

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21052

研究課題名（和文）口腔癌患者由来・癌関連線維芽細胞、機能性RNA解析に基づく治療標的分子の探索

研究課題名（英文）Search for therapeutic target molecules based on functional RNA analysis of oral cancer patient-derived and cancer-associated fibroblasts.

研究代表者

駒 綾香（koma, ayaka）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：60963098

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌（OSCC）は固形癌のひとつであり、その間質組織には癌関連線維芽細胞（CAF）の割合が多く存在する。CAFは癌の性質や薬剤感受性を修飾し、癌の進展に有利な微小環境を構築している。本研究では、OSCC手術検体からCAFおよび正常線維芽細胞（NF）の単離を成功させ、RNA次世代シーケンズ解析を用いてOSCC-CAFに特異的な発現を示し、OSCC悪性獲得化に深く関与する可能性を秘めたマイクロRNAの存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌（OSCC）は、手術・放射線・化学療法などの治療に対し治療抵抗性を獲得し、局所再発や遠隔転移を引き起こす。癌組織において間質を構成する構成する主な細胞は線維芽細胞であり、これらが細胞増殖因子などを産生し、腫瘍細胞の増殖や浸潤を促進するとの報告があり、癌治療における新たな標的として脚光を浴びつつある。また最近では、癌細胞と周辺細胞の細胞間コミュニケーションに、マイクロRNAを含む細胞外小胞の関与が報告され、マイクロRNAを指標とした癌診断法の開発研究が脚光を浴びている。OSCCの悪性化に関わる分子経路が明らかになれば、これら経路を遮断する分子の探索に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a solid tumor and the stromal tissue contains a high proportion of cancer-associated fibroblasts (CAFs). CAFs modify cancer properties and drug sensitivity, creating a microenvironment favorable for cancer progression. In this study, we successfully isolated CAFs and normal fibroblasts (NFs) from OSCC surgical specimens and used RNA next-generation sequencing analysis to identify microRNAs that are specifically expressed in OSCC-CAFs and may be deeply involved in OSCC malignant acquisition.

研究分野：分子生物学

キーワード：癌関連線維芽細胞 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織には癌細胞のみならず様々な間質細胞が存在している。なかでも固形癌のひとつである口腔扁平上皮癌 (OSCC) は、線維芽細胞の割合が高く、癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts ; CAF) と呼ばれ、癌の進展に有利な微小環境を構築している。CAF は様々な細胞と相互作用することにより、癌の性質や薬剤感受性を修飾し、癌の悪性化に関与していると報告をされている。また、癌細胞は、周辺細胞と細胞外小胞を用いて、お互いの悪性化を助長していると考えられている。細胞外小胞には宿主細胞由来のタンパク、脂質、メッセンジャーRNA の断片およびマイクロ RNA が含まれており、これらの分子が細胞外小胞を介して他の細胞内に伝播され、更に機能する事が近年明らかになっている。本研究では、CAF に特異的なマイクロ RNA を癌細胞株に核酸導入し、マイクロ RNA の機能解析と、これらのマイクロ RNA が制御する分子ネットワークの探索を行い OSCC の悪性化に関わる分子経路が明らかになれば、これらの経路を遮断する分子の探索 (ドラッグリポジショニング) につながると考えられた。

2. 研究の目的

OSCC 手術検体から CAF の初代培養法を確立し、複数の OSCC-CAF を樹立、さらに RNA 次世代シーケンス解析により OSCC-CAF マイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、OSCC、OSCC-CAF、正常線維芽細胞 (NF) の比較から、OSCC-CAF に特異的な発現を示すマイクロ RNA を明らかにし、その機能解析と OSCC 細胞の悪性化獲得に関与する分子ネットワークの探索を目的とした。

