

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390457

研究課題名(和文) 口腔癌関連 microRNA の発現機能解析と臨床応用

研究課題名(英文) Expression, function and clinical application of microRNA in oral cancer

研究代表者

中城 公一 (Nakashiro, Koichi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90314880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では miR-1289 の口腔癌組織における発現とヒト口腔癌細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。口腔癌組織では腫瘍部における miR-1289 の発現量は正常部と比較して有意に発現低下していた。また、合成 miR-1289 はヒト口腔癌細胞の増殖を *in vitro* および *in vivo* において著明に抑制した。さらに、miR-1289 の抗腫瘍効果を支持する標的遺伝子として magnesium transporter 1 (MAGT1) を同定した。以上の結果より、口腔扁平上皮癌において miR-1289 が新規の癌抑制型 microRNA として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the expression of miR-1289 in oral cancer tissues and the growth inhibitory effect of miR-1289 in human oral cancer cells. First, we investigated the expression of miR-1289 in oral cancer tissues by real-time quantitative RT-PCR. The expression levels of miR-1289 were significantly decreased in oral cancer tissues compared to adjacent normal oral mucosa tissues. Next, synthetic miR-1289 markedly inhibited the growth of human oral cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Finally, target genes of miR-1289 were explored by microarray and Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Microarray and IPA identified 15 genes as targets of miR-1289. In knockdown of these genes, magnesium transporter 1 (MAGT1) showed the most remarkable cell growth inhibition in human oral cancer cells. These results suggest that miR-1289 functions as a novel tumor suppressive microRNA in oral cancer, and may be a useful therapeutic tool for the patients with oral cancer.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 microRNA

### 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は 18~25 塩基からなる小分子 RNA で、標的 mRNA に結合することで、その蛋白質への翻訳を阻害する。これら miRNA の発現あるいは機能異常が種々の疾患に関与していることが明らかにされている。特に、癌領域では miRNA マイクロアレイを用いた網羅的発現解析により発現亢進および発現低下している miRNA が多数同定されている。癌で発現亢進する miRNA としては、miR-21、miR-155、miR-17-5p、miR-19 などが知られており、中でも miR-19 は細胞癌化に必要十分であり、その標的の一つが癌抑制遺伝子 PTEN であることが示された (Olive V, et al. Genes Dev 23:2839-2849, 2009)。このように癌抑制遺伝子を標的とし癌遺伝子的な性質を有する miRNA は OncomiR と呼ばれている。一方、多くの miRNA は癌で発現低下しており、let-7、miR-15a、miR-34a、miR-143、miR-145 などが報告されている。肺癌では let-7 の発現低下と予後が相関することが明らかにされており (Takamizawa J, et al. Cancer Res 64:3753-3756, 2004)、その標的に癌遺伝子 Ras が含まれていることが知られている (Johnson SM, et al. Cell 120:635-647, 2005)。癌遺伝子を標的とし癌抑制遺伝子様の機能を発揮する miRNA は tumor suppressive miRNA (TS-miR) と呼ばれている。これら OncomiR と TS-miR の多くは、ヒト癌組織あるいは癌細胞株を用いた miRNA の網羅的発現解析により同定された。さらに、最近ではヒト体液 (血液、唾液、尿など) 中に miRNA の存在が明らかにされ、種々の癌を検出するための有用なバイオマーカーとなり得ることが示されている (Kosaka N, et al. Cancer Sci 101:2087-2092, 2010)。

