

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792174

研究課題名(和文) 口腔癌におけるECMタンパクDPTを中心とした転移抑制機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of mechanisms of metastasis suppression centered around DPT, extracellular matrix protein in oral cancer

研究代表者

大和地 正信 (YAMATOJI, Masanobu)

筑波大学・附属病院・医員

研究者番号：70451747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がんでは、細胞外基質に存在するタンパクDermatopontin(DPT)の発現が有意に低下し、がん細胞の転移と関連することが示されてきた。今回、DPTの発現を調節するmicroRNAを選び出し、がんの転移の抑制につながるmicroRNAを探し出すことを試みた。その結果、主なmicroRNAについて口腔がんで発現の変化のある数種類のmicroRNAを選び出したが、その中にDPTの発現を変化させるmicroRNAはみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Dermatopontin (DPT) which exists extracellular matrix was significantly down-regulated and was indicated its expression related to cancer metastasis. We tried to find out microRNA which controls DPT expression and yields a clue of cancer metastasis. As a result, several kinds of microRNA was picked out in oral cancer, but microRNA which changes DPT expression wasn't seen in those.

研究分野：口腔がん

キーワード：Dermatopontin microRNA 口腔がん

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、原発部位から一連の複雑な段階を経て転移に至るが、律速段階である細胞移動と転移巣形成に関わる微小分子の挙動は不明な点が多い。がん細胞の転移能は、その細胞表面分子と隣り合う細胞や細胞外基質を含む微小環境との相互作用に依存し、細胞接着分子の発現変化をはじめ複数の遺伝子が原発腫瘍の増殖や転移に関連することが報告されている。microRNAは一本鎖の低分子RNAであり、細胞内で標的遺伝子であるmRNAに対しその相補性の度合いに応じて翻訳の抑制または分解を促進する。したがって部分的に相補性のあるmicroRNAを用いてある配列の遺伝子を抑制することが可能であり、がんの新規治療法の開発に役立つとされる。以前よりAffymetrix社製ヒト全遺伝子搭載microarrayを用いて口腔がん組織におけるさまざまな遺伝子発現について解析を行い、これまで口腔がんの転移抑制遺伝子としてDermatopontin(DPT)を同定した(Yamatoji *et al.*, *Int J Cancer* 2012)。口腔がんではintegrinのECMリガンドの一つであるDPTが減少し、integrinを介した細胞接着能が低下するため、TGF- β シグナルの活性化がEMTを促進し、がん細胞の浸潤が促進されることが示唆された。この結果をもとにDPTの発現に関わるmicroRNAを用いて口腔がんの転移抑制を意図した研究を開始した。

2. 研究の目的

上述したように口腔がんでは *in vitro* および *in vivo* でDPTの発現が有意に低下し、その発現はがん細胞の接着/転移能に関与することが示唆された。本研究は、DPTの発現に関わるmicroRNAを用いた新規のがん治療法の開発を念頭に基礎的なmicroRNAの発現/機能解析および同定を目的とした。

3. 研究の方法

定常状態の口腔扁平上皮がん (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 由来細胞株と、正常ヒ

ト表皮ケラチノサイト(HaCaT)の microRNA の網羅的な発現解析を行った。OSCC 由来細胞株は SAT, KON, HO-1-u-1, SAS, SCC-4 の5種を、そのコントロールとして HaCaT を用いた。

(1) microRNA の抽出/逆転写

QIAGEN 社製の miRNeasy Mini Kit を用いて OSCC 由来細胞株および HaCaT から totalRNA を抽出した。吸光度測定の後、同社製 miScript II RT Kit を用いて mature な microRNA の逆転写を行った。

(2) PCR Array による網羅的発現解析

種々のがんが発現変異が報告されている約 100 種類の microRNA について発現解析を行った。QIAGEN 社製 miScript miRNA PCR Array Human Cancer Pathway Finder を用い、上記 1)にて抽出/逆転写した OSCC 由来細胞株および HaCaT の microRNA の PCR array を行った。

(3) 組織 microRNA の PCR array による発現解析

臨床検体として口腔がん組織、周囲健常組織を用いて 1)および 2)と同様に microRNA の抽出/逆転写/PCR array を行い、その発現状態を比較した。

(4) 唾液/血清 microRNA の PCR array による発現解析

臨床検体として口腔がん担癌患者および健常者の唾液/血液から QIAGEN 社製 miRNeasy Serum/Plasma Kit を用いて microRNA を抽出し、上記と同様の方法にて逆転写し、PCR array にてその発現状態を比較した。

