

令和元年5月31日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17295

研究課題名(和文)エクソソームを基盤とする口腔癌の新規診断及び治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel diagnosis and therapy based on exosome for oral carcinoma

研究代表者

篠塚 啓二 (SHINOZUKA, Keiji)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30431745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：正常口腔上皮細胞株と口腔癌細胞株について、マイクロアレイ解析の結果、癌細胞株で著明な発現変動を示し、口腔癌に関与していることが示唆される20種類のmicroRNAを同定した。さらに同定したmicroRNAとその標的遺伝子について検索をし、これらを用いてパスウェイ解析を行ったところ、miR-125bを中心としたネットワークが形成された。これらのネットワークは、Molecular Mechanisms of CancerやCell Cycle G1/S Checkpointなどに強く関連していた。このことから、口腔癌の発癌のメカニズムが明らかとなり、今後の診断・治療に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNA、DNAなどの物質を内包しているエクソソームは血液、尿、唾液、骨髄などさまざまな体液中で確認されており、比較的容易に採取できる。このエクソソームに含まれる分子を解析することで、低侵襲かつ効率的に疾患の診断を行える可能性がある。また、エクソソームは内包する物質がもつ総合的な効果で細胞の性質を変化させる性質をもつ点で、既存の治療薬とは全く概念が異なる。エクソソーム、microRNAによる遺伝子制御による診断・治療法の開発の報告ほとんどない。以上のことから、独創的で非常にインパクトが強い研究であり、全く新しいタイプの診断、治療法の開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed microRNA microarray analysis in human normal oral keratinocytes (HNOKs) and oral squamous cell carcinoma (OSCC)-derived cell lines. To identify networks of interacting genes, the expression status of the microRNAs were evaluated and the candidate genes and determined microRNAs were examined by using Ingenuity Pathway Analysis software. We identified candidate 20 microRNAs for molecular targeting. Our findings may contribute to an understanding of key biologic functions and pathways of certain microRNAs associated with OSCC, and the expression status of miR-125b may play an important role in the progression and prognosis of this disease. These networks were also associated with Molecular Mechanisms of Cancer and Cell Cycle: G1/S Checkpoint regulations. In addition, the differential expression status of miR-125b may provide insights into the process of tumorigenicity and for planning new treatment strategies.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 microRNA ネットワーク解析 microRNAアレイ解析 癌関連遺伝子 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がんをとりまく診断・治療体系がこの数年で大きく変革されつつある。例えば、診断においては、体液診断(リキッドバイオプシー)とよばれるこれまでの腫瘍マーカーの概念を覆す新しい診断システムが開発され、検診の場に導入されようとしている。がんの治療薬に関しても、新たな分子標的治療薬や免疫チェックポイントに作用する新薬が次々に臨床現場で使われるようになってきている。このような中で、血液、尿、唾液、骨髄などさまざまな体液中に存在するエクソソームはタンパク質、mRNA、microRNA(miRNA)、DNAなどの物質を脂質二重膜に内包して別の細胞に運搬する細胞間コミュニケーションツールとして働く。その生物学的意義を明らかにすることは疾患メカニズムの解明につながる可能性があり、大変注目されている。

また、がん細胞とその周辺に存在する細胞は、がんの悪性化に密接に関係しており、がんの本態解明とがん診断・治療への期待から多くの研究が進んでいる背景もある。これまで、がん細胞とその周辺細胞のコミュニケーションに関わる分子として、接着分子、細胞外基質のほか、さまざまな分泌因子が明らかにされてきた。分泌因子として、サイトカインやケモカインなどが同定されてきたが、がん細胞と周辺細胞の相互作用は非常に複雑であり、そのコミュニケーションを担う未知の因子の存在がいまだに示唆されている。最近、その新たなキープレイヤーにエクソソームが名のりを挙げた。

エクソソームはがんだけでなく、アルツハイマー病、心筋梗塞や脳梗塞、感染症など幅広い疾患の治療への応用も期待されている。また、miRNAは18-22塩基の小分子RNAの一種で、制御タンパク質複合体(RNA-induced silencing complex, RISC)と協調しつつ、相補的配列をもつ複数のターゲット遺伝子のmRNAと相互作用し、遺伝子の発現を抑制する事が知られている。

現在までに、膵癌や大腸癌では血清中で癌に特異的に発現しているエクソソーム内のmiRNAの存在を検出し、早期診断への可能性を報告したものもある。さらに術後の経過のモニタリングの有用性についても示唆されている。しかし、エクソソームを用いたmiRNAの口腔癌における発現、機能解析を行った研究はほとんど報告されておらず、明らかにされていない。

