

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659897

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる舌痛症関連唾液microRNAの探索

研究課題名(英文)Identification of glossodynia-associated saliva microRNA with the use of next generation sequencing

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) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では舌痛症患者の唾液中に特異的に存在する microRNA (miRNA) の同定を試みた。次世代シーケンサーによる small RNA 解析では舌痛症患者特有の唾液 miRNA は同定できなかったが、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析では舌痛症患者由来唾液に共通して存在量が増加する miRNA を 6 種類同定した。これら miRNA は舌痛症の診断に応用できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to identify a specific microRNA (miRNA) in saliva derived from patients with glossodynia. By next generation sequencing, no specific miRNA was detected in saliva from glossodynia patients. In microarray analysis, we found 6 increased miRNAs in saliva from glossodynia patients. These miRNAs may be useful for diagnosis of glossodynia.

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：舌痛症 唾液 microRNA

1. 研究開始当初の背景

舌痛症とは、器質的な変化や血液検査値の異常を認めないにもかかわらず、舌に灼熱感やヒリヒリ、ピリピリした痛みを訴える病態で、更年期の女性に多い。近年、舌痛を訴える患者は増加しており、歯科や医科を受診するが適切な治療がなされていないのが現状である。舌痛の原因としては、カンジダ性舌炎や微量元素欠乏症などが挙げられ、舌痛症はそれらを除外診断として心因性と考えられるものとされている。実際に、抗うつ薬が奏効する場合もあるが、様々な薬物療法に抵抗性を示し難治症例となることも多い。このような舌痛症の原因については十分な解明がなされていない。一方、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。現在までに 1,972 種類のヒト miRNA がデータベース (miRBase Ver. 20) に登録されており、これら miRNA の発現あるいは機能異常が種々の疾患に關与していることが明らかにされている。最近ではヒト体液 (血清、血漿、唾液、尿など) 中に miRNA の存在が明らかにされ、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)。体液中を循環する miRNA は他の細胞に取り込まれ、そこで機能すると予測されている。したがって、唾液中の miRNA が口腔粘膜疾患に關与している可能性も十分に考えられる。

2. 研究の目的

舌痛症患者および健常者の唾液より miRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて唾液中の全ての miRNA を定性定量解析する。舌痛症患者の唾液において特異的に増加あるいは減少する miRNA およびそのバリエーションを同定する。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによる舌痛症患者特有の唾液 miRNA の探索
抗真菌薬、ビタミン剤、抗うつ薬、漢方薬など薬物療法に抵抗性を示し、かつサクソステトにより唾液分泌量の低下を認めない舌痛症患者 (2 名) と同年代同性の健常者 (2 名) の唾液 0.2 ml より miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて miRNA を抽出した。抽出前の唾液に外来性内部標準として合成センチュウ miR-39 (Qiagen) を添加した。唾液などの体液中には高濃度のヌクレアーゼが存在しており、naked な miRNA の半減期は数分であるが、唾液からは安定的に miRNA を検出することができる。これは、体液中の miRNA が exosome や high-density lipoprotein に封入されていたり、Ago-2 や

他の蛋白質と複合体を形成しているためと報告されている。本キットは、そのような存在状態に關係なく唾液中全ての miRNA を抽出することができる。抽出した miRNA より cDNA library を作成し、デスクトップ型次世代シーケンサー MiSeq (illumina) にて small RNA 解析を行った。

(2) マイクロアレイによる舌痛症患者特有の唾液 miRNA の探索

舌痛症患者 (6 名) と健常者 (4 名) の唾液 0.2 ml より miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて miRNA を抽出した。抽出した miRNA をビオチン化した後に、miRNA 3.1 Array Strip (Affymetrix) を用いて miRNA の網羅的発現解析を行った。つづいて、GeneSpring GX (Agilent) にてサンプル間の全ての miRNA の発現量を比較し、統計学的に有意な変動を認めた miRNA を抽出した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによる舌痛症患者特有の唾液 miRNA の探索

次世代シーケンサーを用いた解析では、ヒト唾液中には miR-1246 が最も多く、その他約 150 種類程度の miRNA が含まれていることが明らかとなった。しかしながら、舌痛症患者と健常者由来の唾液中で明らかに存在量が異なる miRNA は検出されなかった。

