

令和元年5月28日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19743

研究課題名(和文)末梢血・唾液中の癌関連miRNA吸着性環状RNAによる新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel strategy for molecular diagnosis/treatment via circular RNAs adsorbing cancer-associated miRNAs in peripheral blood and saliva from cancer patients

研究代表者

鷗澤 一弘 (UZAWA, Katsuhiko)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30302558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：環状RNAは特定のmiRNAの機能を調節することが最近になって明らかにされた。本研究では、癌抑制性環状RNAであるcirc\_102450を同定し、口腔癌細胞株での発現低下を認め、circ\_102450発現増強株での有意な増殖能および遊走能の亢進を認めた。患者の血液を用いて術前後のcirc\_102450の発現変動および転移の有無との相関を検証したところ、転移を認めた患者の術前血液中のcircRNA\_102450の発現が低くなる傾向を認めた。また、血液中のexosome中の環状RNAの発現を検証したところ、血液中およびexosome中のcirc\_102450の発現は同様の傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々は、ヒト正常口腔粘膜上皮細胞と比較して、口腔癌細胞株で発現の低下している癌抑制性環状RNA、circRNA\_102450を同定した。この環状RNAは口腔癌臨床検体においても有意な発現低下を認めており、本研究の結果はliquid biopsyの標的として有用となる可能性を秘めており、今後の実験においてこの環状RNAを人工合成することができれば癌細胞への取り込みを行うことで新たな癌治療開発の糸口になると期待できるのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recently, circular RNA is reported that it absorbs miRNAs resulting in the regulation of miRNA functions associating with tumorigenicity. In this study, we identify the oral carcinoma related circular RNA, circ\_102450, using CirRNA Array. Circ\_102450 expression was suppressed in Oral carcinoma cell lines. Over expression vector of circ\_102450 makes oral carcinoma cells strengthen those growing and migration activity. Digital PCR of patient's peripheral blood revealed that circ\_102450 expressed stronger in the non-metastasized patients than in the metastasized. These data suggested that the suppressed expression of circ\_102450 may be a noble and useful marker of tumor metastasis in the liquid biopsy using both tumor samples and peripheral blood.

研究分野：医歯薬学 歯学・外科系歯学

キーワード：環状RNA miRNA 腫瘍の増殖能 腫瘍の浸潤・転移能 digital PCR 新規癌抑制核酸医薬

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

### 1. 研究開始当初の背景

従来、末梢血や唾液を用いた癌スクリーニング法の開発研究は、唾液中のタンパクや、DNA・RNAなどの核酸を検出し、その中に疾患特異的タンパクや核酸の有無で判定するものが殆どであった。しかし、血液中や唾液中には多量の酵素や免疫機構があり、タンパクや核酸は分解されやすく良い状態で検出することが困難である。一方、エクソソームは脂質二重層に囲まれた細胞外小胞で、あらゆる細胞から分泌され、「自己」であるため免疫系からの攻撃を受けることもなく安定に循環していることが知られている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(30):10513-10518)。さらに、血液や唾液中に存在するエクソソーム内にタンパク質、核酸とともに circular RNA (環状 RNA) や microRNA (miRNA) といったいわゆる non-coding RNAs が存在していることも確認されており (Cell Res. 2015;25(8):981-4)、エクソソーム中のタンパク質とあわせてこれらの non-coding RNAs が proteinase や RNase の影響を受けず血中でも安定な状態で存在している。Non-coding RNA のひとつである環状 RNA は、すでに 1970 年代初頭に発見されていたものの、その機能については長い間解明されずにいた。図 1 のごとく、splicing 後の RNA において re-splicing が起こることにより環状 RNA が形成されることが報告されている (Wiley Interdiscip Rev RNA. 2015;6(5):563-79)。さらに、環状 RNA は生物界に広く存在し血液や唾液にも分布していることが確認されている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(20):7361-7366、Clin Chem. 2015; 61(1):221-230)。非常に興味深い知見として、環状 RNA は特定の miRNA を吸着するスポンジのような働きをし、miRNA の機能を調節することがごく最近になって明らかにされた (Nat Commun. 2016;6;7:11215)。このことは、環状 RNA により癌の進行・転移に関する miRNA の働きを抑制することで、癌の新たなバイオマーカーのみならず全く新しい治療標的として大いに期待が持たれているところである。

### 2. 研究の目的

本研究では口腔癌特異的環状 RNA による末梢血や唾液を用いた新規癌 liquid biopsy 法を開発し、さらにその中で癌抑制性環状 RNA による in vivo での効果を解析し、新たな癌治療法への応用を探索することを目的とする。検索同定し、これを搭載したエクソソームによる新規 drug delivery system の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 癌細胞における環状 RNA の検索

