

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20582

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における 血清 Exosomal miRNA の発現機能解析

研究課題名(英文) Expression and function of serum Exosomal miRNA in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

徳善 紀彦 (TOKUZEN, NORIHIKO)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

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)：口腔扁平上皮癌患者および健常者血清から Exosome miRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、口腔扁平上皮癌患者で3倍以上発現亢進する miRNA を33種類、3倍以上発現低下する miRNA を15種類同定している。その中でも、miR-6068 は最も著明に発現上昇しており、口腔扁平上皮癌細胞の培養上清中の Exosome miR-6068 も有意に発現上昇を認めた。発現低下する miRNA として Exosome miR-26a を同定した。また miR-26a は全血清中および口腔扁平上皮癌組織中でも有意に発現低下を認めた。

研究成果の概要(英文)：We performed the microRNA (miRNA) array analysis using serum exosome miRNAs obtained from oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients and healthy volunteers. As a result, we found that 33 miRNAs were significantly up-regulated and 15 miRNAs were down-regulated more than 3-fold changes in OSCC patients compared to healthy volunteers. Among these miRNAs, exosome miR-6068 was the most up-regulated in OSCC patients. And exosome miR-6068 in the culture medium of OSCC cells also increased. We identified exosome miR-26a as a down-regulated miRNA in OSCC patients. In addition, the expression of miR-26a was also significantly decreased in whole serum and OSCC tissues. Furthermore, miR-26a significantly inhibited the growth of human OSCC cells. These results suggest that miR-26a has potential as a novel biomarker and therapeutic tool for OSCC patients.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔扁平上皮癌患 Exosome バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

最近、口腔癌を含む頭頸部癌のエクソームシーケンシングの結果が報告されたが、直接治療標的となるような分子に変異はほとんど認められず、治療成績を向上させるためには予防や早期発見が重要であることが示唆された (Agrawal N, et al. Science 333:1154-1157,2011)。しかし、口腔扁平上皮癌では血清 SCC 抗原が腫瘍マーカーとして用いられるが、感度が低く、早期癌においては偽陰性症例となる症例も多い(吉田英彦ら、「口腔癌診断に対する血清 SCC 抗原測定の意味。」癌と化学療法 11: 3595-3601, 1989)。そのため、口腔扁平上皮癌、特に早期癌診断の感度、特異度の高い腫瘍マーカーが必要である。Exosome は細胞から分泌された脂質二重で形成される直径 40nm~100nm 程度の小胞であり、脂質二重膜中に蛋白質や DNA などの核酸分子が含まれている。これらの蛋白質や核酸分子が Exosome により、運搬されることから癌細胞と周辺細胞のコミュニケーションとしての役割を担い、癌の悪性化、転移に重要な役割を果たしている事が明らかになってきた (Kosaka N, et al. J Bio Chem. 23: 17442-17452,2010) (Peinado H, et al. Nat Med 6: 883-891, 2012)。近年、Exosome が様々な癌腫におけるバイオマーカーとしての着目されている。また、血液中の Exosome microRNA も様々な癌種において有用なバイオマーカーとなり得るとの報告が散見される。microRNA (miRNA) は 18~25 塩基からなる小分子 RNA で、標的 mRNA に結合することで、その蛋白質への翻訳を阻害する。現在までに 1,996 種類のヒト miRNA がデータベース (miRBase Ver.21) に登録されており、これら miRNA の発現あるいは機能異常が癌を含め種々の疾患に関与していることが明らかにされている。結腸癌においては Exosome 中の let-7a、miR-1229、miR-1246、miR-150、miR-21、miR-223、miR-23 は過剰発現しており、既存の腫瘍マーカーである CEA および CA19-9 と比較し、良好な感度、特異度を認めた。またこれらの Exosome miRNA は手術の前後で発現変動を認めており、バイオマーカーとしての可能性が示唆されている (Ogata-Kawata H, et al. PLoS ONE 4: e92921, 2014)。再発した大腸癌の血清中では Exosome miR-19a が予後予測のマーカーとして有用であると報告されている (Matsumura T, et al. Br J Cancer 2: 275-281, 2015)。このように Exosome および Exosome miRNA は有用なバイオマーカーとなり得る可能性を有している。

