

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659934

研究課題名（和文）口腔癌に対する血中・唾液中 micro RNA による診断，治療法の開発

研究課題名（英文） Diagnosis by microRNA in blood and saliva, and development of the new treatment method to oral cancer

研究代表者

武川 寛樹 (BUKAWA HIROKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80173558

研究成果の概要（和文）：口腔がん由来細胞株および口腔がん患者の組織，血液，唾液から microRNA を抽出し，ヒトの様々ながんにおいて発現に変動のあった約 100 種の microRNA について，その発現変動を比較した．口腔がん由来細胞株および口腔がん組織において，let-7 family は共通して発現減弱していることが確認され，さらに口腔がん組織での発現の特徴と，血清および唾液中での発現の特徴には関連性がみられ，共通して発現変化を示す microRNA も認められた．

研究成果の概要（英文）：Microarrays have been applied to determine the expression patterns of about 100 kinds of microRNA in the oral cancer derived cell lines, primary oral cancer tissues, blood and saliva. We have demonstrated that let-7 family was down-regulated in oral cancer derived cell lines and primary oral cancer tissues. We found the relationship to the characteristics of the expression in blood, saliva and tissue in oral cancer. In addition, we also observed microRNAs expression showing common changes in those.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：歯科口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学・

キーワード：口腔がん、micro RNA、血液、唾液、let-7 family

1. 研究開始当初の背景

(1) microRNA は，細胞増殖や分化，アポトーシスなど生体内のさまざまな現象に関わっており，がんにおいては，これまでも数多くの発現異常が報告されている．

(2) microRNA は，標的遺伝子の mRNA

の翻訳を抑制することで，発生や分化の調節に関わっているとされ，その発現異常が，がんの発生に関与していることが明らかにされている．

(3) microRNA は，エクソソームに封入され細胞外に分泌されることで血液・唾液

などの体液中に安定して存在することが明らかになっている。がん患者と非がん患者とでは、これら遊離 microRNA の発現状態に明確な差があることがわかっており、そのプロファイリングによって、がんの病態・悪性度・予後に関する重要な情報が得られると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ヒト口腔がん由来細胞株とヒト口腔がん組織におけるがん関連 microRNA の網羅的発現解析を行い、共通して発現亢進を示す microRNA (がん遺伝子型 microRNA)、発現低下を示す microRNA (がん抑制遺伝子型 microRNA) を同定すること。

(2) 口腔がん患者の血液、唾液中におけるそれらの発現に相関性があるかを明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 各口腔がん由来細胞株からの totalRNA の抽出

5種類の口腔扁平上皮がん (OSCC) 由来細胞株 (SAT, KON, HO-1-u-1, SAS, SCC-4) およびコントロールとしてヒト表皮ケラチノサイト (HaCaT) から miRNeasy Kit (QIAQEN) を用いて totalRNA (microRNAを含む) を抽出した。

(2) 臨床検体 (組織) からの totalRNA 抽出

ヒト口腔がん患者の手術検体がん組織 (n=3) および同一患者の正常組織 (n=3) から miRNeasy Kit (QIAQEN) を用いて totalRNA (microRNAを含む) を抽出した。

(3) 臨床検体 (血液、唾液) からの totalRNA 抽出

ヒト口腔がん患者 (n=3) および非がん患者 (n=3) の手術前の血液、唾液から QIAamp Circulating Nucleic Acid (QIAGEN) を用いて total RNA (microRNAを含む) を抽出した。