比較的容易に採取できるさまざまな体液中に存在する、エクソソームに含まれる分子を解析することで、低侵襲かつ効率的に疾患の診断を行える可能性がある。また、エクソソームはある1つの受容体や酵素を阻害するのではなく、内包する物質がもつ総合的な効果で細胞の性質を変化させる性質をもつ点で、既存の治療薬とは全く概念が異なる。このようなことから、全く新しいタイプの診断、治療法の開発に役立つものと考えられる。さらには、エクソソーム解析は遺伝子の発現を理解する大きなカギであり、疾患の発症を分子レベルで解明するための主要な役割を担っていると同時に、その標的遺伝子を解析し、さらに現在明らかになっていない発癌のメカニズム、遺伝子制御のメカニズムの発見となる可能性がある。

我々はこれまでに、miRNAアレイ技術を用いて、口腔癌患者由来の組織、ヒト口腔癌細胞株および正常組織におけるmiRNAの発現状態を網羅的に調べた結果、口腔癌におけるmiR-125bなどの癌制御miRNA遺伝子5種類、miR-199などの癌促進miRNA遺伝子を2種類同定している。

## 2. 研究の目的

本研究では、これらの同定したmiRNAの結果を進展させ、エクソソームを介して細胞外へ放出されているmiRNAの存在に着目し、病理組織でしか正確な評価ができなかった、口腔癌への分化の診断や血液マーカーや画像診断を組み合わせた口腔癌の診断に関しても、適切なmiRNAの発現パターンを用いることで正確な診断が可能であることを示す。これらにより、細

胞外へ放出されるエクソソーム含有 miRNA の存在意義、エクソソームの役割を明らかにし、このエクソソーム含有 miRNA をターゲットとした新たな癌治療戦略の開発を目指して研究を進展させることを目指している。このエクソソーム含有 miRNA をターゲットとすることで、非侵襲性で感度の高いバイオマーカーの確立を目指し、口腔癌患者の血清及び唾液中の miRNA を用いて新しい診断・治療予後マーカーを探索する。また、前癌病変や口腔癌患者における実際の miRNA の発現量や機能解析を行うことにより、発癌のメカニズムの解明や治療開発を目指すものである。

### 3．研究の方法

口腔癌由来細胞株、口腔正常粘膜細胞を用いて以下の実験を行う。

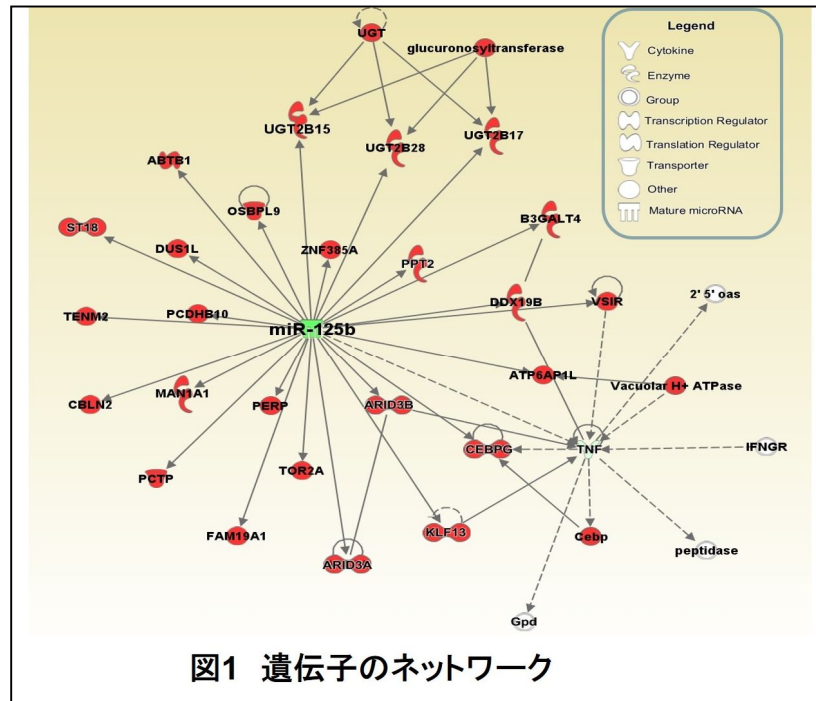
- (1) 口腔扁平上皮癌由来細胞株、口腔正常粘膜細胞の細胞株の上清(培地)から、それぞれエクソソームを回収する。
- (2) 回収したエクソソームから、エクソソーム内に含まれる miRNA (分泌型 miRNA) を抽出する。
- (3) 現在までに報告されているヒト miRNA を搭載したプローブを使用してマイクロアレイ解析を行う。
- (4) 本アレイを用いて口腔扁平上皮癌由来細胞株、口腔正常粘膜それぞれにおける miRNA の発現状態を網羅的に明らかにする。
- (5) 口腔癌細胞株で特異的な発現が認められる miRNA を選別する。
- (6) 同定された miRNA のターゲット遺伝子を検索し、その遺伝子に関して発現確認を確認する。
- (7) 同定された miRNA およびその標的遺伝子を用いて、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software を用いて、Ontology 解析を行い、癌関連遺伝子ネットワークの解析を行う。また、細胞周期、接着、タンパク分解、転写、翻訳といった癌関連経路のネットワーク解析も行う。これらを行うことで、miRNA に制御される遺伝子ネットワークが明らかになり、さらに発癌のメカニズムを解明する。

