

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390507

研究課題名（和文） 口腔悪性腫瘍における microRNA の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of microRNA in oral carcinoma.

研究代表者

椎葉 正史（SHIIBA MASASHI）

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20301096

研究成果の概要（和文）：

本研究において、口腔扁平上皮細胞癌における重要な役割を果たしている microRNA(miRNA)が存在するかどうかを検索し、もし存在する場合にはその機能と臨床的意義を明らかにすることを目的とした。まず、10 種類の口腔癌由来細胞株に関して miRNA microarray で解析を行い、その結果を、qRT-PCR 法で確認したところ、miR-196a が発現増強を示し、miR-125b, miR-222, let-7b and let-7c が発現減弱を示した。これらの miRNA の内、最も安定していた miR-125b に関して機能解析を行った。まず、臨床症例 50 サンプル中 43 サンプルで発現低下が明らかとなり、また、TNM 分類の T 因子、ならびに予後と強い相関を示した。さらに miR-125b を強制発現させたところ癌細胞の増殖が抑制された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to identify crucial microRNAs (miRNAs) in oral squamous cell carcinoma (OSCC), and to reveal their biological function and clinical significance. To clarify whether miRNAs are involved in OSCC, global screening using miRNA microarray analysis was performed with OSCC-derived cell lines. The altered expression profiling was validated by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis. MicroRNA microarray and real-time qRT-PCR analyses identified significantly up-regulated expression of miR-196a, and down-regulated expression of miR-125b, miR-222, let-7b and let-7c in OSCC-derived cell lines. Decreased expression of miR-125b was validated in 43 of 50 OSCC samples using real-time qRT-PCR and was revealed the association with cancer cell proliferation. This relationship was confirmed by sequential experiment using transfectants, in which expression of miR-125b was elevated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：microRNA、口腔癌、マイクロアレイ解析、癌関連遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムネットワーク研究は、DNA-RNA-タンパク間のゲノム情報の流れ、およびゲノム情報発現をネットワークとして捉えるプロジェクトである。ごく近年、このネットワークにおける non-coding RNA の機能に注目が集まっている。特に、microRNA は発生・分化や様々な器官における遺伝子サイレンシングへの関与が推定され、mRNA の発現量とタンパク発現量の乖離などの原因としても microRNA が重要視されている。また、ヒト疾患への関与も示唆されており、近年、癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子としても注目されている。現在までに、710 種類のヒト miRNA がゲノム中に存在することが明らかにされており (Sanger miRNA Base 10.0)、いくつかは、ヒト癌発生への関与が示唆された報告もある。しかし、口腔領域において、miRNA を用いた本格的な網羅的プロファイリングは報告されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、正常口腔粘膜上皮、口腔癌細胞株、口腔癌組織を用いて microRNA の発現状態を網羅的に検索し、口腔癌関連 microRNA を同定する。また、癌関連 microRNA の機能解析を行うことにより、口腔癌細胞における機能を明らかにする。このことにより、従来には存在しない、microRNA を用いた新しい治療法開発の可能性と分化制御への関与を検討する。

### 3. 研究の方法

口腔癌組織、口腔癌由来細胞株、口腔正常粘膜を用いて以下の実験を行う。

- 1) 口腔癌組織、口腔正常粘膜より total RNA を抽出する。
- 2) 抽出した total RNA から micro RNA が含まれる 21~23 塩基程度の大きさの small RNA を small RNA 抽出専用キットを用いて抽出する。
- 3) 現在報告されている 1083 種類 (インビトロジェン新規同定遺伝子 373 種類を含む) のヒト miRNA プローブを搭載した NCode™ Human miRNA Microarray V3 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癌組織、口腔正常粘膜それぞれにおける micro RNA の発現状態を網羅的に明らかにする。
- 5) 口腔癌組織で特異的な発現が認められる micro RNA を選別する (以後、口腔癌関連 micro RNA と記述する)。
- 6) 選別された micro RNA の口腔正常組

織、口腔癌組織における発現状態を real time PCR 法で定量、確認する。

- 7) 口腔癌組織において特異的な発現が確認された検体と、確認されなかった検体における、それぞれの臨床指標 (分化、進行度、リンパ節転移等) と micro RNA 発現状態とを比較して相関関係がみとめられる組み合わせを検討する。
- 8) 口腔癌細胞株を用いて、口腔癌関連 micro RNA を遺伝子導入し、機能解析を行う。

### 4. 研究成果

本研究において、正常口腔粘膜上皮 3 種類と口腔癌細胞株 11 種類 (HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22, KON, SCC4, OK92, OSC19, HO1N1, Sa3, H1) を用いて、ヒト miRNA1083 種類 (インビトロジェン新規同定遺伝子 373 種類を含む) のプローブを搭載した NCode™ Human miRNA Microarray V3 を使用してマイクロアレイ解析を行った。その結果を表に示す。