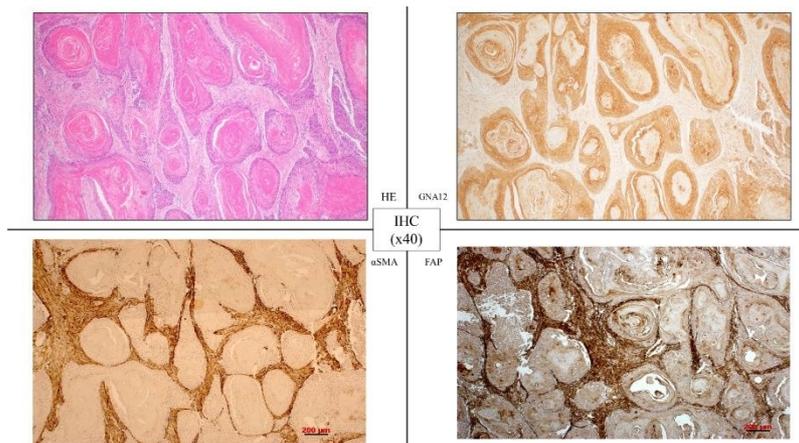
3. 研究の方法

1) OSCC 手術検体 (癌組織部、正常組織部) から CAF、NF の単離を確立させ、それぞれに対し蛍光免疫染色法などを用いて多角的に解析を行う。

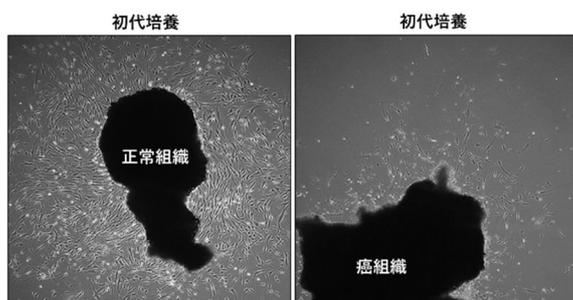
2) RNA シークエンス解析を行い、OSCC、OSCC-CAF、NF の比較から OSCC-CAF に特異的なマイクロ RNA を明らかにし、その機能解析 (増殖能、遊走能、浸潤能) を行う。

4. 研究成果

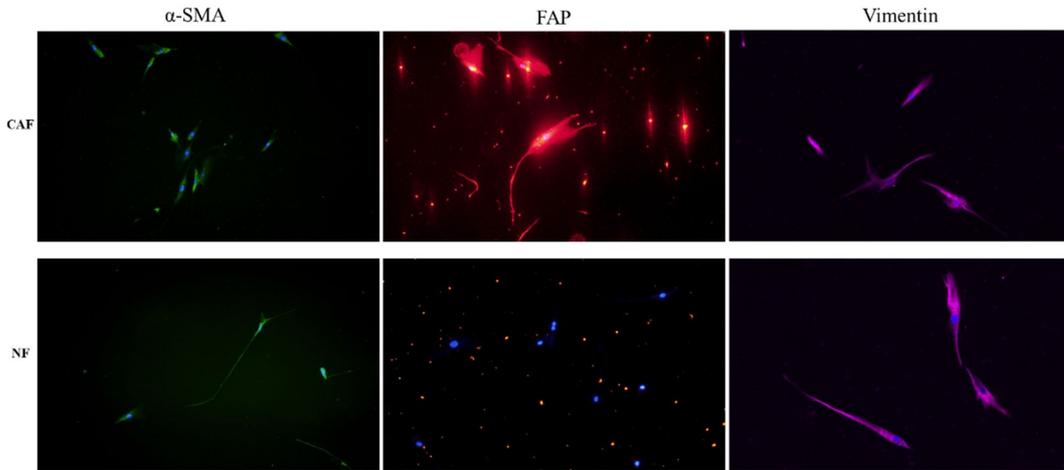
1) CAF のマーカーである SMA と FAP に対し、OSCC 臨床検体における発現の局在を免疫化学染色法 (IHC) にて確認した。癌細胞の細胞膜・細胞質に局在する遺伝子 (GNA12) をコントロールとし比較を行った。SMA も FAP も癌細胞周囲の間質細胞に局在していることが確認できた (図 1)。OSCC 手術検体から初代培養を行い (図 2)、それぞれを蛍光免疫染色法にて、SMA、FAP、vimentin を用いて解析を行った。単離した細胞はそれぞれ NF、CAF であることが示唆された。(図 3)



