

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16939

研究課題名（和文）新規核酸増幅法を用いた口腔がん特異的な唾液由来miRNAの検出

研究課題名（英文）Detection of oral cancer-specific saliva-derived miRNA using a novel nucleic acid amplification method

研究代表者

坂田 健一郎（SAKATA, KENICHIRO）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10826051

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：microRNAは腫瘍組織中で高発現し、その特異性は腫瘍マーカーより高い。研究代表者は口腔癌診療を行っている中で、無侵襲に解析できる唾液を病態解明、早期診断治療、薬剤効果、転移再発の検知に用いることができないかと着想した。口腔癌症例の唾液採取および倫理委員会の受理は終了したが、最終年度にはSATIC法の確立には至らなかったが、臨床イベント毎に採取した唾液からマイクロアレイを行いパスウェイ解析すると血管内皮細胞増殖因子受容体、VEGFR2に関わる遺伝子の発現上昇を認めた。外科切除後に低下し、肺転移時に発現異常を認め、臨床経過と一致していた。免疫染色の結果も同様であり、今後報告予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

microRNA（miRNA）は腫瘍組織中で高発現し、その特異性は腫瘍マーカーより高い。口腔癌の主な治療は外科的切除であるが、術後に発音、咀嚼障害、嚥下、整容面などの機能障害を引き起こすため早期発見が重要である。口腔がん患者の唾液から、SATIC法を用いてmiRNAを検出する。SATIC法は、RNAのまま短時間で核酸増幅が可能であり、唾液から20分以内に腫瘍特異的miRNAを検出する手法を開発する。SATIC法は通常のPCR法に代わる、技術革新である。Covid19の迅速診断法で注目されており、PCR法と異なり核酸（DNAやRNA）の抽出が不要であり、高感度で定量性があるという利点がある。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs are highly expressed in tumor tissues, and their specificity is higher than that of tumor markers. While treating oral cancer, the principal investigator came up with the idea that saliva, which can be analyzed non-invasively, could be used to elucidate pathological conditions, early diagnosis and treatment, detect drug effects, and detect metastasis and recurrence. Saliva collection from oral cancer cases and acceptance by the ethics committee were completed, but the SATIC method was not established in the final year, but microarray analysis of saliva collected at each clinical event and pathway analysis revealed vascular endothelial cell proliferation. Increased expression of genes related to factor receptor VEGFR2 was observed. It decreased after surgical resection, and abnormal expression was observed at the time of lung metastasis, which was consistent with the clinical course. The results of immunostaining are also similar and will be reported in the future.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 SATIC法 唾液 迅速診断 早期診断 microRNA

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は腫瘍組織中で高発現し、その特異性は腫瘍マーカーより高い。研究代表者は現在、口腔癌診療を行っている中で、無侵襲に解析できる唾液を病態解明、早期診断、早期治療、薬剤効果、転移や再発の検知に用いることができないかと着想した。口腔癌の主な治療は外科的切除であるが、術後に発音、咀嚼障害、嚥下、整容面などの機能障害を引き起こすため早期発見が重要である。口腔がん患者の唾液から、signal amplification by ternary initiation complexes 法 (SATIC 法) を用いて miRNA を検出する。SATIC 法は、RNA のまま短時間で核酸増幅が可能であり、唾液から 20 分以内に腫瘍特異的 miRNA を検出する手法を開発する。SATIC 法は通常の PCR 法に代わる、技術革新である。Covid19 の迅速診断法で注目されており、PCR 法と異なり核酸 (DNA や RNA) の抽出が不要であり、特定の装置 (高速温度制御装置) などが必要なく安価で早く、高感度で定量性があるという利点がある。SATIC 法を用いることで、がんや生活習慣病に関わる遺伝子や細菌やウイルスのゲノム等の特定遺伝子、特異タンパク質、microRNA が検出可能で、最終的にナノ磁性ビーズの凝集の有無により可視化 (蛍光発光) し判定する方法である。低侵襲で簡便に採取可能で、歯科医師として日常診療で馴染みの深い唾液を検体として用いることができる。