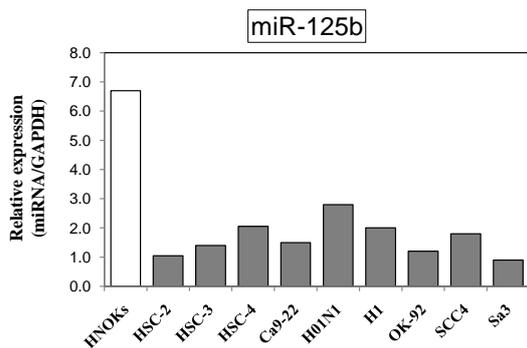
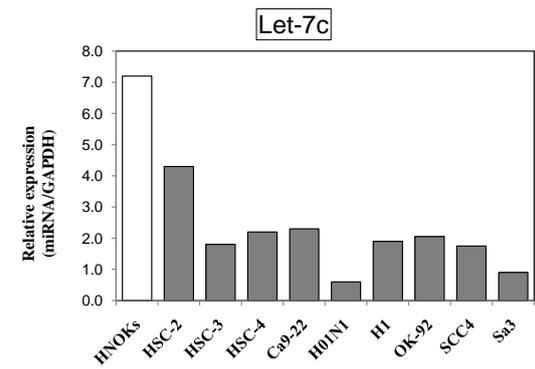
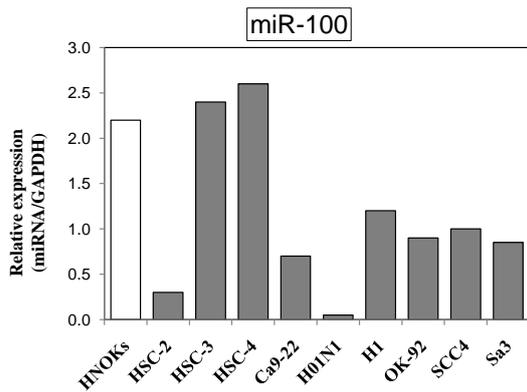
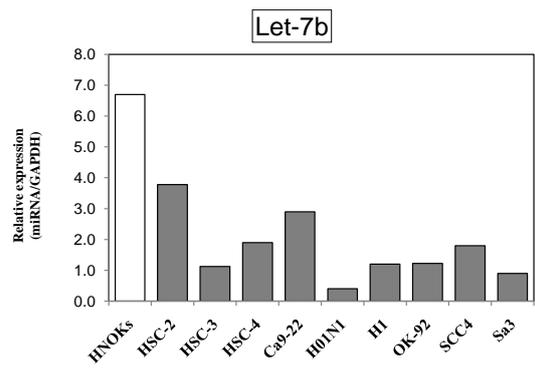
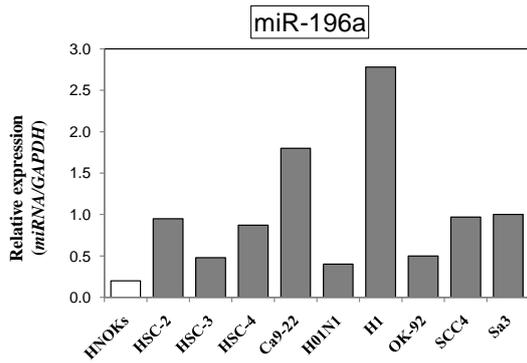
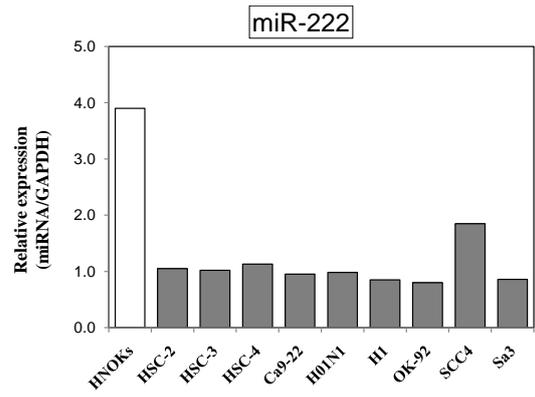
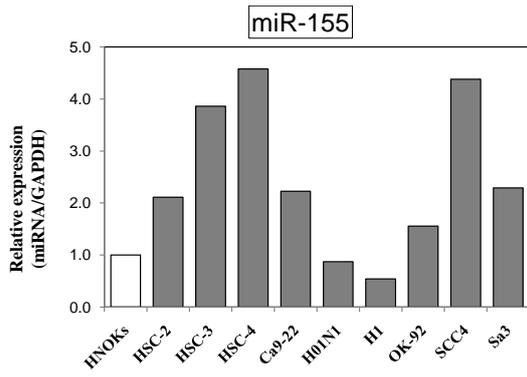
MicroRNA Microarray 解析結果

miRNA	OSCC-derived cell lines										
	HSC-2	HSC-3	HSC-4	Ca9-22	HO1N1	H1	OK-92	SCC-4	Sa3	KON	
hsa-miR-155	<b>2.11</b>	<b>3.86</b>	<b>4.58</b>	<b>2.23</b>	0.87	0.54	1.56	<b>4.38</b>	<b>2.29</b>	0.72	
hsa-miR-196a	<b>5.19</b>	1.90	<b>2.42</b>	<b>7.95</b>	1.37	<b>12.79</b>	1.40	<b>3.07</b>	<b>10.54</b>	<b>2.08</b>	