(5) 候補 microRNA のトランスフェクション

上記 2)~4)によって数種類に絞り込まれた候補 microRNA を OSCC にトランスフェクションし、DPT の発現変化を検討した。

(6) データベース上で DPT の発現に関与することが示唆される micro RNA の発現状態を検討した。

4. 研究成果

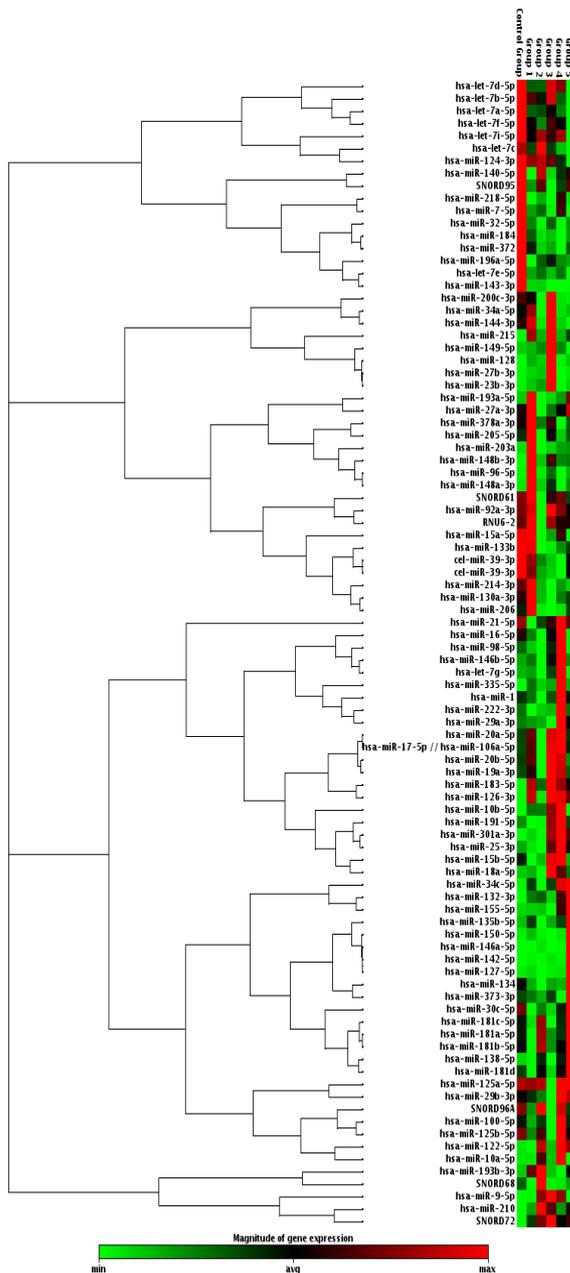
(1) microRNA の抽出/逆転写

5 種類の OSCC 由来細胞株および HaCaT から totalRNA を抽出した。続いて mature な microRNA の逆転写を行った。

(2) PCR array による網羅的発現解析

主要な既知の約 100 種類の microRNA Primer が搭載された PCR Array を 5 種類の OSCC 由来細胞株および HaCaT について行った結果、図 1 のようになった。

図 1. OSCC 由来細胞株と HaCaT の microRNA の発現状態の比較

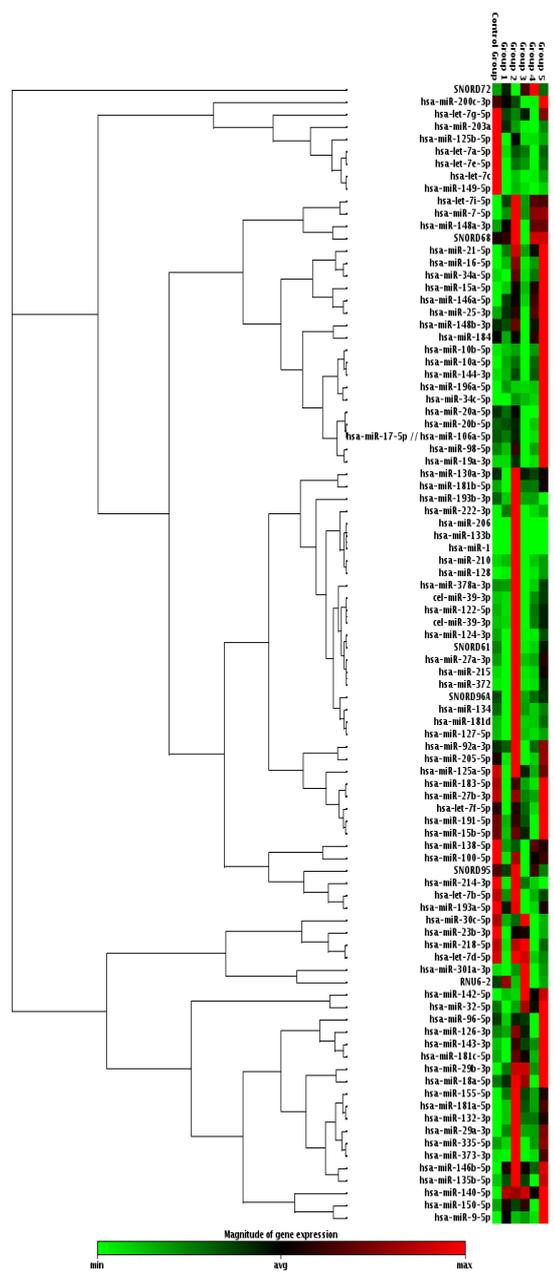


この結果 let-7 family である let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p などに有意な発現減弱が認められた。