これまでに、われわれはヒト miRNA knockdown library (miRBase Ver.12) とヒト miRNA overexpression library (miRBase Ver.13) を用いた miRNA の網羅的機能解析により、ヒト口腔癌細胞における OncomiR と TS-miR の同定を試みた。また、miRNA マイクロアレイを用いて口腔癌診断における miRNA のバイオマーカーとしての有用性についても検討した。まず、ヒト 918 種類に対する miRNA knockdown library を用いた miRNA の網羅的機能阻害解析では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞において 14 種類の OncomiR を同定した (特願 2010-254021)。その中でも、miR-361-3p、miR-133a/b に対する機能阻害核酸すなわちアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞のみならず、ヒト膀胱癌細胞、ヒト肺癌細胞、ヒト前立腺癌細胞に対しても著明な増殖抑制効果を示した。次に、1,000 種類のヒト合成 miRNA library を用いた網羅的過剰発現解析では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞において 17 種類の TS-miR を同定した (特願 2011-113348)。特に、合成 miR-1289 の

過剰発現は著明な細胞増殖抑制効果を示した。さらに、口腔扁平上皮癌患者と健常者血清の miRNA マイクロアレイ解析では、口腔癌患者に共通して存在量が増加する miRNA を 17 種類、存在が検出できなくなる miRNA を 15 種類同定した。その中でも、miR-181b は口腔癌患者血清のみならず唾液においてもその存在量が著明に増加していた。なお、miR-181b は白血病から口腔癌への進行に関与していることがすでに報告されている (Cervigne NK, et al. Hum Mol Genet 18:4818-4829, 2009)。以上の結果は、miRNA が口腔癌の診断や治療に有用となる可能性を示唆している。

### 2. 研究の目的

- (1) 口腔扁平上皮癌における TS-miR の模倣型合成 miRNA をヒト口腔扁平上皮癌細胞ヌードマウス背部皮下移植腫瘍に投与し、その抗腫瘍効果の有無を明らかにする。
- (2) 模倣型合成 TS-miR の口腔扁平上皮癌由来初代培養細胞の増殖に及ぼす影響を明らかにする。
- (3) 口腔扁平上皮癌における TS-miR の発現様式を明らかにする。
- (4) 口腔扁平上皮癌における TS-miR の標的分子を探索し、そのヒト口腔扁平上皮癌細胞増殖における機能を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) miR-1289 模倣型合成核酸の抗腫瘍効果の評価

培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (GFP-SAS)  $1 \times 10^6$  個をマトリゲルと混合し、ヌードマウス背部皮下に移植し、7 日後に腫瘍形成を確認したのち、miR-1289 模倣型合成 miRNA 100 ng をアテロコラーゲンと混合し腫瘍周囲に 7 日間隔にて 3 回投与した。腫瘍径を 3 日間隔にて経時的に計測し、腫瘍体積を算出した。治療開始後 2 週間、対照群の腫瘍体積と比較しその抗腫瘍効果を評価した。同時に、安全性の評価についてはマウスの体重を 3 日間隔にて経時的に計測し、食欲低下等による体重減少の有無について確認した。

- (2) miR-1289 模倣型合成核酸のヒト口腔扁平上皮癌由来初代培養細胞の増殖に及ぼす影響

口腔扁平上皮癌患者 (3 名) より得られた腫瘍組織を尖刀で細切し、コラゲナーゼを含む細胞分散溶液で処理した。つづいて、70  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過後、細胞培養用ディッシュで無血清角化上皮細胞培養用培地を用いて初代培養を行った。2 回継代した後に、96-well マイクロプレートに初代培養細胞を  $5 \times 10^3$  cells/well 播種し、その際に miR-1289 模倣型合成核酸を 10 nM の濃度で Lipofectamine RNAiMAX を用いてリバーストランスフェクションした。72 時間培養した

後に WST-8 溶液を加え、吸光度を測定することにより細胞数を定量した。対照群と比較することにより、miR-1289 模倣型合成核酸がヒト口腔扁平上皮癌初代培養細胞の増殖に及ぼす影響を評価した。

#### (3) 口腔扁平上皮癌における miR-1289 の発現

口腔扁平上皮癌患者の原発腫瘍切除検体より腫瘍部と隣接正常部組織を採取し、ホモジナイズしたのちに ISOGEN (NipponGene) を用いて total RNA を抽出した。つづいて、miScript PCR system (miScript II RT Kit、miScript SYBR Green PCR Kit、miScript Primer Assays、Qiagen) を用いてリアルタイム定量 RT-PCR 法により miR-1289 の発現定量を行った。

