

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670867

研究課題名(和文) 口腔癌における血清エクソソームを用いた診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method using serum exosomes of oral cancer patients

研究代表者

國藤 潤 (KUNITO, Jun)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90714452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の発症、さらに予後を左右する重要な因子である再発・転移は比較的進行してからでないと診断が困難であり、従来の診断法より非侵襲的で、高精度の診断法の確立が待たれている。近年、non-coding RNAの一種であるmicroRNA(miRNA)が、癌の発症、悪性伸展や治療抵抗性に関与することが明らかにされつつあることから、本研究では癌細胞分泌エクソソームに内包されるmiRNAに着目し、口腔扁平上皮癌患者血清エクソソームに含まれる幾つかのmiRNAを定量し、非癌患者の定量結果と比較検討を行った。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to diagnose the onset of oral squamous cell carcinoma as well as recurrence / metastasis, which is an important factor influencing prognosis. Establishment of more non-invasive and highly accurate diagnosis method than the conventional method is needed. Recently, it has been clarified that microRNA (miRNA) which is one type of non-coding RNA is involved in cancer onset, malignant transformation and resistance to treatment. Therefore, in this study, we focused miRNAs contained in serum exosomes of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). We identified some miRNAs expressed specifically in OSCC cells and compared the expression level between oral cancer patients and non-cancer patients.

研究分野：口腔外科

キーワード：エクソソーム マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の転移の頻度は比較的高く、頸部リンパ節転移は全患者の約 40%、遠隔転移は約 6~7%に生じ、予後に影響を与える重要な因子となっている。また、外科療法による治療成績は、2年無病生存率 47%で再発率が高いことが報告されている¹⁾。通常、口腔癌の診断は、視診、触診を行い、癌が強く疑われる場合には生検を行うとともに、血液検査による腫瘍マーカーの測定や、CT、MRI、超音波検査などの画像検査を行って統合的に判断するが、これらの診断法では、腫瘍のサイズがある程度大きくならなければ癌と診断することは困難であり、さらに、最終診断法として頻用される生検では組織を一部切除するため、外科的侵襲による患者への身体的、精神的ストレスが少なくない。また、血液を用いて測定する腫瘍マーカーは特異性が低く、値の上昇をみない症例も多数ある。

エクソソームは、エンドソームから形成される直径30から100nmの脂質二重膜で覆われた膜小胞で、癌細胞、免疫担当細胞など多様な細胞から細胞外に分泌され、血清、母乳、尿等に存在が認められている。内部に蛋白質や脂質、mRNA、miRNAなどの様々な物質を内包し、近年、排出されたエクソソームが他の細胞内に取り込まれ、内包物質を介して取り込んだ細胞の様々な機能に影響を及ぼすことが明らかにされ、エクソソームが細胞間情報伝達物質として機能していると考えられるようになってきている。

近年、タンパク質をコードしない Non-coding RNA が全 RNA の 98%を占め、細胞内で多岐にわたる機能を有することが明らかになりつつあるが、そのうち miRNA は、様々な癌においてその発現異常が癌の悪性進展や予後と関連することが報告され、腫瘍マーカーや治療標的としての可能性が示唆されるようになってきている。癌細胞由来の miRNA は、がん化、浸潤、転移などと密

接に関与することが明らかとなり、これまで血清中の miRNA を直接測定することで癌の診断に応用しようとする試みがなされているが、miRNA は血清中の RNase などの酵素により分解されやすく、定量しても癌の病態を正確に反映できていない可能性がある。その点、エクソソームに内包される miRNA は分解酵素の影響を受けにくく、安定して存在できる可能性が考えられる²⁾。そこで、本研究では患者への侵襲が少なく、且つ高精度の診断法の確立を目指して、血液検査時に併せて患者の血清から回収できるエクソソームに着目し、エクソソームに内包される幾つかの miRNA の発現レベルを定量解析することにより癌の早期診断および再発・転移の予測が可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌細胞株および正常口腔粘膜上皮細胞を用いた miRNA のマイクロアレイ解析を行い、口腔扁平上皮癌で特異的に発現上昇、発現低下を示す幾つかの miRNA を同定するとともに、患者血清中のエクソソームから miRNA を抽出し、同定した口腔扁平上皮癌で発現異常を示す miRNA の発現レベルを定量し、癌の症例と非癌症例、再発・転移症例と経過良好例との間での比較検討や、初発から後発頸部リンパ節転移が生じるまでの値の推移を解析することで、癌の診断に有効な miRNA を明らかにする。

3. 研究の方法

当科で樹立した 6 株の株化口腔扁平上皮癌細胞より RNA を抽出し、正常口腔粘膜上皮細胞をコントロールとして miRNA アレイ解析を行い、いずれの株化細胞においてもコントロールに比べ 10 倍以上の発現増強を示す、或いは 0.1 倍以下の発現低下を示す miRNA

