

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592393

研究課題名（和文）ラット舌癌における miRNA 発現プロファイルとエピジェネティクス機構の
解明

研究課題名（英文）Analysis of miRNA expression profiles and mechanism of epigenetics
in rat tongue carcinogenesis

研究代表者

田沼 順一（JUN-ICHI TANUMA）

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：20305139

研究成果の概要（和文）：

本研究は miRNA 発現プロファイルによる miRNA の選抜、miRNA のエピジェネティクスな発現調節の解明、siRNA のラットおよび培養細胞へ導入による制御機構の解明を目的としたものである。新規に選抜された miRNA と今までに報告された miRNA を用いて解析中である。これらの結果より発現量に大きく差がみられた遺伝子を中心に、ジェネティックおよびエピジェネティックな発現制御機構の解析を実行した。

研究成果の概要（英文）：

Oral cancer is one of the most commonly diagnosed malignancies worldwide. Its dismal five-year survival rate of ~50% has barely changed for decades. A better understanding of the molecular basis of tumorigenesis - with particular emphasis on disease initiation and progression - is needed to improve clinical outcomes, since this will facilitate the development of drugs and management strategies based on the specific genetic changes underpinning disease behaviors. MicroRNAs (miRNAs), a class of short non-coding RNAs that down-regulate gene expression, have been demonstrated to play essential roles in human cancers. miRNA deregulation has been observed in many tumor types and is implicated in oncogenic cell processes, including proliferation, survival, apoptosis, metastasis, and chemoresistance. In addition, miRNA alterations have been associated with specific clinical phenotypes such as disease progression or recurrence, development of metastases, and post-operative survival. Recent studies have explored the utility of miRNAs as diagnostic and prognostic tools and as potential therapeutic targets. Herein, we discuss miRNA biology and provide a summary of the key findings on the role of miRNAs in rat tongue carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：ラット舌癌、miRNA

1. 研究開始当初の背景

miRNA 発現異常は様々な臓器のがんでは見出されており、発がんの発生・進展に極めて強く関与している報告がある。miRNA 発現は我々が確立しているマイクロアレイ法により網羅的に調べることは可能である。その成果として、病理組織学的諸性状や診断・治療と関連した miRNA を同定できる。今回は RNA と発がんの関わりを、この発がんモデルを用いて解析を実行することが、この頭頸部領域では、全く独創的な研究であり、従来の研究成果や実績からも、大いに期待できる特色・独創的なものである。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、舌癌の発生と進展過程に関わる RNA の研究、すなわち miRNA 発現プロファイルによる miRNA の選抜や miRNA のエピジェネティクスな発現調節の解明および siRNA の導入による制御機構の解明を目的としたものである。

(2) 舌がんモデル動物を用いて、前癌病変に関連する遺伝子の選抜と機能解析を行う。選抜された遺伝子（今回の研究は予備実験で見出した細胞増殖に関連する RNA 結合タンパク質 hnRNP K）による、前癌病変の病理組織や血清の腫瘍マーカーになる抗体の開発。

3. 研究の方法

(1) miRNA 発現プロファイルによる miRNA の選抜と発現解析：miRNA に対して特異性を持つ逆転写プライマーを用いて、個々の miRNA ごとに逆転写反応を行い、この反応により成熟型 miRNA を特異的に逆転写する。Loop 構造を持つ逆転写プライマー由来の配列が、特異性を持つリバープライマーとして機能するため、特異性を高めることが出来る。さらに TaqMan PreAmp Master Mix によりターゲットとする miRNA を特異的に検出できる。

(2) miRNA とメチル化：舌がん発生細胞または舌癌細胞株を用いて、DNA メチル化阻害剤である 5-Aza-Cd やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で処理し、高発現する miRNA を選択して、CpC アイランド領域に存在する miRNA は、異常によりその発現が抑制されていたのかを個々 RT-PCR 法により解析する。

(3) siRNA (RNAi 干渉) による発現解析：siRNA (RNAi 干渉) は通常の培養細胞による検討だけでなく、モデル動物に直接皮下や腹腔内に導入でき、ターゲット mRNA 分解によるノックダウンが容易に可能となるために、今回スクリーニングに使用する。

(4) RNA 結合タンパク質の一種であるリボヌクレオプロテイン K (hnRNP K) に着目し、粘膜上皮由来である舌癌においても hnRNP K が診断マーカーとして有用であることを、ラットおよびヒトの組織を用いて、分子生物学的、免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) miRNA 検出と定量的解析には TaqMan Assay と定量リアルタイム PCR を用います。アプライド社製 Step One plus Fast : Real time PCR 機器を使用し、miRNA に対して特異性を持つ逆転写プライマーを用いて、個々の miRNA ごとに逆転写反応を行い、この反応により成熟型 miRNA を特異的に逆転写する。さらに TaqMan PreAmp Master Mix によりターゲットとする miRNA を特異的に解析実行しました。

また、新規に選抜された miRNA と今までに報告された miRNA を用いて解析中であります。なお解析する遺伝子は以下の通りである。
 癌遺伝子 : miR-17-92, miR-21, miR-106a, nmiR-155/BIC, mir-221/222, miR-372/373
 癌抑制遺伝子 : let-7 family, miR-15a/16, miR-29, miR-34, mir=122a, miR-125b, miR-127

結果より、癌遺伝子20個のmiRNAの発現上昇が見られ、癌抑制遺伝子8個のmiRNA発現低下が見られた。

(2) hnRNP K はクロマチンの再形成や mRNA への転写後, mRNA と結合して核外への輸送, 修飾および翻訳に関係し、hnRNP K homology (KH) ドメインを3カ所有する RNA 結合タンパク質である。合成された直後の mRNA と結合して核と細胞質との間で往復輸送を行うため。

hnRNP K は核と細胞質の両方に存在している。Moumen らは hnRNP K の誘導は、特に

DNA 損傷時に反応して活性化されることを示唆しているが、本研究で明らかになった発癌剤 4NQO による DNA 損傷に対する hnRNP K タンパクの高発現は、それを裏付ける結果であり、上皮異形成や SCC において核が陽性を示したのは、核内において p53 と hnRNP K が共依存的に DNA 損傷部の修復を行い、転写を活性化させているためだと考えられる。相対定量的リアルタイム PCR 解析結果でも *hnRNP K* mRNA 量は有意に増加し、過形成および上皮異形成で hnRNP K タンパクが発現していた免疫染色結果を裏付けることができた。(図 1 - 5)



図1 発癌実験後のラット舌組織肉眼写真
 発癌実験後に抽出したラット舌組織の肉眼写真。過形成、上皮異形成状態を肉眼的に確認するのは困難である。SCCはカヘキシー状態となった110日で抽出した。

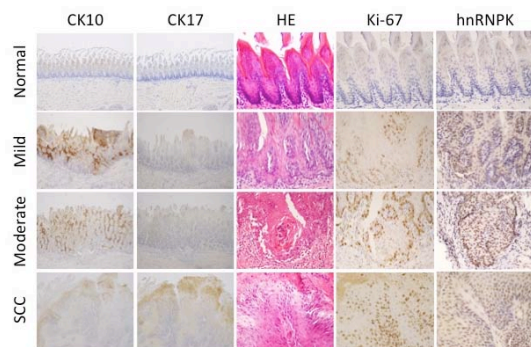


図2 ラット組織の免疫染色写真
 CK10, 17 (x10), HE, Ki-67, hnRNP K (x20)

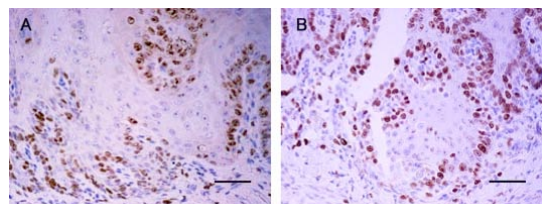


図3 Ki-67抗体の免疫染色写真
 A: Mild (x20), B: Moderate (x20), Scale bar = 100 μm
 Mildでは基底細胞層および傍基底細胞層の核に所々陽性像がみられた。
 Moderateでは基底細胞層および傍基底細胞層の核に数多くの陽性像、細胞異型がみられた。

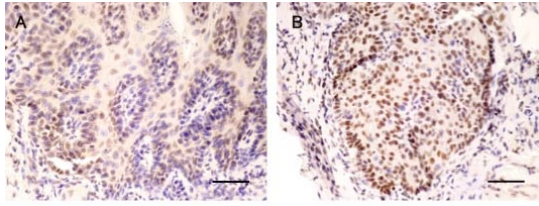


図4 hnRNPK抗体の免疫染色写真

A: Mild (x20), B: Moderate (x20), Scale bar = 100 μm

Mildでは基底細胞層の核に陽性像、上皮細胞の細胞質に弱陽性像がみられた。Moderateでは上皮全層の核に強陽性像、細胞質に陽性像がみられた。

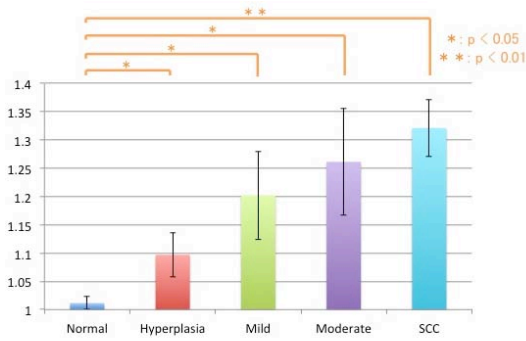


図5 リアルタイムPCR解析によるhnRNPK mRNA発現量

データの有意性は検定を用いて確認した。Normal群との間に1% (***)あるいは5% (*)の危険率でそれぞれ有意差がみられた。バーは標準誤差を示す。

(3) 様々なタイプの癌において hnRNPK が高発現することは、hnRNPK と p53 の関係性より明らかである。発癌については多数の遺伝子が関与すると考えられており、舌粘膜の上皮異形成や癌も多因子疾患である。個々の遺伝子が単独で発癌に与える影響は大きいものとはいえないが、hnRNPK だけでなく一つ一つの活性タンパクの遺伝子を解析し、詳細なメカニズムを知ることが発癌の基礎的理解および癌治療に繋がると考える、その為、特定の癌に対して感受性を持つモデル動物を用い、遺伝子解析および組織学的解析を行うことは、個々の癌関連遺伝子を考察する上での優れた方法であると考える。(図6 - 10)

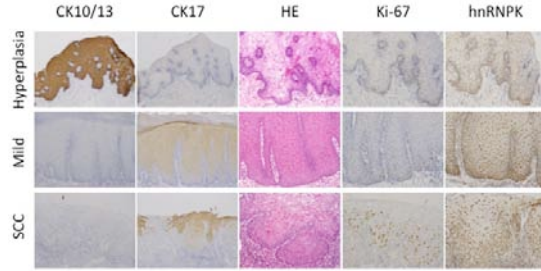


図6 ヒト組織の免疫染色写真

CK10, 17 (x10), HE, Ki-67, hnRNPK (x20)

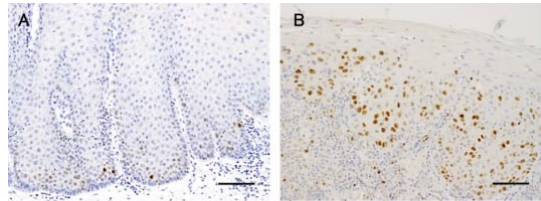


図7 Ki-67抗体の免疫染色写真

A: Mild (x20), B: SCC (x20), Scale bar = 100 μm

Mildでは傍基底細胞層の核に所々陽性像がみられた。SCCでは基底細胞層、傍基底細胞層および有棘細胞層の核に数多くの陽性像、細胞異型がみられた。

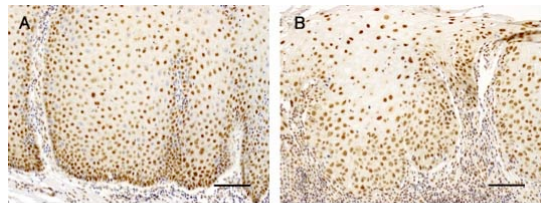


図8 hnRNPK抗体の免疫染色写真

A: Mild (x20), B: SCC (x20), Scale bar = 100 μm

Mildでは上皮全層の核に陽性像、特に基底細胞層の核に強陽性像がみられた。SCCでは上皮全層の核に陽性像、上部の核により強い陽性像がみられた。

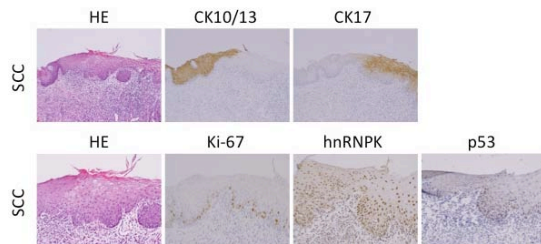


図9 p53抗体に陽性を示したヒト組織の免疫染色写真

上段: HE, CK10/13, CK17 (x10), 下段: HE, Ki-67, hnRNPK, p53 (x20)