ヒト正常口腔粘膜上皮細胞と比較して、口腔癌細胞株で特に発現の低下している環状 RNA を同定する。このため、ヒト正常口腔粘膜上皮細胞と口腔癌細胞株より total RNA を抽出し、従来の RNA sequence 法に比べ簡便で網羅的な解析が可能である環状 RNA に特化した microarray chip による包括的発現解析をおこなう。

#### (2) 同定した環状 RNA の発現解析

同定した環状 RNA の口腔癌細胞株での発現を確認する。このため、特異的プライマーを設定し、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 法をおこなう。

#### (3) 同定した環状 RNA に関連する miRNA の検索

同定した環状 RNA に吸着する miRNA を同定する。これは、ルシフェラーゼアッセイによって同定する。

#### (4) 口腔癌特異的環状 RNA の口腔癌細胞株導入

細胞増殖能、浸潤能、遊走能の変化を確認する。このため、環状 RNA を核酸合成機により人工的に作製し、口腔癌細胞株に導入する。

#### (5) 臨床検体 (腫瘍組織・血液・唾液) における環状 RNA および miRNA の発現の変動

患者の血液・唾液および腫瘍組織を用いて、術前・術後における環状 RNA および miRNA の発現の変動を digital PCR 法を用いて確認し、さらに、臨床指標との相関関係を解析する。

#### (6) 患者の臨床検体のエクソソームに存在する環状 RNA の発現の変動の確認

患者の腫瘍組織中、および、術前・術後の血液・唾液中のエクソソームを抽出し、これらのエクソソームにおける環状 RNA および miRNA の発現の変動を確認し、臨床指標との相関関係を解析する

### 4. 研究成果

#### (1) 癌細胞における環状 RNA の検索

先の方法にて述べたとおりヒト正常口腔粘膜上皮細胞と口腔癌細胞株より total RNA を抽出し、包括的環状 RNA に特化した CircRNA Array による発現解析を行い、ヒト正常口腔粘膜上皮細胞と比較して、口腔癌細胞株において有意に発現の低下している環状 RNA、circ\_102450 を同定した。

#### (2) 同定した環状 RNA の発現解析

同定した circ\_102450 の口腔癌細胞株での発現状況を調べるため、環状 RNA に対する特異的 primer および Probe を作製し、RT-qPCR 法にて確認をした。(図1. 特異的 primer および probe の設計法)

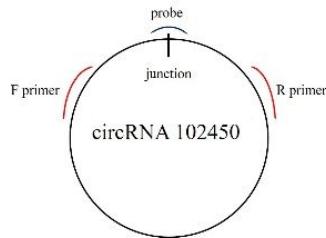


図1．特異的primerおよびprobeの設計法

結果はヒト正常口腔粘膜上皮細胞と比較して、口腔癌細胞株において、同定した環状RNAの有意な発現低下を認めた。( 図2．circRNA\_102450の口腔癌細胞株での発現解析 )

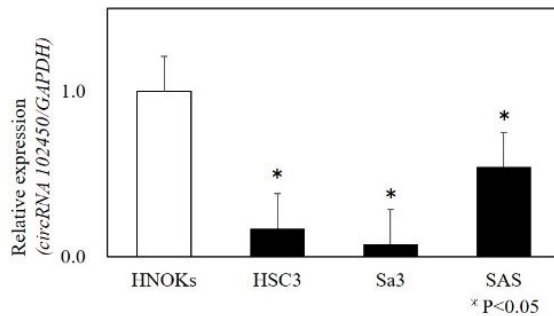


図2．circRNA\_102450 の口腔癌細胞株での発現解析

### ( 3 ) 同定した環状 RNA に関連する miRNA の検索

環状RNAに対し同定した環状RNAが吸着するmiRNAのうち、口腔癌に關与するものをわれわれの研究データや文献的検索による絞り込みを行った。( 表 1. circRNA\_102450 に吸着する miRNA の同定 )

	MRE	Reference(cancer)	Reference (non cancer)
circRNA-102450	<a href="#">hsa-miR-589-5p</a>	肝細胞癌	
	<a href="#">hsa-miR-744-5p</a>	非小細胞肺癌	
	<a href="#">hsa-miR-486-3p</a>	口腔扁平上皮癌 急性リンパ性白血病 膀胱癌 子宮頸癌 肺癌 甲状腺乳頭癌	帯状疱疹後神経痛 肥満 神経膠芽腫 急性冠症候群 再発性流産 肥大型心筋症 急性心筋梗塞
	<a href="#">hsa-miR-323a-5p</a>		てんかん
	<a href="#">hsa-miR-96-5p</a>	子宮癌	