### 4．研究成果

本研究において、正常口腔粘膜上皮と口腔扁平上皮癌細胞株 4 種類 (HSC2, HSC3, Ca9-22, HO-1-N1) を用いて、現在までに報告されているヒト miRNA を搭載したプローブを使用してマイクロアレイ解析を行った結果、正常口腔粘膜上皮と比較して口腔扁平上皮癌細胞株 4 種類全てに共通して発現亢進を示した miRNA は 8 種類で、発現減弱を示した miRNA は 12 種類であり、癌細胞株で著明な発現変動を示し、口腔癌に関与していることが示唆される 20 種類の miRNA を同定した。

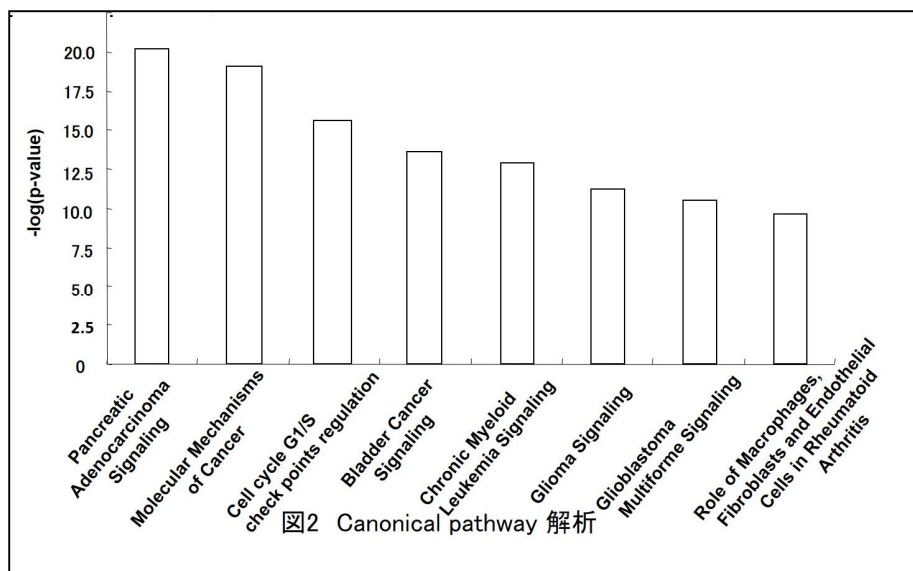
さらに同定した口腔癌関連 miRNA 20 種類とその標的遺伝子について検索をし、これらを用いてネットワーク解析を行ったところ、癌関連ネットワークに含まれる 11 種類の miRNA を認め、miR-125b を中心としたネットワークが形成された。(図 1)

また、ontology 解析を行った結果において、Function としては、Cell Death、Cellular Growth and



Proliferation に関与するネットワークである結果を得た。次に、Canonical pathway 解析を行い、本研究で得られた遺伝子リストと関連の深い既知のパスウェイを表示し、生物学的機能を予測した。Pancreatic Adenocarcinoma Signaling や Molecular Mechanisms of Cancer , Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation などに強く関連していた。( 図 2 )

我々の先行論文 ( Shiiba M, Shinozuka K et al. Br J Cancer 108(9):2013. ) の結果において、我々が報告した癌遺伝である intercellular adhesion molecule-2 (ICAM2)と強く相関がみられた



miR-125b に注目し、臨床検体における発現状態についても確認した。その結果、口腔癌 50 症例中 43 症例に miR-125b の発現抑制が確認された。次いで、臨床指標と miR-125b の発現との関連を調べたところ、腫瘍の大きさ、TNM ステージ分類及び予後との有意な相関が認められた。口腔癌細胞株 HSC2、HSC3 を用いて、miR-125b を遺伝子導入し、増殖能に関して検討を行った。その結果、miR-125b を過剰発現させた細胞株はコントロール群と比較して、増殖能が有意に抑制されていた。miR-125b は口腔癌において、発症・進展に重要な機能を有していると考えられ、今後の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての可能性が示唆された結果となり、報告

してきた、その結果と一致した。

以上より、同定した miRNA は口腔癌において、発癌・進展に重要な機能を有していると考えられ、miR-125b は今後の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての可能性が示唆された。

## 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〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。