### 2. 研究の目的

本研究では健常者、口腔扁平上皮癌患者由来の血清およびヒト口腔扁平上皮癌細胞の培養上清から Exosome miRNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、口腔扁平上皮癌患者の血清および培養上清に

おいて有意に発現変動する Exosome miRNA を同定し、口腔扁平上皮癌の新規バイオマーカー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

口腔扁平上皮癌で発現変動する Exosomal miRNA の網羅的探索

口腔扁平上皮癌患者および健常者の血清 3ml およびヒト不死化角化細胞株 (HaCaT) とヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (GFP-SAS, Ca9-22, HSC2, HSC3) の培養上清 10ml より exoRNeasy Serum/Plasma Maxi kit (QIAGEN) を用いて Exosomal miRNA を抽出する。抽出した miRNA を Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) で蛍光定量を行い、Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix) を用いてマイクロアレイ解析を行う。マイクロアレイ解析の結果、口腔扁平上皮癌患者血清および口腔癌細胞株の培養上清で共通して発現変動を認める miRNA を探索する。次に新たに口腔癌患者 (70 名)、健常者 (30 名) の血清 500µl より exoRNeasy Serum/Plasma Midi kit (QIAGEN) を用いて miRNA を抽出し、定量を行う。抽出前に外来性内部標準として合成センチュウ miR-39 (Qiagen) を検体に添加しておく。血清 Exosomal miRNA の存在量を miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) を用いてリアルタイム定量化 RT-PCR 法にて定量する。健常者と比較して治療前の口腔癌患者において存在量が明らかに変化する miRNA を抽出し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株で共通して有意に発現変動する miRNA をバイオマーカーとして同定する。

同定した Exosomal miRNA のバイオマーカーとしての有用性

同定した miRNA の発現をもとに受信者操作特性 (ROC) 曲線を描画し、カットオフポイントの設定を行い、口腔扁平上皮癌検出の感度、特異度について既存の腫瘍マーカーである血清 SCC 抗原と比較検討を行う。

ヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いた miRNA 機能解析

模倣型合成 miRNA をそれぞれ 20 nM の濃度で Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用いてヒト口腔扁平上皮癌細胞にリバーストランスフェクションする。成核酸導入後 72 時間培養した後に Dojindo 社製の WST-8 にて細胞数を定量することにより細胞増殖への影響について評価を行う。

### 4. 研究成果

○Exosome miRNA の同定

口腔扁平上皮癌患者および健常者血清から Exosome miRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、口腔扁平上皮癌患

者で 3 倍以上発現亢進する miRNA を 33 種類、3 倍以上発現低下する miRNA を 15 種類同定した。miR-6068 は最も著明に発現上昇していた。なお、口腔扁平上皮癌細胞の培養上清中の Exosome miR-6068 も有意に発現上昇を認めた (図 1)。

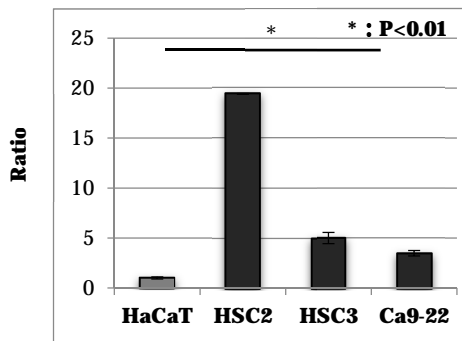
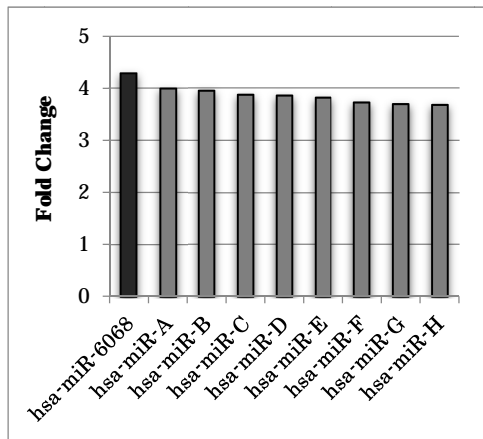