#### (4) miR-1289 の標的遺伝子の探索

複数の培養ヒト口腔癌細胞 (GFP-SAS、HSC-2、Ca9-22) に合成 miR-1289 を 10 nM の濃度で Lipofectamine RNAiMAX を用いてトランスフェクションし、24 時間後に total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析にて複数のヒト口腔扁平上皮癌細胞株に共通して発現低下する遺伝子群を同定した。つづいて、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) の microRNA Target Filter を用いて発現低下遺伝子 mRNA の中で 3' 非翻訳領域 (UTR) に miR-1289 の結合配列を有する遺伝子を標的遺伝子候補として抽出した。つづいて、ルシフェラーゼ遺伝子の 3' 側に標的遺伝子候補の 3' UTR がクローニングされたベクター (GeneCopoeia) と合成 miR-1289 を細胞内に共に導入し、ルシフェラーゼ活性の低下を確認することにより、miR-1289 の標的遺伝子を最終的に同定した。

#### 4. 研究成果

ヒト口腔扁平上皮癌細胞ヌードマウス背部皮下移植腫瘍への miR-1289 模倣型合成核酸の局所投与は、腫瘍増殖を有意に抑制した。なお、合成核酸の投与中にマウスの体重変化は全く認められなかった。次に、複数のヒト口腔扁平上皮癌細胞株および口腔扁平上皮癌由来初代培養細胞に合成 miR-1289 を導入したところ、全ての細胞株と初代培養細胞に対して著明かつ有意な増殖抑制効果を示した。さらに、口腔扁平上皮癌切除検体では腫瘍部における miR-1289 の発現量は正常部と比較して有意に発現低下していた。つづいて、マイクロアレイ解析と IPA にて miR-1289 の標的候補を 15 種類抽出した。それら標的候補それぞれに対する合成 small interfering RNA (siRNA) を用いてヒト口腔扁平上皮癌細胞における増殖抑制効果を評価した結果、magnesium transporter 1 (MAGT1) に対する合成 siRNA が細胞増殖を最も顕著に抑制した。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞への合成 miR-1289 の導入では MAGT1 mRNA の発現低下が認められ、MAGT1 3' UTR を用いたルシフェラーゼレポーター

解析では、合成 miR-1289 の導入によりルシフェラーゼ活性の有意な低下が認められた。以上の結果より、口腔扁平上皮癌において miR-1289 が MAGT1 の発現抑制を介して癌抑制型 microRNA として機能していることが明らかとなった。また、miR-1289 模倣型合成核酸の抗腫瘍医薬品としての臨床応用の可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Goda H, Nakashiro K, Ogawa I, Takata T, Hamakawa H.

Peripheral ameloblastoma with histologically low-grade malignant features of the buccal mucosa: a case report with immunohistochemical study and genetic analysis.

Int J Clin Exp Pathol 8:2085-9,2015.

査読有

<http://www.ijcep.com/ISSN:1936-2625/1JCEP0004342>

Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T, Nakashiro K, Sugita A, Fujita T, Koido S, Homma S, Kawakami Y, Hamakawa H. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma.

PLoS One 9:e110378,2014.

査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0110378

Shikata F, Sakaue T, Nakashiro K, Okazaki M, Okamura T, Okura M, Ryugo M, Nakamura Y, Yasugi T, Higashiyama S, Izutani H.

Pathophysiology of lung injury induced by common bile duct ligation in mice.

PLoS One 9:e94550,2014

査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0094550

Tano T, Okamoto M, Kan S, Bando T, Goda H, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Fujita T, Sato M, Yamashita N, Hamakawa H, Kawakami Y.

Immunochemoradiotherapy for patients with oral squamous cell carcinoma: augmentation of OK-432-induced helper T cell 1 response by 5-FU and X-ray irradiation.