(図 1: OSCC 臨床検体を用いて SMA、FAP の局在を確認した。)



(図 2 : 手術検体から細胞を単離した。)



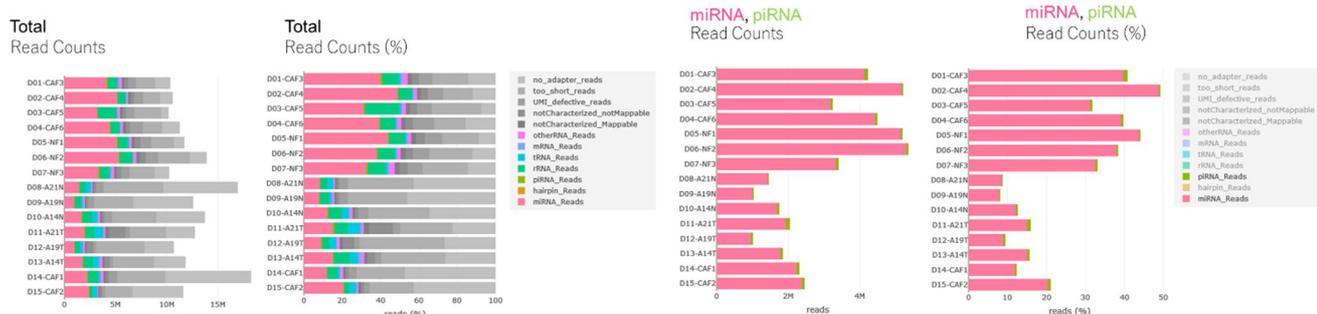
(図3:単離した細胞を蛍光免疫染色法にて確認した。)

2)手術検体から単離したCAF、NF から total RNA を抽出し RNA 次世代シーケンス解析を行った。シーケンスのクオリティーチェックで、吸光度・定量試験では実験に影響するタンパク質やフェノールの混入は認めず、電気泳動で分解もなく、small RNA を含むサンプルであること、ライブラリサイズは155~200bpの範囲にあることを確認した。(表1、図4~7)。

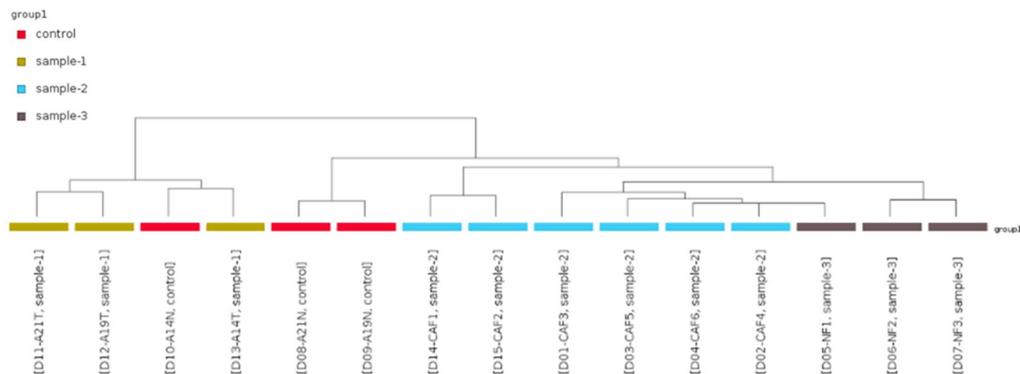
Sample ID	濃度※ (ng/μL)	A260/A280	RNA 品質 の客観的 評価 RIN	miRNA / Small RNA Ratio (%)	QC後の Total volume (μL)	QC後の RNA量 (ng)
D01-CAF3	47.2	2.0	9.9	5.0	26.0	1228.0
D02-CAF4	72.8	2.0	10	3.6	26.0	1892.8
D03-CAF5	131.2	2.0	10	2.5	12.0	1573.9
D04-CAF6	62.4	2.0	9.5	2.3	26.0	1623.7
D05-NF1	79.8	2.0	10	0.5	26.0	2076.0
D06-NF2	96.6	2.0	10	2.1	12.0	1159.2
D07-NF3	27.0	1.9	10	2.8	25.0	873.8