図 1 血清および培養上清における Exosome miR-6068 の発現

マイクロアレイ解析の結果をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて口腔扁平上皮癌患者と健常者由来の血清 Exosome miR-6068 の発現を検討した。その結果、口腔扁平上皮癌患者由来の血清 Exosome miR-6068 の発現上昇を認めた (図 2)。しかしながら、リアルタイム定量 RT-PCR では発現量が低く、デジタル PCR での検討が必要であるとされた。

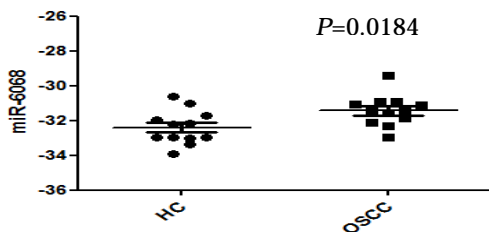


図 2 血清 Exosome miR-6068 の発現

miR-6068 以外の候補 Exosome miRNA として健常者と比較し、口腔扁平上皮癌患者で発現低下する miRNA として Exosome miR-26a を同定した。口腔扁平上皮癌患者と健常者由来

の血清 Exosome miR-26a の発現をリアルタイム定量 RT-PCR で検討を行ったところ、健常者と比較し、口腔扁平上皮癌患者由来の血清 Exosome 中での発現低下を認めた (図 3)。

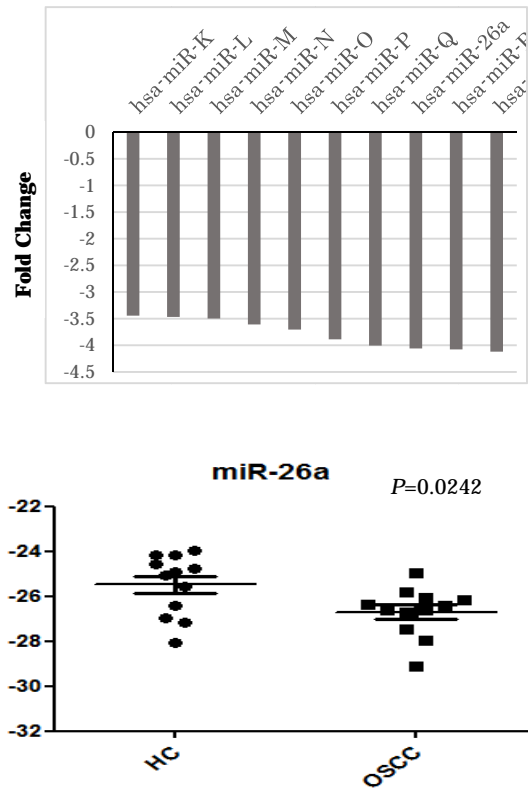
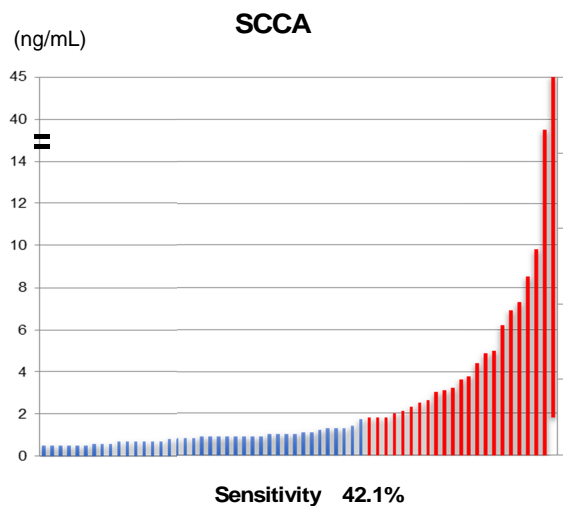


図 3 血清 Exosome miR-miR26a の発現

miR-26a は全血清中でも発現低下を認めている miRNA であり、全血清中の miR-26a は既存の腫瘍マーカーである SCC 抗原と比較した。SCC 抗原では感度が 42.1% であったのに対し、miR-26a は感度 70% であり、単一マーカーでも良好な感度を有していた (図 4)。



