

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15744

研究課題名(和文) 口腔癌におけるceRNAの探索と病的意義の解明

研究課題名(英文) Identification of long non-coding RNAs potentially involved in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

西山 廣陽(Nishiyama, Koyo)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60749563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：TCGA(The Cancer Genome Atlas)のRNASeqデータベースを解析し、非癌部に比べて癌部で発現上昇を認めるlncRNAを14種類同定した。そのうち6種類のlncRNAを対象にsiRNAを用いたcell viability assayを行ったところ、発現抑制により増殖抑制を示すlncRNAを数種類認め、最も優位な差を認めたlncRNA5を最終候補とした。lncRNA5の発現抑制は口腔癌細胞の遊走、浸潤が阻害し、アポトーシスを誘導した。以上の結果よりlncRNA5は口腔癌の進展に寄与する可能性が示唆され、その分子機構を明らかにするため更なる機能解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify long noncoding RNAs (lncRNAs) which play important roles in the development of oral squamous cell carcinoma (OSCC). By utilizing The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets, we identified 6 lncRNAs which are overexpressed in OSCC. We validated the expression of the lncRNAs in a panel of OSCC cell lines by qRT-PCR. We next performed knockdown experiments of the 6 lncRNAs in OSCC cells, and assessed the cell viabilities. We identified that depletion of a lncRNA (lncRNA5) significantly prohibited OSCC cell proliferation in vitro and in vivo, indicating its oncogenic function. Flow cytometry analysis revealed that knockdown of lncRNA5 induced the G2 cell cycle arrest and apoptosis in OSCC cells. We also observed that depletion of lncRNA5 downregulated OSCC cell motility, migration and invasion. Finally, to evaluate the clinical relevance of these lncRNAs in OSCC, we determined whether the lncRNAs expression levels were correlated with patient prognosis.

研究分野：外科系歯学

キーワード：外科系歯学 臨床腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムが解読され、いわゆる遺伝子と呼ばれるタンパク質をコードする領域は全ゲノムの 2%以下しか存在しないことが明らかとなった。一方で精力的なトランスクリプトーム解析により、ゲノム領域の約 60%からは何らかの RNA が転写されていることが示され (Dunham, Nature, 2012)、その大半は長鎖非コード RNA (lncRNA) であると考えられている。mRNA と類似の構造を取りながらもタンパク質に翻訳されることのない lncRNA は、細胞・生命活動において重要な役割を担っている可能性があることが、ここ数年で次々と明らかになってきた。その機能の一つに miRNA に対してデコイ (おとり) あるいはスポンジとして働く機構が提唱されている。lncRNA もシード配列を有しており、mRNA と同様に miRNA の標的となりうる。つまり lncRNA が miRNA を消費することにより、本来の標的である mRNA に向かう miRNA が減少し脱抑制がかかるというものである (図 1)。近年この概念が拡大され、competing endogenous RNA (ceRNA) という非常に魅力的なコンセプトが提唱された (Salmena, Cell, 2011)。すなわち細胞内に存在する有限の miRNA を巡り、同じシード配列を有する複数の mRNA や lncRNA が互いに競合し、奪い合うというイメージである (図 2)。結果として複数の RNA 同士がひとつの miRNA を介して間接的に調節し合うことになる。これまでの転写因子を中心とした遺伝子発現制御とは次元の異なる調節機構であり興味深い。しかし ceRNA の概念の検証は未だ進んでおらず、これは現実を反映している概念なのか、癌における発現異常にどの程度寄与するのか、に関してほとんど分かっていない。そこで本研究では、口腔癌の臨床検体において ceRNA というコンセプトの検証を行うこととした。

### 2. 研究の目的

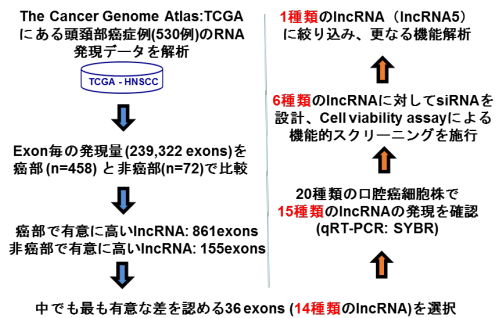
長鎖非コード RNA の細胞・生命活動における重要性が、ここ数年で次々と明らかになってきた。さらには competing endogenous RNA (ceRNA)、すなわち「miRNA を介した RNA 同士の制御機構」という極めて斬新で魅力的な概念が提唱され、「RNA ワールド」の新しい側面が見えつつある。しかし、この ceRNA というコンセプトの検証は未だ進んでおらず、特に癌における ceRNA の概念の正当性や機能的意義に関してはほとんど分かっていない。本研究は口腔癌を対象として ceRNA のコンセプトの正当性を検証し、口腔癌におけるその機能的・病的意義を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

まず TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースで公開されている RNASeq データの解

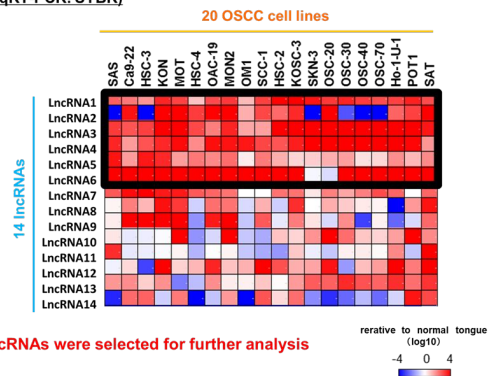
析を行い、非癌部に比べて癌部で有意に発現上昇を認める 14 種類の lncRNA を同定した。次に OSCC 細胞株での実際の発現レベルを定量 RT-PCR で検証し特に発現が高い 6 種類の lncRNA に対して siRNA を設計し、cell viability assay による機能的スクリーニングを行った。その結果、最も細胞増殖を抑制した lncRNA を対象に更なる機能解析を施行した。本研究の流れについて以下の図に示す。

#### 本研究の流れ



### 4. 研究成果

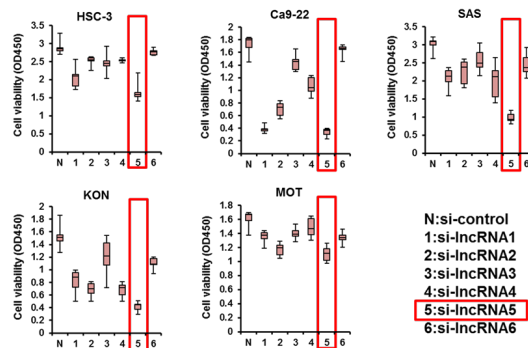
口腔癌細胞株における 14 種類の lncRNA の舌に対する発現比を定量 RT-PCR で検証した。  
口腔癌細胞株を用いた 14 種類の lncRNA 発現検証 (qRT-PCR: SYBR)



その中で特に発現が亢進していた 6 種類の lncRNA に対して siRNA を設計し、cell viability assay による機能的スクリーニングを行った。その結果 lncRNA5 の発現抑制が最も口腔癌細胞の増殖を抑制した。

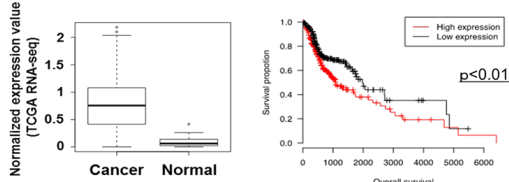
#### 6 種類の lncRNA 発現抑制が細胞増殖に与える影響を検証

5 種類の癌細胞株を用いた cell viability assay (siRNA 導入後 96 時間)



また lncRNA5 の発現量と予後との関係を検証した結果、高発現群では予後不良であった。

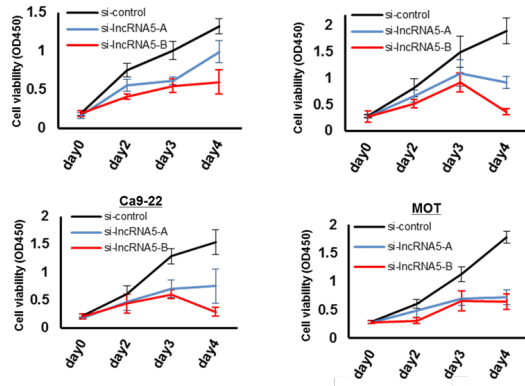
lncRNA5の発現量と予後との相関を検証(TCGA dataets)



そこで lncRNA5 を最終候補とし実験を進めた。まず2種類の siRNA を設計し lncRNA5 の発現抑制が口腔癌細胞の増殖へ与える影響を cell viability assay で検証した結果、4種類の口腔癌細胞株で増殖抑制が確認された。

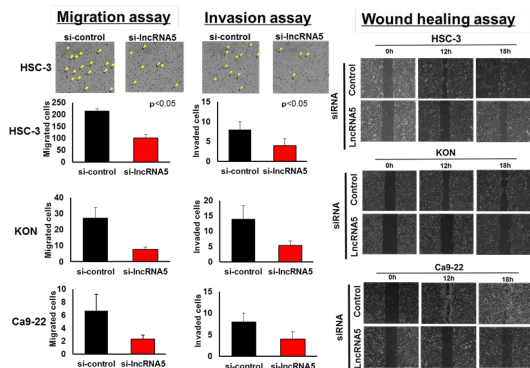
lncRNA5の発現抑制が癌細胞の増殖へ与える影響を検証

・4種類の口腔癌細胞株を用いた cell viability assay.



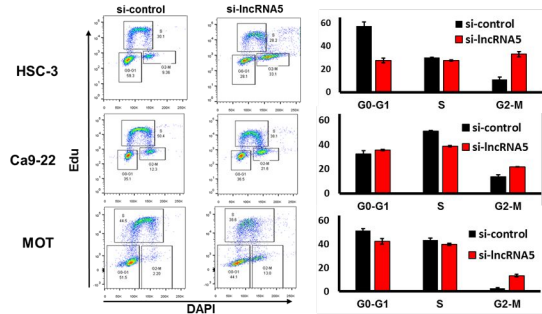
また lncRNA5 の発現抑制が癌細胞の遊走、浸潤に与える影響を migration assay, wound healing assay, invasion assay により3種類の口腔癌細胞株で検証したところ、lncRNA5 の発現抑制により癌細胞の遊走能、浸潤能が顕著に阻害された。

lncRNA5の発現抑制が癌細胞の遊走、浸潤へ与える影響を検証



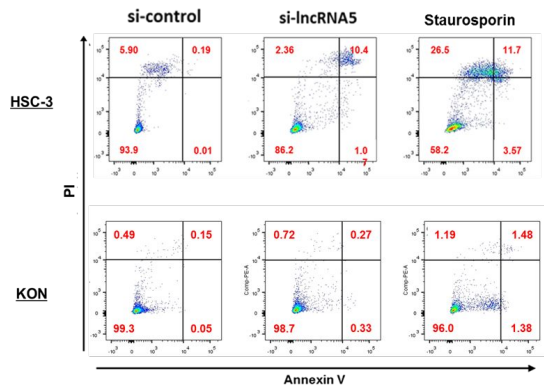
次に lncRNA5 の発現抑制が細胞周期へ与える影響を3種類の口腔癌細胞株でフローサイトメトリー解析により検証したところ、G2arrest を起こしていることが示唆された。

lncRNA5の発現抑制が細胞周期へ与える影響を検証(FACS)



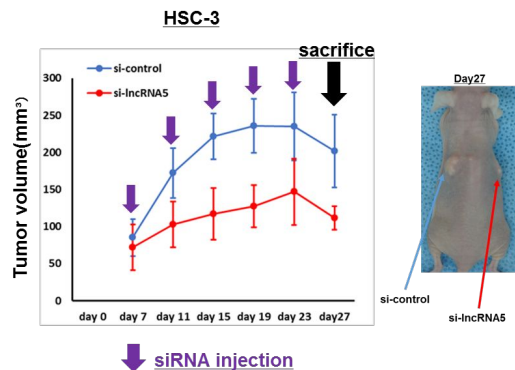
またフローサイトメトリー解析により lncRNA5 の発現抑制はアポトーシスを誘導することも明らかになった。

lncRNA-5の発現抑制がアポトーシスへ与える影響を検証(FACS)



