹愛琳、森啓輔、張旌旗、大崎康吉、壇上敦、清島保、城戸瑞穂

ヒト口腔癌細胞株における TRP チャネルの機能解析

第 58 回歯科基礎医学会学術大会総会

2016/8/24-26, ポスター発表

札幌コンベンションセンター(北海道)

久保田恵吾、森山雅文、古川祥子、丸瀬靖之、Rafiul Haque A.S.M.、石黒乃理子、坂本瑞樹、川野真太郎、清島保、中村誠司

口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における腫瘍随伴性マクロファージの関与

第 70 回日本口腔科学会学術集会

2016/4/15-17, 口頭発表

福岡国際会議場(福岡)

清島保、和田裕子

リガンド依存性受容体 DCC 蛋白による口腔扁平上皮癌へのアポトーシス誘導

第 57 回歯科基礎医学会学術大会総会

2015/9/11-13, 口頭発表(サテライトシンポジウム)

朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清島 保(KIYOSHIMA, Tamotsu)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号: 20264054

(2) 研究分担者

和田 裕子(WADA, Hiroko)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号: 70380706

永田 健吾(NAGATA, Kengo)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号: 90189134

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし