

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 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592561

研究課題名（和文）マイクロRNAを標的とした新たな口腔癌の化学予防法の開発

研究課題名（英文）Chemoprevention for oral cancer targeting at microRNA

研究代表者

山本 一彦 (YAMAMOTO KAZUHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20243842

研究成果の概要（和文）：口腔癌の浸潤・転移との関連が報告されている染色体 7q の LOH 範囲 7q32 に位置する microRNA (miRNA) である has-miR29b-1 の発現について口腔扁平上皮癌（OSCC）標本と浸潤・転移能の異なる OSCC 細胞株を用い qRT-PCR にて検討するとともに、has-miR29b-1 による down-regulate が予測される遺伝子として 7q31 に位置する癌遺伝子である c-Met の発現について解析し、両者の発現と OSCC における臨床的指標と上皮間葉移行(EMT)の程度との関連について検討した。

研究成果の概要（英文）： We investigated the expression of microRNA (miRNA) has-miR29b-1 which is located on chromosome 7q32 and is considered to be related to the invasion and metastasis of oral cancer and the expression of c-Met as the target gene downregulated by has-miR29b-1 which is located in chromosome 7q31, in oral squamous cell carcinoma (OSCC) surgical specimens and cell lines. Then, correlation of these with clinical markers and phenotype of epithelial-mesenchymal transition was investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：マイクロRNA、口腔癌、化学予防

1. 研究開始当初の背景

口腔癌をコントロールし良好な口腔機能を維持するためには有効な治療法の開発とともにその予防が重要な課題である。われわ

れは、これまで口腔癌に対する有効な化学予防法の確立を目指し、4-NQO によるラット舌発癌モデルを用い COX-2 や RAGE を標的とした口腔癌の化学予防についての実験的研

究を行ってきた。

しかしながら、COX-2 や RAGE の発現の変化は病理組織学的にとらえることのできる病変において検出できるものであり、それ以前の変化をとらえることはできない。口腔癌のより効果的な化学予防のためには癌発生段階のより早期の変化をとらえ、それらを標的とした戦略を考慮する必要がある。

近年、様々な癌において miRNA の発現異常が報告され、miRNA が癌の発生と進展に深くかかわっていることが明らかになってきた。これまでに培養細胞や原発癌組織におけるマイクロアレイを用いた miRNA の発現プロファイルの解析により、種々の癌組織において miRNA 発現の亢進や低下が生じていることが報告されている。さらに、miRNA 発現の変化は癌周囲の健常組織において既に生じていると報告もみられ、発癌過程の早期に miRNA が関与していることが示唆される。しかし、miRNA の発現パターンの変化が癌の発生におけるどの過程で生じ、どのような機序で発癌に関与するかについてはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

そこでわれわれは、口腔癌の発癌過程に関与する miRNA の同定とその発現パターンの変化について検討し、これらが癌発生 of 早期の指標となりうるか、さらに口腔癌培養細胞株を用いてこれらの miRNA が有効な化学予防の標的となりうるかについて検討することとした。

3. 研究の方法

口腔癌に関与する候補 miRNA として、口腔癌の浸潤・転移との関連が報告されている染色体 7q の LOH 範囲 7q32 に位置する miRNA である has-miR29b-1 に着目した。外科的に切除された口腔扁平上皮癌組織 (OSCC) 44 標本と口腔扁平上皮癌由来細胞株 (HSC2、HSC3、HSC4、KON) における has-miR29b-1 の発現について quantitative RT-PCR により解析した。この miRNA により down-regulate が予測される遺伝子として 7q31 に位置する癌遺伝子である c-Met に着目し、その発現については OSCC においては組織化学的に 3 段階に評価し、HSC2、HSC3、HSC4、KON においてはその mRNA 量で解析した。さらに、OSCC においては病期や再発、転移の有無などの臨床的指標と E-cadherin と Vimentin の発現強度を指標とした上皮間葉転換 (EMT) について評価した。これらの臨床的指標、EMT、has-miR29b-1 および c-Met の発現、それぞれの因子間の関連性について検討した。培養

細胞においては c-Met の siRNA 処理による has-miR29b-1 への影響についても検討した。さらに 7q の欠損について検討するため Genome PCR をおこないその DNA 量を解析した。

4. 研究成果

OSCC における解析では、has-miR29b-1 と c-Met には直接関連性は認められなかったが、いずれも EMT との関連性が認められた。has-miR29b-1 と c-Met の両者高発現群は両者低発現群と比較して EMT および転移・再発が有意に高く、相乗効果を認めた。

Relationship between each factor

	T	N	Stg	Rec/ Meta	FU	S/D	EMT	cMet	miR 29b
T		0.02	0.00	0.88	0.09	0.28	0.89	0.67	0.06
N			0.00	0.14	0.00	0.00	0.27	0.91	0.05
Stage				0.42	0.00	0.01	0.41	0.53	0.03
Rec/Meta					0.01	0.00	0.02	0.06	0.91
FU						0.00	0.31	0.23	0.26
S/D							0.09	0.32	0.15
EMT								0.01	0.02
c-Met									0.82
miR29b									

Synergic effect of c-Met and miR-29b on metastasis/recurrence of OSCC

miR29b/ c-Met	T		N		Stage		EMT			Rec/ Meta		FU	S/D
	1	2	3	4	(-)	(+)	I	III					
							II	IV	1	2	3	(-)	(+)
High	15	7	15	7	12	10	4	2	16	5	17	50	8
Low	18	4	16	6	14	8	13	6	2	13	9	41.5	5
P 値	0.32		0.57		0.26		0.0040			0.0153		0.14	0.33

培養細胞株を用いた解析では、転移リンパ節株である KON で E-cadherin の低下、Vimentin と Snail の軽度発現を認め EMT 形質を呈していた。また、c-Met の siRNA 処理にて has-miR29b-1 の発現を検討した結果、いずれの細胞株においても c-Met と has-miR29b-1 との間に直接な関連は認めなかった。Genome PCR においては HSC2、HSC3、HSC4 において DNA 量の低下が認められ、逆に KON では著明な増加が認めら

れ、has-miR29b-1 と c-Met の genome および発現が維持されていた。

Relation of c-Met gene status with miR29b expression in OSCC cell lines

	HSC2	HSC3	HSC4	KON
Met allele	Loss	Loss	Loss	Gain
c-Met RNA	High	Low	High	Low
miR29b RNA	Low	Low	Low	High
EMT	±	-	±	+

以上より、has-miR29b-1 と c-Met には直接的な関係は認められなかったが、両者とともに EMT 形質の発現と再発、転移の有無などの臨床的指標との関連を認めとことより、両者が口腔癌の浸潤・転移に相乗的に作用していることが示唆された。

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 3 件)

1. Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. Downregulation of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) associated with poor prognosis of adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. *Cancer Sci* 102(2): 492-497, 2011 (査読あり)

2. Sasahira T, Yamamoto K, Kurihara M, Bhawal UK, Chihara Y, Kirita T, Kuniyasu H. The roles of HMGB1 related angiogenesis and lymphangiogenesis in oral cancer. *Oncol Rev* 5: 49-55, 2011 (査読あり)

3. Sasahira T, Kirita T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK, Bosserhoff AK, Kuniyasu H. MIA dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 46: 2285-2294, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計 26 件)

1. 笹平智則、栗原 都、バワール・ウジャール、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌における Prox1 の発現と役割. 第 101 回日本病理学会総会, 2012. 4. 26-28, 東京

2. 笹平智則、栗原 都、バワール・ウジャール、上田順宏、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. FOXC2 が口腔癌に及ぼす影響についての検討. 第 101 回日本病理学会総会, 2012. 4. 26-28, 東京

3. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、ウジャール・バワール、桐田忠昭、國安弘基. ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現. 第 101 回日本病理学会総会, 2012. 4. 26-28, 東京

4. 笹平智則、上田順宏、栗原都、山本一彦、國安弘基、桐田忠昭. Trk family は口腔癌の血管・リンパ管新生を誘導する. 第 30 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2012. 1. 26-27, 大宮

5. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、仲川洋介、桐田忠明、國安弘基. 口腔扁平上皮癌における has-miR29b-1 の発現と c-met および EMT との関連. 第 56 回日本口腔外科学会総会, 2011. 10. 21-23, 大阪

6. 笹平智則、栗原 都、バワール ウジャール、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌における miR-126 の機能解析. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011, 10, 3-5, 名古屋

7. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011, 10, 3-5, 名古屋

8. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現. 第 22 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会 2011, 8. 23-25, 福岡

9. 笹平智則、上田順宏、栗原 都、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔癌における Trk family の役割. 第 22 回日本臨床口腔病理学会, 2011. 8. 23-25, 福岡

10. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、ウジャール・バワール、桐田忠昭、國安弘基. ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの口腔扁平上皮癌における発現. 第 100 回日本病理学会総会, 2011. 4. 28-30, 横浜

11. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、パワー・ウジャール、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるMIA3の脈管新生における役割. 第21回日本消化器癌発生学会、ミニシンポジウム, 2010. 11. 18-19, 軽井沢

12. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるMIA2の発現と局所浸潤およびアポトーシスとの関連. 第55回日本口腔外科学会総会, 2010. 10. 16-18, 千葉

13. 笹平智則、栗原 都、パワー・ウジャール、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるMIA3の役割. 第69回日本癌学会学術総会, 2010. 9. 22-24, 大阪

14. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるMIA2の発現. 第69回日本癌学会学術総会 2010. 9. 22-24, 大阪

15. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるMIA2の発現. 第34回日本頭頸部癌学会, 2010. 6. 10-11, 東京

16. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、パワー・ウジャール、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるMIA3の役割. 第99回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 東京

17. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、パワー・ウジャール、桐田忠昭、國安弘基. 唾液腺腫瘍におけるRUNX3の発現およびメチル化. 第99回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 東京

18. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるchymaseの役割. 第99回日本病理学会総会. 2010. 4. 27-29, 東京

19. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるMIA2の発現. 第99回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 東京

20. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. HuDが口腔扁平上皮癌の進展に及ぼす影響についての検討. 第20回日本消化器癌発生学会、ミニシンポジウム, 2009. 11. 26-27, 広島

21. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるMIA2

の発現. 第20回日本消化器癌発生学会、ミニシンポジウム, 2009. 11. 26-27, 広島

22. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、柳生貴裕、仲川洋介、岡崎悠輔、國安弘基、桐田忠昭. HuDは口腔癌の進展・転移マーカーとして有用である. 第54回日本口腔外科学会総会. 2009. 10. 9-11, 札幌

23. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. HuDは口腔癌の進展、リンパ節転移に關与する. 第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 1-3, 横浜

24. 栗原 都、笹平智則、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるHuDの発現. 第20回日本臨床口腔病理学会, 2009. 7. 29-31, 札幌

25. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基. 口腔扁平上皮癌におけるHMGB1関連シグナル. 第20回日本臨床口腔病理学会, 2009. 7. 29-31, 札幌

26. 笹平智則、桐田忠昭、栗原 都、山本一彦、國安弘基. 唾液腺腫瘍におけるRUNX3の発現およびメチル化の検討. 第33回日本頭頸部癌学会, 2009. 6. 10-12, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 一彦 (YAMAMOTO KAZUHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20243842

(2) 研究分担者

國安 弘基 (KUNIYASU HIROKI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00253055

桐田 忠昭 (KIRITA TADAAKI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70201465