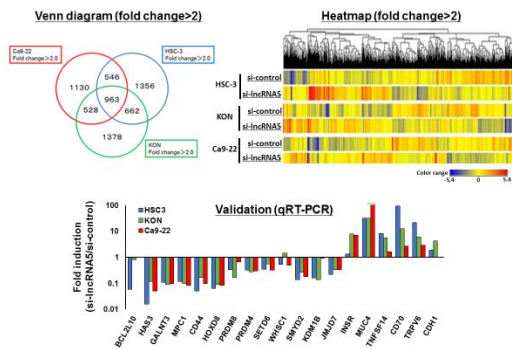
マウスゼノグラフトモデルを用いて、lncRNA5 の発現抑制が癌細胞の増殖へ与える影響を検証したところ、in vivo においても lncRNA5 の発現抑制により腫瘍の増殖が顕著に阻害された。

lncRNA-5の発現抑制が癌細胞の増殖へ与える影響を in vivo で検証

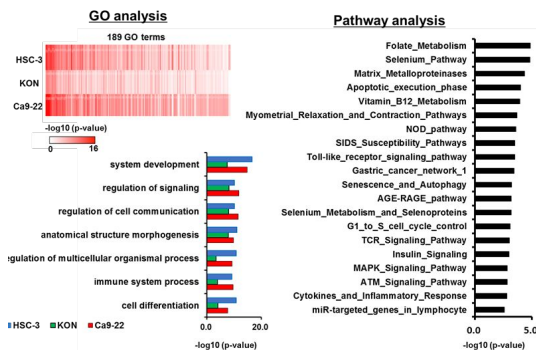


更に lncRNA5 の発現抑制により発現変動する遺伝子をマイクロアレイにより検証した。その結果、3種類の口腔癌細胞株に共通して

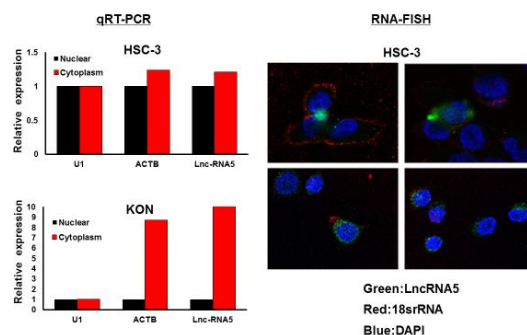
fold change>2 で発現変動する遺伝子が 963 遺伝子確認された。定量 RT-PCR により validation を行ったところ lncRNA5 の発現抑制により BCL2L10 や HAS3 といった、癌の進展に関与するいくつかの遺伝子の発現量が低下することが明らかとなった。



パスウェイ解析では lncRNA5 の発現抑制により、癌のパスウェイに関与する遺伝子群の発現変動が認められた。



次に口腔癌における lncRNA5 の分子生物学的作用機序解明のため、lncRNA の局在を検証したところ細胞質に局在している傾向が認められた。



lncRNA5 は細胞質に局在することから miRNA のデコイとして働き、ceRNA として機能する可能性が示唆された。そこで lncRNA5 の発現抑制により、発現上昇する miRNA を Taqman MicroRNA Array で検証し、候補 miRNA の validation を施行したが、候補 miRNA の発現量が極めて微量であり、再現性のあるデータ

を得ることができなかった。以上の結果より、詳細な分子生物学的機序の解明には至らなかったが、lncRNA5 は口腔癌において癌の進展に深く関与しうるがん遺伝子としての役割を有しており、治療標的としての可能性が示唆された。現在本研究課題の内容に関して論文執筆中であり、今後 lncRNA5 が転写因子等の機能性タンパクと結合して機能しうるかどうか検証を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等 〔学会発表〕(計3件)

1. Koyo nishiyama, Identification of long non-coding RNAs potentially involved in oral squamous cell carcinoma, 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月7日、神奈川県・横浜市・パシフィコ横浜

2. 西山 廣陽, Identification of long non-coding RNAs potentially involved in oral squamous cell carcinoma, 第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016年5月20日、大阪府豊中市・千里ライフサイエンスセンター

3. 西山廣陽, 口腔扁平上皮癌の発生や進展において重要な役割を果たす長鎖非コード RNA の同定, 第70回日本口腔科学会、2016年4月17日、福岡県・福岡市・福岡国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西山 廣陽 (Nishiyama Koyo)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：60749563

### (2) 研究分担者

丸山 玲緒 (Maruyama Reo)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：60607985