上段はSCCと上皮異形成の境界部、下段は境界中心部を拡大した写真である。

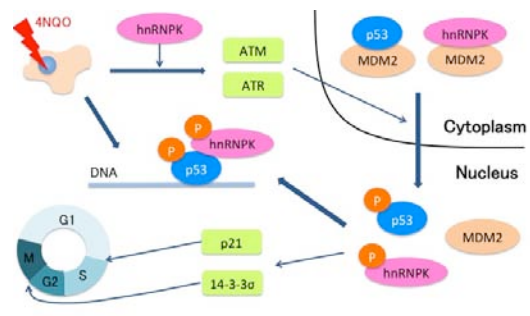


図10 hnRNPKの経路図

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3件)

(1) Tanuma J, Izumo T, Hirano M, Oyazato Y, Horii F, Umemura E, Shisa H, Hiai H, Kitano M. : *FGFR4* polymorphism, *TP53* mutation, and their combinations are prognostic factors for oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, (査読有) 23: 739-744, 2010.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20127014>

(2) Matsui R, Tanuma J, Kwashima K, Miyahara M, Semba I, Sugihara K. : Basaloid squamous cell carcinoma of the tongue: a case report. *Oral Medicine & Oral Pathology*, (査読有) 15: 117-122, 2011. <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/omp>

(3) Sakano Y, Tanuma J. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a new marker of early detection for 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis. 岐阜歯科学会, (査読有) 39(1), 1-5, 2012. <http://scw.asahi-u.ac.jp/%7Egifusika/index.htm>

[学会発表] (計8件)

(1) 田沼順一 : The combination of the *FGFR4* and *TP53* is prognostic factors for oral squamous cell carcinoma. 第52回歯科基礎医学会学術総会, 東京, 2010年9月21日(口演)

(2) 八代耕児、高山英次、神谷真子、亀山泰永、永山元彦、田沼順一、近藤信夫 : イソプロテレノール投与による唾液腺の細胞増殖

とエノラーゼ3遺伝子発現増強の経日変化
第52回日本歯科基礎学会総会, 東京, 2010年9月21日 (ポスター)

(3) Tanuma J : Genetic and epigenetic alterations of the susceptibility genes for 4NQO-induced tongue carcinogenesis in the rats. 岐阜歯科学会, 岐阜, 2010年10月23日 (口演)

(4) 田沼順一 : The combination of the *FGFR4* and *TP53* is prognostic factors for oral squamous cell carcinoma. 第100回日本病理学会総会, 横浜, 2011年4月29日(口演)

(5) 永山元彦、江原道子、田沼順一 : A case of odontogenic tumor. 第22回日本臨床口腔病理学会, 福岡, 2011年8月25日(口演)

(6) 田沼順一 : 歯科基礎医学教育の分野間における現状とその問題点. 第53回日本歯科基礎学会総会シンポジウム, 岐阜, 2011年10月1日(口演)

(7) 坂野美栄、永山元彦、江原道子、志佐湊、北野元生、日合弘、田沼順一 : hnRNP K と 4NQO 誘発ラット舌癌の前癌病変との関連. 第70回日本癌学会総会, 名古屋, 2011年10月5日 (English Oral Session)

(8) 太田 貴久、田沼順一、式守道夫 : 原発性骨内扁平上皮癌の一例, 第30回日本口腔腫瘍学会総会, 埼玉, 2012年1月27日(口演)

[図書] (計1件)

(1) 武藤晋也、田沼順一, 他: 医歯薬出版、
日常臨床の疑問に答えます Q&A70、2012、180

[その他]

ホームページ等

<http://scw.asahi-u.ac.jp/~patho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田沼 順一 (JUN-ICHI TANUMA)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号: 20305139

(2) 研究分担者

仙波 伊知郎 (ICHIRO SEMBA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 60145505

(3) 連携研究者

なし