表 1. circRNA\_102450 に吸着する miRNA の同定

結果は circRNA\_102450 に特異的に吸着する miRNA ( hsa-miR-589-5p、hsa-miR-744-5p、hsa-miR-486-3p、hsa-miR-323a-5p、hsa-miR-96-5p ) を同定した。さらに文献検索により has\_miR-486-3p は口腔癌の増殖、浸潤に關与していることがわかった。現在 circRNA\_102450 の塩基配列をルシフェラーゼベクターにトランスフェクションし、口腔癌細胞株に導入しており、mimic を用いて環状 RNA の吸着能を検証しているところである。

### ( 4 ) 口腔癌特異的環状 RNA の口腔癌細胞株導入

( 1 )より同定した circRNA\_102450 の人工合成を試みたが 200 塩基を超える環状 RNA の人工合成は困難であったため oe ベクターを作成し、エレクトロポレーション法を用いて口腔癌細胞株へトランスフェクションを行い、強制発現株を樹立し dd-PCR を用いて発現解析を行った。( 図 3 . dd-PCR を用いた発現解析 )

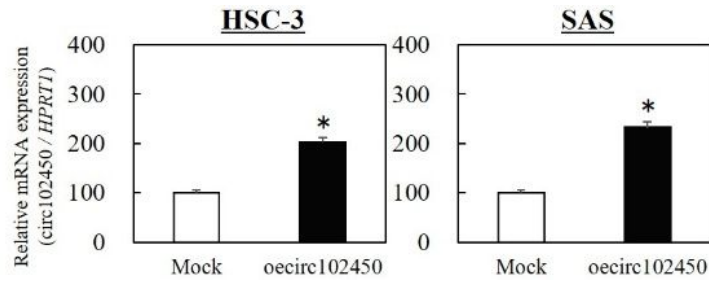


図 3 . dd-PCR を用いた発現解析

結果は口腔癌細胞株 (HSC-3、SAS) において circRNA\_102450 の有意な発現亢進を認め、circRNA\_102450 発現増強株の樹立を確認した (図 4 . circRNA\_102450 発現増強株の樹立)

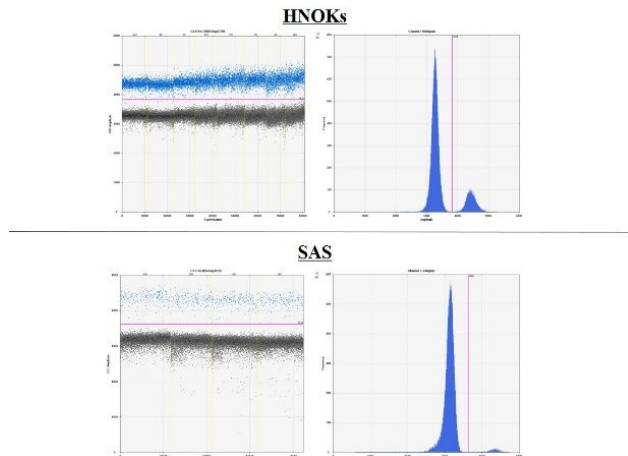


図 4 . circRNA\_102450 発現増強株の樹立

結果は口腔癌細胞株 (HSC-3、SAS) において circRNA\_102450 の有意な発現亢進を認め、circRNA\_102450 発現増強株の樹立を確認した。また、発現増強株樹立後細胞機能解析を行ったところ、Mock と比較し、発現増強株の有意な増殖能および遊走能の亢進を認めた。

(図 5、6 . circRNA\_102450 発現増強株における細胞増殖能および細胞遊走能試験)

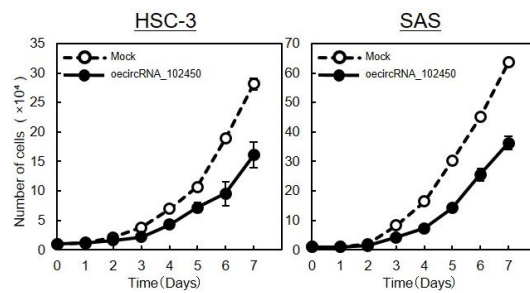


図 5 . circRNA\_102450 発現増強株における細胞増殖能試験

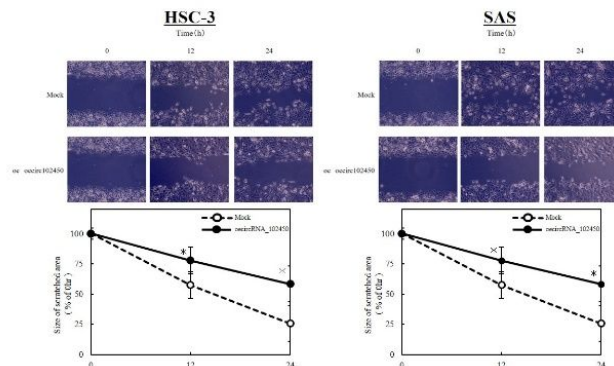


図 6 . circRNA\_102450 発現増強株における細胞遊走能試験

(5) 臨床検体 (腫瘍組織・血液・唾液) における環状 RNA および miRNA の発現の変動  
 患者の血液を用いて、術前・術後における環状 RNA の発現の変動を digital PCR 法を用いて確認した。