Neoplasia 15:805-14,2013.

査読有

DOI:10.1593/neo.13488

Tanaka H, Nakashiro K, Iwamoto K, Tokuzen N, Fujita Y, Shirakawa R, Oka R, Goda H, Hamakawa H.

Targeting Aurora kinase A suppresses the growth of human oral squamous cell

carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*.  
Oral Oncol 49:551-9,2013.

査読有

DOI:10.1016/j.oraloncology.2013.02.002

Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Sato M, Fujita T, Kawakami Y, Hamakawa H.

Prognostic impact of expression of Bcl-2 and Bax genes in circulating immune cells derived from patients with head and neck carcinoma.

Neoplasia 15:305-14,2013.

査読有

DOI:10.1593/neo.121528

Goda H, Nakashiro K, Oka R, Tanaka H, Wakisaka H, Hato N, Hyodo M, Hamakawa H.

One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma.

Oral Oncol 48:958-63,2012.

査読有

DOI:10.1016/j.oraloncology.2012.03.026

Mayorca-Guiliani AE, Yano H, Nakashiro K, Hamakawa H, Tanaka J.

Premetastatic vasculogenesis in oral squamous cell carcinoma xenograft-draining lymph nodes.

Oral Oncol 48:663-70,2012.

査読有

DOI:10.1016/j.oraloncology.2012.02.007

Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Yamashita N, Kawakami Y, Hamakawa H.

Growth inhibition and apoptosis by an active component of OK-432, a streptococcal agent, via Toll-like receptor 4 in human head and neck cancer cell lines.

Oral Oncol 48:678-85, 2012.

査読有

DOI:10.1016/j.oraloncology.2012.02.005

[学会発表](計 2 件)

中城公二、田中宏史、岩本和樹、徳善紀彦、浜川裕之、口腔癌診断・治療への microRNA の応用、シンポジウム「口腔癌研究のシーズを探す」、第 68 回日本口腔科学会学術集会、2014 年 5 月 9 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

中城公二、田中宏史、岩本和樹、徳善紀彦、日野聡史、浜川裕之、口腔扁平上皮癌の転移を支持する分子基盤の解明、シンポジウム「組織培養を用いた口腔癌研究の最前線 -発癌から医療への応用まで-」、第 50 回日本口腔組織培養学会学術大会、2013 年 11 月 24 日、日本歯科大学

命歯学部(東京都千代田区)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 6 件)

名称: Composition containing antisense oligonucleotide to microRNA

発明者: Nakashiro K, Hamakawa H, Tanaka H

権利者: National University Corporation Ehime University

種類: Patent

番号: US 8,889,649 B2

出願年月日: Nov. 12, 2010

取得年月日: Nov. 18, 2014

国内外の別: 国外

名称: 頭頸部癌の腫瘍マーカー

発明者: 中城公二、浜川裕之

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 5419195

出願年月日: 2007 年 8 月 3 日

取得年月日: 2013 年 11 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: Akt 遺伝子に特異的な siRNA

発明者: 中城公二、浜川裕之

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 5232990

出願年月日: 2006 年 11 月 8 日

取得年月日: 2013 年 4 月 5 日

国内外の別: 国内

名称: ADAT1 遺伝子に特異的な siRNA

発明者: 中城公二、浜川裕之

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 5103621

出願年月日: 2007 年 3 月 20 日

取得年月日: 2012 年 10 月 12 日

国内外の別: 国内

名称: 頭頸部癌の腫瘍マーカー

発明者: 中城公二、浜川裕之

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 4967112

出願年月日: 2005 年 6 月 22 日

取得年月日: 2012 年 4 月 13 日

国内外の別: 国内

名称: アンドロゲン受容体遺伝子に特異的な siRNA

発明者: 中城公二、浜川裕之

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号：4961549

出願年月日：2006年2月16日

取得年月日：2012年4月6日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中城 公一 (Nakashiro, Koichi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90314880