(3) 組織 microRNA の PCR array による発現解析

臨床検体として口腔がん組織、周囲健常組織を用いて PCR Array を行った結果、図 2 のようになった。

図 2. 組織における microRNA の発現状態の比較

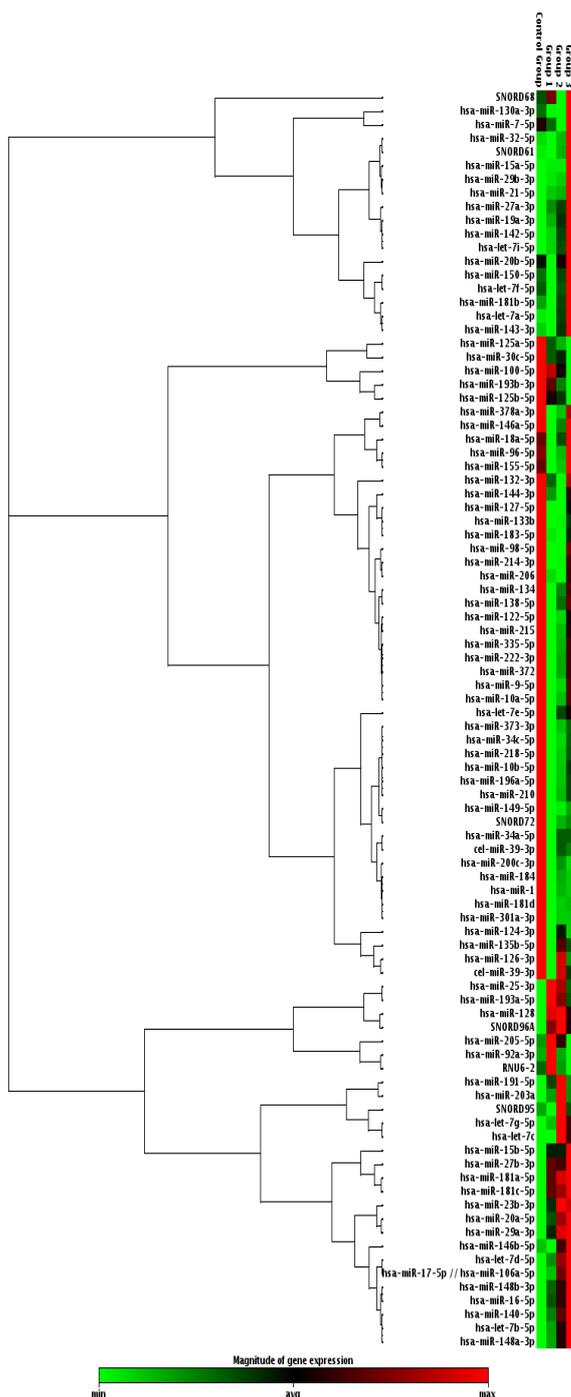


この結果 let-7 family である let-7a-5p, let-7c, let-7e-5p, let-7g-5p や miR-125b, miR-203a, miR-149 は有意な発現減弱が認められた。

(4) 唾液/血清 microRNA の PCR array による発現解析

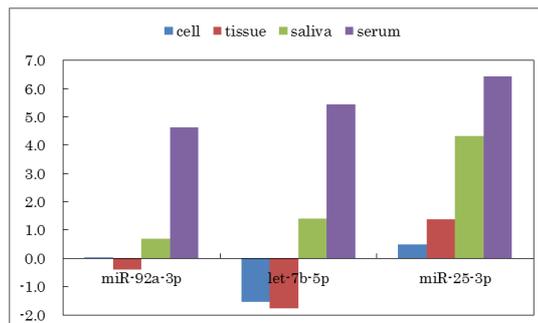
口腔がん担癌患者および健常者の唾液中の microRNA の PCR array を行った結果, 図 3 のようになった。

図 3. 唾液 microRNA の発現状態の比較



OSCC 由来細胞株, 口腔がん組織, 担癌患者の唾液, 血清の microRNA で共通して発現変化を認めたものは図 4 のようになった。

図 4. 細胞株, 組織, 唾液, 血清で共通して発現変化を示す microRNA (数値は fold change)



(5) microRNA のトランスフェクション

候補 microRNA として let-7b-5p, miR-25-3p を OSCC 由来細胞株にトランスフェクションし, 発現変化を Western blot で検討した. その結果, DPT のタンパク発現に有意な発現変動は認められなかった。

(6) DPT の発現に関与することが示唆される micro RNA についてデータベース上で検索し, 3 種類の microRNA (miR-4441, miR-4752, miR-3158-5p)の OSCC 由来細胞株における発現状態を Real-time PCR 法で検討した. その結果, OSCC 由来細胞株における miR-4441, miR-4752, miR-3158-5p の発現は正常細胞と比べ, 統計的に有意な発現亢進は認めなかった。

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 0 件)

なし

〔 学会発表 〕 (計 0 件)

なし

〔 図書 〕 (計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

なし

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

なし

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

大和地 正信 (YAMATOJI, Masanobu)

筑波大学・附属病院・医員

研究者番号：70451747

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：