(2) マイクロアレイによる舌痛症患者特有の唾液 miRNA の探索

マイクロアレイを用いた解析では、健常者と比較して舌痛症患者の唾液において 6 種類の miRNA の存在量が有意に増加していた。

以上の結果より、次世代シーケンサーよりマイクロアレイの方が miRNA の検出感度において優れていること、舌痛症患者唾液中で特異的に存在量が増加していた miRNA は舌痛症の診断に応用できる可能性があることが示された。

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 6 件)

1. 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(7):805-14, 2013, 査読有

2. 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(6): 551-9, 2013, 査読有
3. 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(3):305-14, 2013, 査読有
4. 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(10):958-63, 2012, 査読有
5. Mayorca-Guilliani AE, Yano H, Nakashiro K, Hamakawa H, Tanaka J. Premetastatic vasculogenesis in oral squamous cell carcinoma xenograft-draining lymph nodes. *Oral Oncol* 48(8):663-70, 2012, 査読有
6. 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(8):678-85, 2012, 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 中城公一、岩本和樹、徳善紀彦、田中宏史、浜川裕之：口腔扁平上皮癌における mRNA/microRNA 発現の統合解析、第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2014 年 1 月 23, 24 日、札幌
2. 中城公一、田中宏史、徳善紀彦、岩本和樹、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、第 50 回日本口腔組織培養学会学術大会、2013 年 11 月 23, 24 日、東京

3. Iwamoto K, Nakashiro K, Tanaka H, Oka R, Tokuzen N, Hamakawa H: Identification of a novel tumor suppressive microRNA in human oral cancer cells. 21st International Conference of Oral and Maxillofacial Surgery, 2013.10.21-24, Barcelona, Spain
4. 岩本和樹、中城公一、田中宏史、徳善紀彦、岡 亮太、浜川裕之：口腔扁平上皮癌における microRNA-629 の発現と機能、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、横浜
5. 中城公一、岩本和樹、岡 亮太、合田啓之、浜川裕之：口腔扁平上皮癌センチネルリンパ節生検への OSNA 法応用の試み、第 15 回 SNNS 研究会学術集会、2013 年 9 月 20, 21 日、釧路
6. 中城公一、岩本和樹、岡 亮太、田中宏史、浜川裕之：口腔悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験の有用性、第 67 回日本口腔科学会学術集会、2013 年 5 月 22-24 日、宇都宮
7. 田中宏史、中城公一、岩本和樹、徳善紀彦、浜川裕之：MicroRNA-133a/b のヒト口腔癌細胞の増殖における役割、第 67 回日本口腔科学会学術集会、2013 年 5 月 22-24 日、宇都宮
8. 岩本和樹、中城公一、田中宏史、岡 亮太、浜川裕之：ヒト口腔癌細胞における microRNA-629* の増殖抑制効果、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況(計 5 件)

1. 名称：頭頸部癌の腫瘍マーカー
発明者：中城公一、浜川裕之
権利者：国立大学法人愛媛大学
種類：特許
番号：第 5419195 号
取得年月日：2013 年 11 月 29 日
国内外の別：国内
2. 名称：Akt 遺伝子に特異的な siRNA
発明者：中城公一、浜川裕之
権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特許
番号：第 5232990 号
取得年月日：2013 年 4 月 5 日
国内外の別：国内

3．名称：ADAT1 遺伝子に特異的な siRNA
発明者：中城公一、浜川裕之
権利者：国立大学法人愛媛大学
種類：特許
番号：第 5103621 号
取得年月日：2012 年 10 月 12 日
国内外の別：国内

4．名称：頭頸部癌の腫瘍マーカー
発明者：中城公一、浜川裕之
権利者：国立大学法人愛媛大学
種類：特許
番号：第 4967112 号
取得年月日：2012 年 4 月 13 日
国内外の別：国内

5．名称：アンドロゲン受容体遺伝子に特異的な siRNA
発明者：中城公一、浜川裕之
権利者：国立大学法人愛媛大学
種類：特許
番号：第 4961549 号
取得年月日：2012 年 4 月 6 日
国内外の別：国内

〔その他〕

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