結果は臨床検体 6 検体において術後血液中の circRNA\_102450 の発現増強を認めた。

(図 7. 臨床検体における circRNA\_102450 の発現解析)

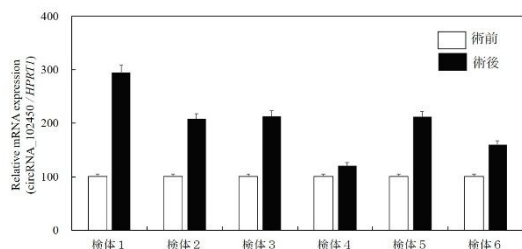


図 7. 臨床検体における circRNA\_102450 の発現解析

さらに転移の有無と circRNA\_102450 の発現を検証したところ、転移を認めた患者の術前血液中の circRNA\_102450 の発現は転移を認めなかった患者の術前血液中の発現と比較し、有意差を認めなかったものの、発現が低くなる傾向を認めた。(図 8. 転移の有無における術前 circRNA\_102450 の発現解析)

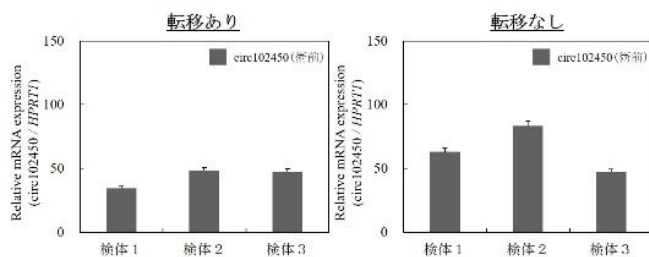


図 8. 転移の有無における術前 circRNA\_102450 の発現解析

(6) 患者の臨床検体のエクソソームに存在する環状 RNA の発現の変動の確認

さらに(5)で使用した患者の血液を用いて血液中のエクソソーム中に存在する環状 RNA の発現を検証したところ、術後エクソソーム中の circRNA\_102450 の発現増強を認めた。(図 9. エクソソーム中における circRNA\_102450 の発現解析)

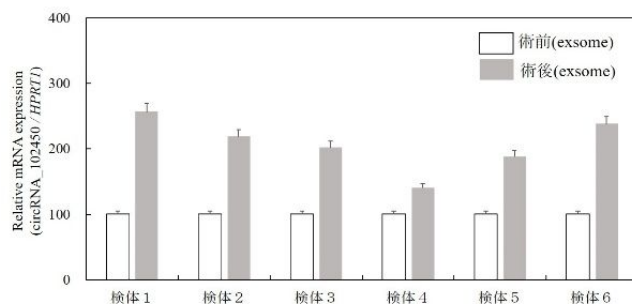


図 9. エクソソーム中における circRNA\_102450 の発現解析

さらに(5)と比較し血液中およびエクソソーム中に発現している circRNA\_102450 を解析したところ、臨床検体 6 検体すべてにおいて血液中および exosome 中の circ\_102450 の発現は似た傾向を示した。

(まとめ)

今回我々はヒト正常口腔粘膜上皮細胞と比較して、口腔癌細胞株で発現の低下している環状 RNA、circRNA\_102450 を同定した。

この環状 RNA は口腔癌臨床検体においても有意な発現低下を認めており、本研究の結果は liquid biopsy の標的として有用となる可能性を秘めており、今後の実験においてこの環状 RNA を人工合成することができれば癌細胞への取り込みを行うことで新たな癌治療開発の糸口になると期待できるのではないかと考える。

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〕

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：肥後 盛洋  
ローマ字氏名：HIGO Morihito  
所属研究機関名：千葉大学  
部局名：大学院医学研究院  
職名：特任研究員  
研究者番号(8桁)：60724383

研究分担者氏名：大和地 正信  
ローマ字氏名：YAMATOJI Masanobu  
所属研究機関名：千葉大学  
部局名：大学院医学研究院  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：70451747

### (2)研究協力者：なし

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。