Sample ID	Library Average Size (bp)	Library 濃度 (pM)	17 Index sequence
D01-CAF3	178	2053	AATAGGCC
D02-CAF4	177	1385	AGAGTACC
D03-CAF5	175	2328	GGTCTCAA
D04-CAF6	177	1389	AGAATCGG
D05-NF1	177	829	CGATCTGT
D06-NF2	178	1099	TGTAAGGC
D07-NF3	176	1563	CAACCGAT

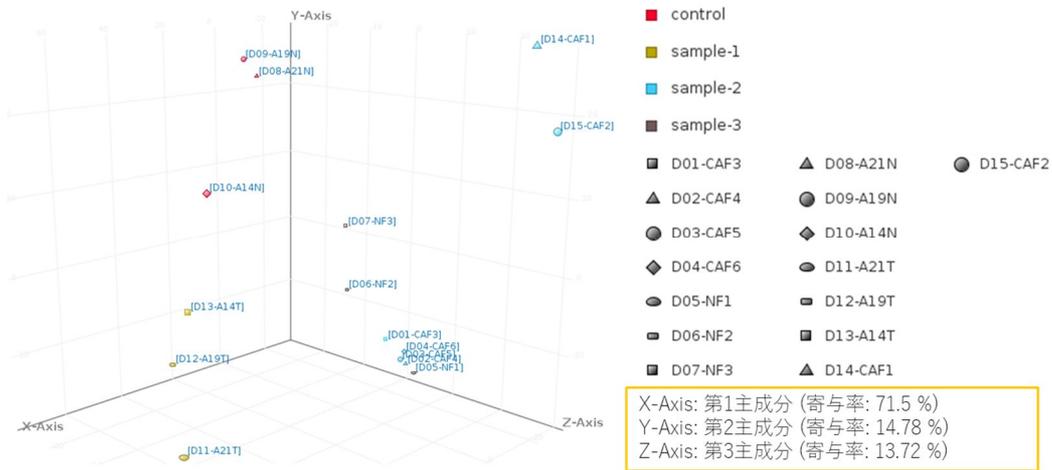
(表1;RNA 次世代シーケンス解析のクオリティーチェック)



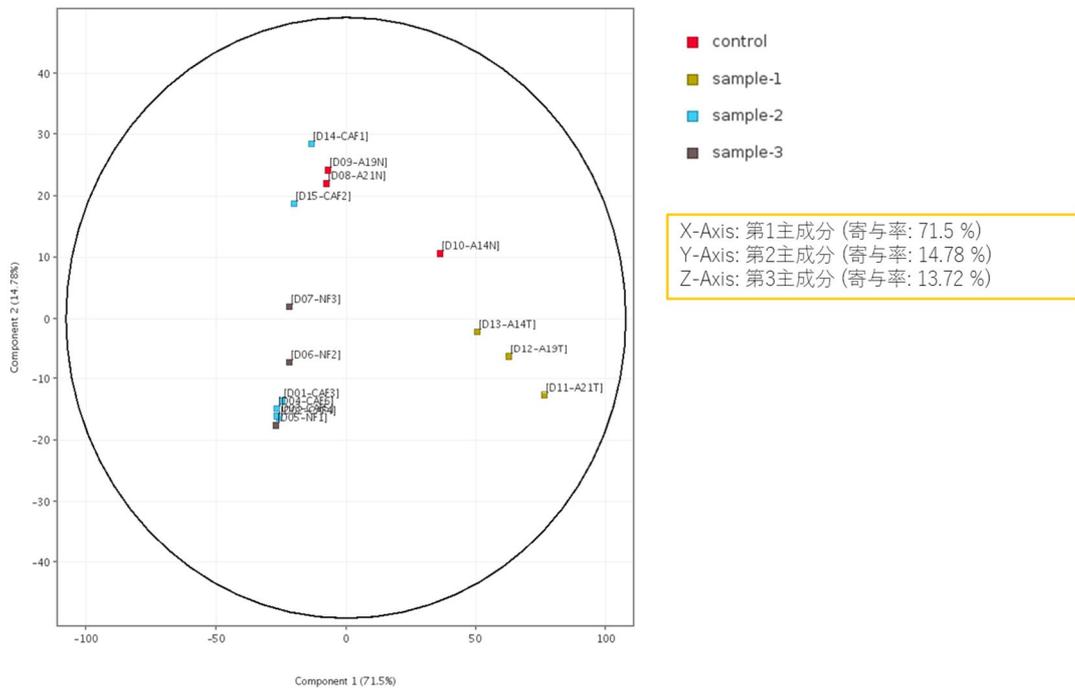
(図4;RNA 次世代シーケンス解析による small RNA 分類)



