

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17109

研究課題名(和文) 唾液由来エクソソーム中のmiRNA解析による白板症の悪性化診断マーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of malignant markers from miRNA in salivary exosomes on leukoplakia

研究代表者

宮崎 裕明(Miyazaki, Hiroaki)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：70757781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では「唾液由来エクソソーム中のmiRNA解析による白板症の悪性化診断マーカーの同定」を目的として行った。具体的には、以下の研究を行った。

1) 唾液由来エクソソームおよびRNAの回収。2) 悪性化に伴い存在量が変動するmiRNAの同定。3) 候補miRNAの新規診断マーカーとしての有用性の検討。4) 組織切片を用いたマーカーの有用性の検討。

なお、本研究の詳細な結果は、後日、学術論文にて公表を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、口腔扁平上皮癌患者、および、その前癌病変である口腔白板症患者の唾液中のエクソソームに含まれる特異的なmiRNAを同定した。唾液は採取することが容易なサンプルであるため、口腔癌診断を一次医療機関の段階からスクリーニング検査にて行うことが可能となることが示唆された。このことは口腔外科領域における従来の癌診断システムを大きく飛躍させる結果となり、患者の予後の向上およびQOLの向上に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed at identification of malignant markers from miRNA in salivary exosomes on leukoplakia for clinical diagnosis. Concretely, we carried out the following experiments;

1) Collection of miRNAs from salivary exosomes. 2) Identification of miRNAs on glowing malignancy. 3) Investigation of candidate miRNAs as a novel diagnostic marker in vitro. 4) Investigation of candidate miRNAs as a novel diagnostic marker in vivo.

Subsequently, the detailed results of the present study are going to be publish as an original article, as soon as possible.

研究分野：口腔外科学

キーワード：エクソソーム miRNA 扁平上皮癌 白板症 唾液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

miRNA は約 22 塩基の非常に小さい non-coding RNA で、転写後翻訳レベルでの遺伝子発現制御を担っており様々な生命現象に影響を与えている。癌の分野においても、miRNA が癌の発生や進展に強く関わることを示されてきた。申請者らもこれまでに、乳癌細胞において miR-27b の発現低下あるいは欠損により抗癌剤耐性が誘導されること、さらには動物実験で miR-27b の発現が低下している細胞集団においては抗癌剤耐性だけでなく、腫瘍形成能が亢進することを報告しており miRNA が癌細胞の悪性化にかかわることを明らかとした。また、miRNA は細胞から分泌されるエクソソームと呼ばれる直径約 30-100nm の小胞顆粒に内包されていることが明らかにされ、さらにエクソソームを介して miRNA が癌細胞と周囲細胞とのコミュニケーションに関与していることが明らかになってきた。例えば、乳癌細胞が分泌したエクソソーム中に含まれる miR-181c は血液脳関門を破壊し癌細胞の脳転移を促進することが報告され、癌細胞から分泌されたエクソソームは周囲環境を癌が進展しやすい環境に変えていくことが示された。近年、新しい診断法の 1 つとしてリキッドバイオプシーの開発が進んでいる。これは腫瘍組織を採取する従来の生検に代えて、体液サンプルを用いて診断や治療効果予測を行う技術であり低侵襲な診断方法として注目を集めている。このような状況の中、miRNA とエクソソームは癌診断の分野においても重要性が見出されている。これまでに、舌癌患者の血漿中には miR-184 の発現量が増加しており口腔癌のバイオマーカーの 1 つとして有用性が検証されている。さらに最近ではエクソソームが様々な体液中に存在し、唾液中にも存在することが報告されている。また口腔癌患者の唾液中では miRNA-125a と miR-200a の存在量が減少していることが報告されており、口腔癌患者の唾液中のエクソソーム内には特有の miRNA 発現パターンが存在することが示唆され、唾液由来エクソソームに含まれる miRNA は新規癌診断のツールとしての可能性を秘めていると考えられる。上記のように癌の発生およびその進展にはエクソソーム中の miRNA が密接に関わっていることから、前癌病変である白板症から癌への悪性化に関与している miRNA も存在していると考えられる。したがって白板症患者の唾液由来エクソソーム中に悪性化に特異的に発現する miRNA パターンを明らかにすることが出来れば、唾液由来エクソソーム中の miRNA をターゲットとした超早期かつ低侵襲な新規診断法の開発につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究計画においては、舌扁平上皮癌の発生に関わる miRNA を唾液由来エクソソームから同定し、その miRNA の新規癌診断マーカーとしての可能性を明らかにすることを目的として、研究期間内に以下の項目を到達目標とした。具体的には以下のとおりである。

1) 白板症悪性化に関わる唾液由来エクソソーム中 miRNA の同定

マイクロアレイ解析にて、健常者と白板症患者および舌癌患者の唾液由来エクソソーム中の miRNA 発現プロファイル解析を行い、健常者に比べ悪性化と相関して発現量が変化した miRNA を同定した。

2) 新規癌診断マーカーとしての有用性の検討

健常者、白板症患者および舌癌患者の唾液サンプルを 20 症例ずつ追加し同定し、1) で同定した miRNA の存在量と悪性度との相関を検討した。さらに同一症例より血液サンプルを採取し血清由来エクソソームに含まれる miRNA の発現量との相関を検討する。最後に白板症と舌癌患者由来の組織を用いて、同定した miRNA によって制御されるタンパク質の発現を免疫染

色によって確認した。

3. 研究の方法

本研究計画では「唾液由来エクソソーム中の miRNA 解析による白板症の悪性化診断マーカーの同定」を目的として以下の実験項目を 2 年に渡り計画した。

- 1) 健常者、白板症患者および舌癌患者の唾液由来エクソソーム中 miRNA の存在量を解析した。
- 2) マイクロアレイにて健常者に比べて白板症患者から舌癌患者で段階的に存在量が変動している miRNA を悪性化に関与する miRNA の候補として同定した。
- 3) サンプル数を増加し候補 miRNA の診断マーカーとしての有用性を検証する。
- 4) 組織切片を用いて、miRNA によって制御されるタンパク質の発現を解析し悪性度との相関を検討した。

4. 研究成果

本研究によって、口腔扁平上皮癌患者、および、その前癌病変である口腔白板症患者の唾液中のエクソソームに含まれる特異的な miRNA を同定した(種類などの詳細は後日発表する学術論文で述べる予定である)。癌診断において、特に早期診断のための検査では、高い検出精度だけでなく患者への負担が少なく低コストな検査方法が求められる。唾液は血液と比較して安全で容易に取得できる体液であることから優れた診断材料であると考えられる。本研究では唾液由来のエクソソームに含まれる発癌に関わる miRNA の同定が期待されるためその結果は癌診断材料としての唾液の有用性を強力に支持することができると考えられる。また唾液は採取することが容易なサンプルであるため、口腔癌診断を一次医療機関の段階からスクリーニング検査にて行うことが可能となる。これは口腔外科領域における従来の癌診断システムを大きく飛躍させる結果となり、患者の予後の向上および QOL の向上に大きく貢献すると示唆された。

なお、本研究の詳細な結果は、後日、学術論文にて公表を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	代田 達夫 (Shirota Tastsuo)		
研究協力者	嶋根 俊和 (Shimane Toshikazu)		
研究協力者	椋代 義樹 (Mukudai Yoshiki)		
研究協力者	落谷 孝広 (Ochiya Takahiro)		
研究協力者	筑田 洵一郎 (Chikuda Junichiro)		