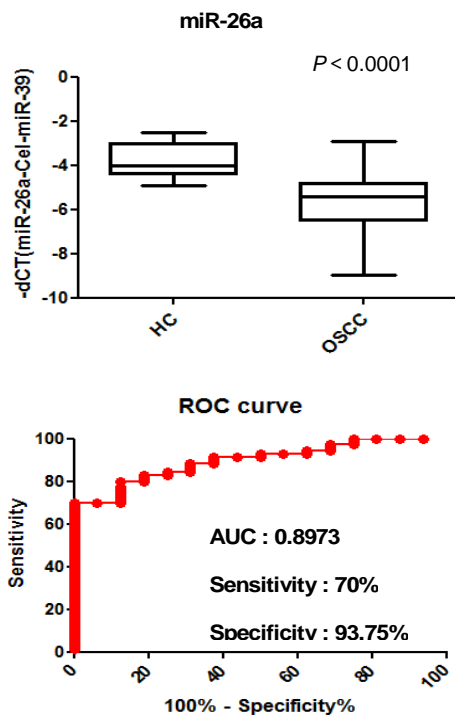


図 4 血清 SCCA と血清 miR-26a の診断精度比較

miR-26a の癌組織における発現を検討するために、同一患者由来の口腔扁平上皮癌組織および正常口腔粘膜組織における miR-26a の発現を qRT-PCR 比較検討を行った。その結果、正常口腔粘膜組織と比較し、口腔扁平上皮癌組織では miR-26a の有意な発現低下を認められた (図 5)。

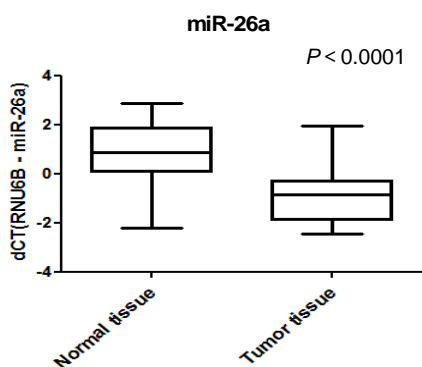


図 5 口腔扁平上皮癌組織における miR-26a の発現

模倣型合成 miR-26a を用いて、ヒト口腔扁平上皮癌細胞に与える影響について検討をおこなった。合成 miR-26a を 20nM の濃度で、Transfection reagent は RNAiMAX を用いて GFP-SAS 細胞に reverse transfection

した。導入後、72 時間後に WST-8 assay を行い、細胞増殖抑制効果を検討した。miR-26a を過剰発現することにより、25% の細胞増殖抑制効果を確認した (図 6)。

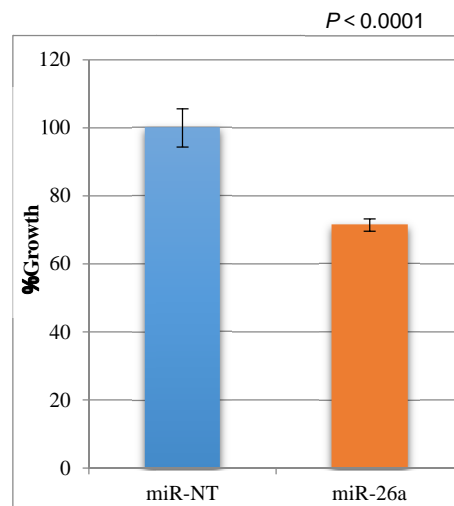


図 6 miR-26a における細胞増殖抑制効果

miR-26a は癌組織で発現低下を認め、過剰発現することにより、腫瘍の増殖を抑制していることから、腫瘍抑制型 miRNA としての機能を有していると考えられる。また、全血清中 miR-26a の発現低下を認めており、まだ十分な検討は行っていないが、血清 Exosome miR-26a も有用なバイオマーカーとしての可能性を有していると考えられる。この様に miR-26a はバイオマーカーだけでなく、治療標的となり得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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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・助教  
研究者番号：10723843