(図5;マイクロ RNA 階層的クラスタリング)

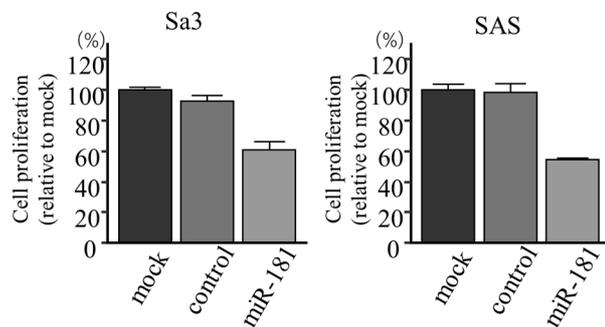


(図6;マイクロRNA PCA 解析 (主成分解析) XYZ 方向)

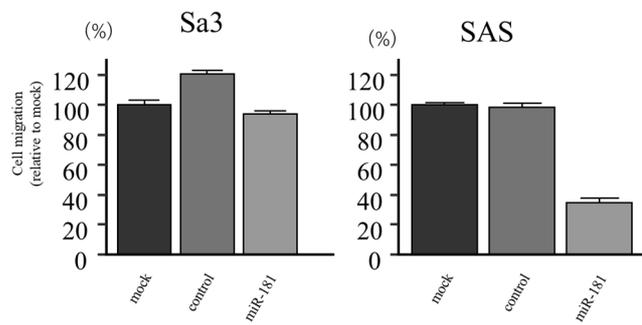


(図7;マイクロRNA PCA 解析 (主成分解析) XY 方向)

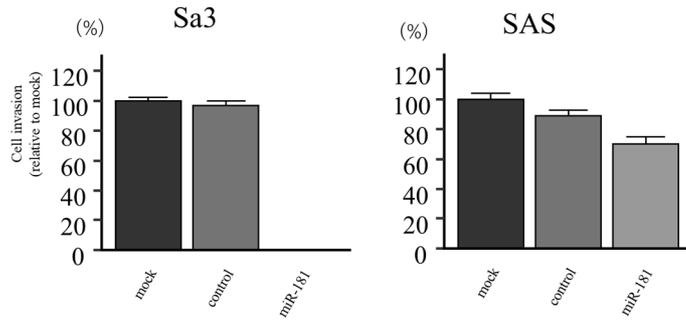
解析結果から、マイクロRNA137 とマイクロRNA181 に着目をし、OSCC 細胞株 (Sa3、SAS) に対し核酸導入をし、機能解析 (増殖能 (XTT) 遊走能、浸潤能) を行った。マイクロRNA181 は、増殖能 (図8) 遊走能 (図9) 浸潤能 (図10) いずれも有意な抑制を認めたが、マイクロRNA137 は有意な差を認めなかった。以上の結果からマイクロRNA181 はOSCCの悪性化獲得へ関与している可能性が示唆された。



(図8;増殖能試験結果 (XTT))



(図 9 ; 遊走能試験)



(図 10 ; 浸潤能試験)

まとめ

本研究では、OSCC 手術検体から CAF および NF の単離に成功し、さらにその RNA 次世代シーケンス解析および機能解析から、マイクロ RNA181 が OSCC の悪性獲得化に深く関与している可能性が示唆された。

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
---------	---------