miRNA	OSCC-derived cell lines										
	HSC-2	HSC-3	HSC-4	Ca9-22	HO1N1	H1	OK-92	SCC-4	Sa3	KON	
hsa-miR-100	<b>0.30</b>	1.07	<b>0.33</b>	<b>0.45</b>	<b>0.15</b>	<b>0.47</b>	<b>0.26</b>	0.64	2.12	<b>0.46</b>	
hsa-miR-125b	<b>0.19</b>	<b>0.36</b>	<b>0.23</b>	<b>0.25</b>	<b>0.06</b>	1.82	<b>0.15</b>	<b>0.33</b>	0.51	<b>0.26</b>	
hsa-let-7b	1.13	<b>0.21</b>	<b>0.05</b>	<b>0.44</b>	<b>0.19</b>	<b>0.15</b>	<b>0.07</b>	<b>0.27</b>	0.59	<b>0.36</b>	
hsa-let-7c	1.37	<b>0.16</b>	<b>0.11</b>	0.63	<b>0.19</b>	1.09	<b>0.17</b>	<b>0.32</b>	<b>0.26</b>	<b>0.32</b>	
hsa-miR-222	<b>0.41</b>	<b>0.44</b>	<b>0.36</b>	<b>0.30</b>	<b>0.24</b>	1.66	<b>0.17</b>	1.13	3.54	0.56	

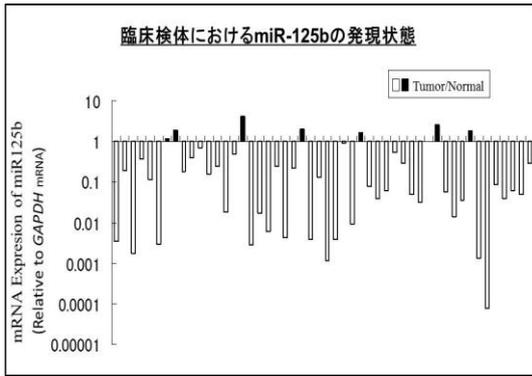
正常口腔粘膜上皮と比較して口腔癌細胞株で著明な発現変動を示し、口腔癌に関与していることが示唆される 13 種類の miRNA を同定した。そのうち、口腔癌細胞株で強発現していた miRNA は、miR-196a, miR-155 であった。一方、発現減弱していた miRNA は、IVGN-novel-miR\_3547, IVGN-novel-miR\_3345, miR-100, miR-125b, IVGN-novel-miR\_3673, IVGN-novel-miR\_3338, let-7c, let-7b, IVGN-novel-miR\_3617, miR-222, IVGN-novel-miR\_3353 であった。これらの miRNA について、プライマーを作製し real time PCR で発現状態の確認を行った。



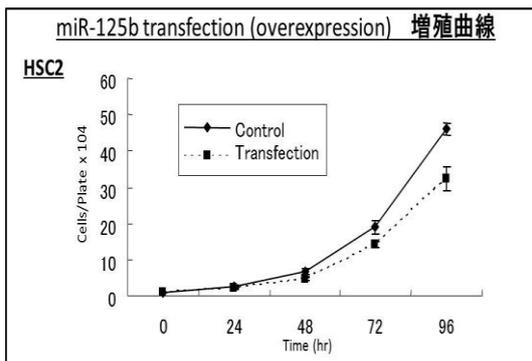
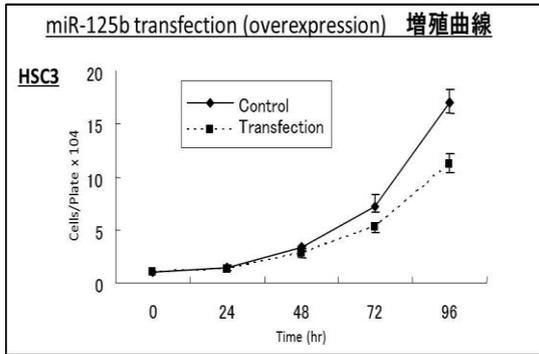
その結果、全ての細胞株において安定して顕著な発現変異状態を示したのは、miR-125b と miR-222 であり、両者とも正常口腔粘膜上皮と比較して、口腔癌細胞株で有意に発現減弱していることが確認できた。

そこで、miR-125b に注目した。臨床検体における miR-125b の発現状態について検討した。その結果、図に示すように、口腔癌 50 症例中 43 症例 (86%) に miR-125b の発現抑制が確認された。

また、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。このため、miR-125b は口腔癌の増殖、進展等に関与している可能性が考えられた。



そこで、miR-125b について、遺伝子学的に機能解析を行った。すなわち、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。



以上の結果から、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。

#### 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)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎葉正史 (SHIIBA MASASHI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20301096

(2) 研究分担者

横江秀隆 (YOKOE HIDETAKA)

防衛医科大学校・医学部・准教授

研究者番号：70261930

武川寛樹 (BUKAWA HIROKI)

筑波大学・医学部・教授

研究者番号：80173558

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：