を同定する。

口腔癌患者およびコントロール群の血液検査時に、検査後の残血清を回収し、血清に存在するエクソソームから miRNA を抽出し、同定した口腔扁平上皮癌で発現異常を示す miRNA の発現レベルを定量し、口腔癌症例とコントロール群との間で、その発現レベルの比較検討を行う。

<口腔癌対象症例>

- ・口腔扁平上皮癌初発症例
- ・再発症例
- ・後発頸部リンパ節転移症例

<コントロール群>

同期間に口腔癌以外の疾患(唾石症、骨髄炎、嚢胞性疾患など)で入院時血液検査を行う症例

4. 研究成果

マイクロアレイ解析

いずれの株化細胞においてもコントロールに比べ 10 倍以上の発現増強を示した miRNA を 9 種類、0.1 倍以下の発現低下を示した miRNA を 13 種類同定した(図 1)。

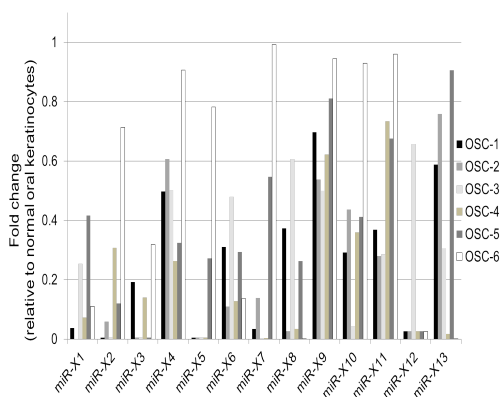


図 1 : 口腔扁平上皮癌細胞株で
発現低下を示す miRNA

舌癌組織における miR-X1 の発現

舌癌 16 症例のパラフィン包埋組織より正常組織および癌組織を採取し、RNA を抽出した後、リアルタイム PCR を行った結果、

癌部においては 2 例を除き、隣接した正常組織と比べて miR-X1 の発現が低下しており、癌部における miR-X1 の発現強度の平均はコントロールの約 0.65 であった(図 2)。

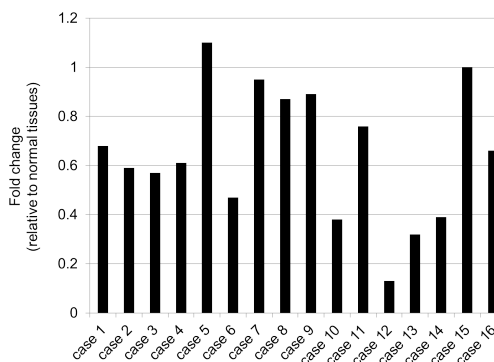


図 2: 舌癌組織における miR-X1 の発現

株化口腔扁平上皮癌細胞分泌エクソソームにおける miR-X1 の発現

miR-X1 が OSC-3 および OSC-4 細胞由来のエクソソームに含まれているかをリアルタイム PCR 法を用いて検討した結果、OSC-3 および OSC-4 細胞分泌エクソソーム内に miR-X1 が含まれることが確認された(図 3)。

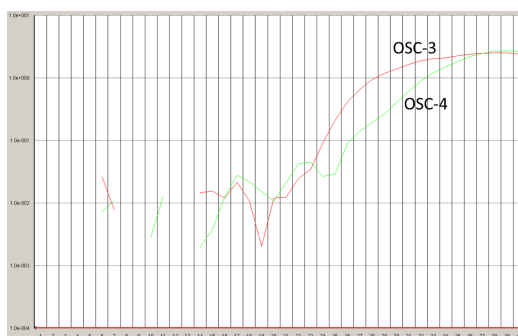


図 3: エクソソームにおける miR-X1 の発現

患者血清エクソソームにおける miRNA の発現

健康人 27 例と口腔扁平上皮癌症例 29 症例の血清エクソソームより RNA を抽出し、株化細胞において発現増強を示した miRNA のうち 4 種類、0.1 倍以下の発現低下を示した 6 種類の miRNA の発現解析を行った。その結果、幾つかの miRNA に発現差は認められた

ものの、有意差は認められなかった。

<参考文献>

- 1) Blatt S, Krüger M, Ziebart T, Sagheb K, Schiegnitz E, Goetze E, Al-Nawas B, Pabst AM. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. J Craniomaxillofac Surg. 2017 45(5):722-730.
- 2) Joyce DP, Kerin MJ, Dwyer RM. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. Int J Cancer. 2016 139(7):1443-8.

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)

[学会発表](計 0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm

6 . 研究組織

(1)研究代表者

國藤 潤 (KUNITO, Jun)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90714452

(2)研究分担者

山本 哲也 (YAMAMOTO, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部

門・教授

研究者番号：00200824

笹部 衣里 (SASABE, Eri)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部

門・講師

研究者番号：40363288

北村 直也 (KITAMURA, Naoya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部

門・講師

研究者番号：70351921