2. 研究の目的

口腔癌診療において無侵襲に解析できる唾液を病態解明、早期診断、早期治療、薬剤効果、転移や再発の検知。

3. 研究の方法

(1) 対象患者の選択

口腔がん患者、口腔潜在的悪性病変患者、健常者を対象とする。口腔がん患者の、Stage 別、部位別にリスト化を行う。対象目標として、各 20 例を予定している。

(2) 唾液 RNA を用いた miRNA の発現解析

最初に唾液採集キットと、複数の RNA 抽出キットを組み合わせ、miRNA 検出に最適な組み合わせを決定する。次に (1) でリスト化した口腔がん患者、口腔潜在的悪性病変患者、健常者の血液と唾液から RNA を抽出し、miRNA アレイによって口腔がんの唾液において発現上昇する miRNA を同定する。比較対象として、口腔がんが発現上昇することが報告されている、miR-21、miR-24、miR-31、miRNA-223 の発現を、定量的 RT-PCR で解析する。

(3) SATIC 法の樹立

(1)、(2) と並行して、SATIC 法の樹立を行う。リン酸化 DNA をライゲーションして環状 DNA を作成し、PAGE 精製を行う。更に miR-21 を陽性コントロールとし、29 DNA polymerase と SYBR Gold、ならびにサーマルサイクラーを用いて実験系の樹立を行う。SATIC 反応後のサンプルは UV 照射で検出し、蛍光強度を数値化する。更に、(2) で口腔がんと相関性が認められた miRNA について実験系を樹立する。

(4) 4 重鎖グアニン結合試薬を用いた SATIC 法特異性の改良

SYBR Gold の代わりに、4 重鎖グアニン結合蛍光試薬チオフラビン T、またはその誘導体 (ThT-HE) を用いて、(3) の miRNA を解析し、実験系を改良する。また、樹立した検出系と、通常の定量的 RT-PCR 法の感度、特異度、検出時間などを比較する。

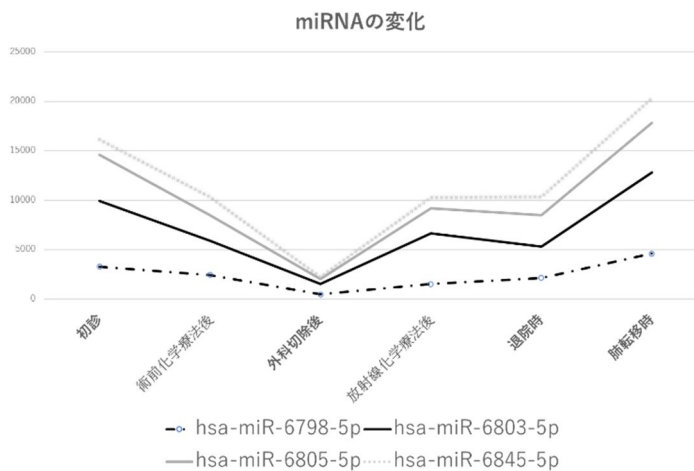
(5) 口腔がん特異的 miRNA の標的遺伝子の同定

(1) で同定した miRNA の阻害剤を、SAS、HSC4 などの口腔がん細胞株に導入し、DNA アレイを用いて標的遺伝子候補を決定する。口腔がんにおいて発現量が低下している遺伝子の 3' UTR を解析し、miRNA 結合部位が存在する遺伝子について、ルシフェーゼアッセイを用いて標的遺伝子を明らかとする。更に、ヒト初代培養口腔ケラチノサイトに miRNA を遺伝子導入し、MTT assay (細胞増殖能)、Phagokinetic Track Assay (細胞運動能) によって、細胞の変化を解析する。

4. 研究成果

microRNA は腫瘍組織中で高発現し、その特異性は腫瘍マーカーより高い。研究代表者は口腔が

ん診療を行っている中で、無侵襲に解析できる唾液を病態解明、早期診断治療、薬剤効果、転移再発の検知に用いることができないかと着想した。口腔がん症例の唾液採取および倫理委員会の受理は終了したが、最終年度には SATIC 法の確立には至らなかったが、臨床イベント毎に採取した唾液からマイクロアレイを行いパスウェイ解析すると血管内皮細胞増殖因子受容体、VEGFR2 に関わる遺伝子の発現上昇を認めた。外科切除後に低下し、肺転移時に発現異常を認め、臨床経過と一致していた。免疫染色の結果も同様であり、今後報告予定である。



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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------