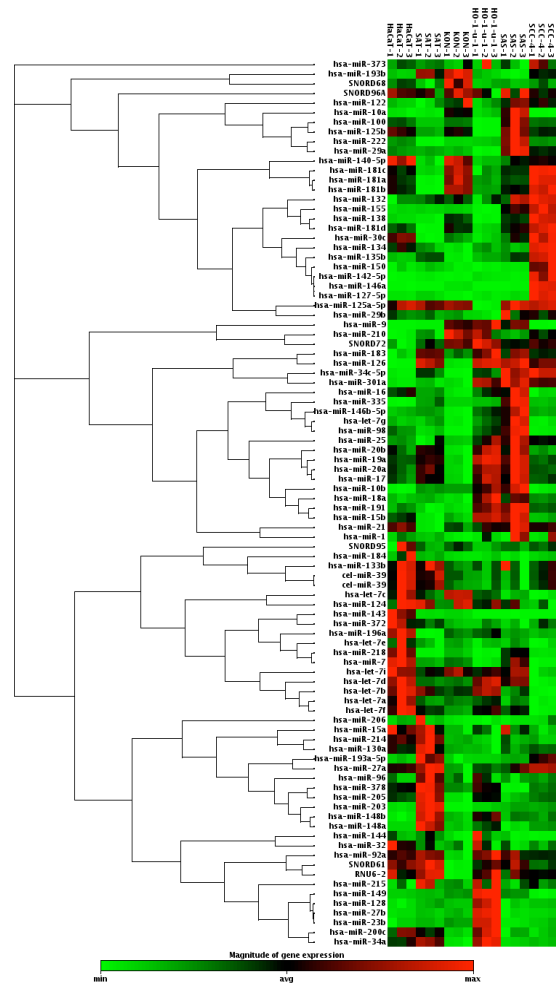
(4) 網羅的発現解析

miScript II RT Kit (QIAGEN) にて cDNA に逆転写後, Human miRNome miScript miRNA PCR Array (QIAGEN) にて網羅的発現解析を行った。

4. 研究成果

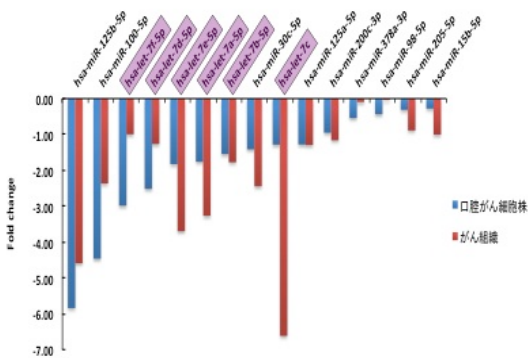
(1) 各口腔がん由来細胞株における microRNA の発現状態を確認した (図1)。

図1. 口腔がん細胞株における microRNA の発現状態



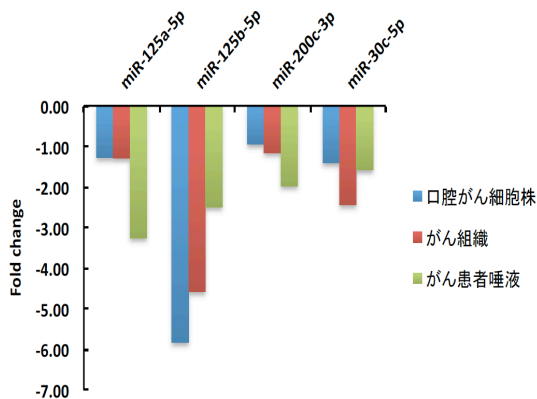
(2) 口腔がん細胞株および口腔がん組織におけるmicroRNAの網羅的発現解析から、let-7 familyが共通して発現減弱を示していることが確認され(図2), 口腔がん抑制遺伝子型microRNAと同定した。

図2. 口腔がん由来細胞株とがん組織で共通して発現減弱を示す, 口腔がん抑制遺伝子型microRNA



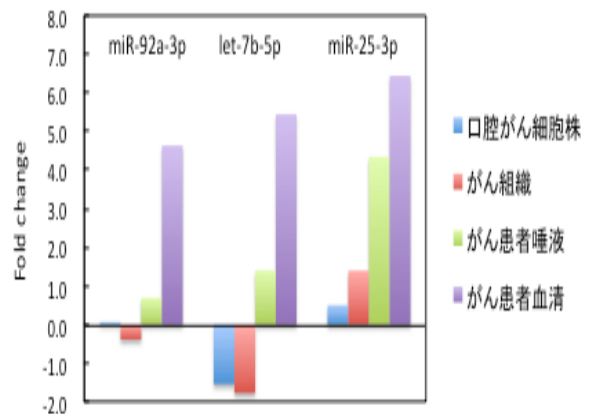
(3) 口腔がん組織における発現と血液, 唾液中での発現には関連性がみられ, 共通して発現変動を示す microRNA が確認された(図3).

図3. 口腔がん由来細胞株, がん組織およびがん患者の唾液中で共通して発現減弱を示す, 口腔がん抑制遺伝子型microRNA



(4) 口腔がん組織における発現と血液, 唾液中での発現には関連性がみられなかったが, 血液, 唾液中では共通して発現の亢進を示す口腔がん遺伝子型microRNA (miR-92a-3p, let-7b-5p, miR-25-3p) が確認された(図4). 中でもmiR-25-3pのみが, 非がん患者と有意差を持ってその発現亢進を認めた。

図4. がん患者の血液および唾液中で共通して発現亢進を示す, 口腔がん遺伝子型microRNA



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

馬場 脩 (代表), 口腔がんに対する血中・唾液中 microRNA による診断, 治療法の開発 第31回日本口腔腫瘍学会総会 2013年1月24日 秋葉原コンベンションホール (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武川 寛樹 (BUKAWA HIROKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80173558