

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06626

研究課題名(和文) MicroRNAと標的遺伝子による口腔癌の癌抑制ネットワークの制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of network related tumor suppressor miRNA in oral cancer

研究代表者

篠塚 啓二 (SHINOZUKA, Keiji)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30431745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：正常口腔上皮細胞株と口腔癌細胞株について、リアルタイムPCR法によるmiRNAアレイ解析を行い、同定されたmicroRNAとその標的遺伝子について、Ingenuity Pathway Analysis softwareを用いて、癌関連遺伝子ネットワーク解析を行ったところ、TGF- β を中心としたネットワークが形成された。このことから、口腔癌の発癌メカニズムが明らかとなり、TGF- β を制御することが口腔癌の診断・治療に役立つ可能性を示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed miRNA microarray analysis in oral squamous cell carcinoma (OSCC)-derived cell lines. We identified candidate microRNAs for molecular targeting. Our findings may contribute to an understanding of key biologic functions and pathways of certain microRNAs associated with OSCC, and the expression status of TGF- β may play an important role in the progression and prognosis of this disease. In addition, the differential expression status of TGF- β may provide insights into the process of tumorigenicity and for planning new treatment strategies

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 microRNA ネットワーク解析 microRNAアレイ解析 癌関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ゲノムネットワーク研究は、DNA-RNA-タンパク間のゲノム情報の流れ、およびゲノム情報発現をネットワークとして捉えるプロジェクトである。近年、このネットワークにおけるノンコーディング RNA の機能に注目が集まっている。ノンコーディング RNA (non-coding RNA) はタンパク質へ翻訳されずに機能する RNA の総称であり、非翻訳性 RNA (non-translatable RNA) ともいう。non-coding RNA は tRNA、rRNA、mRNA-like non-coding RNA、snRNA、microRNA などがあるが、特に microRNA は近年、生体内でさまざまな遺伝子の発現抑制を行う分子として注目されており、microRNA の機能の異常がヒトの疾患、とくに癌の発生にかかわることが明らかにされてきた。これらの microRNA の機能を標的とした治療法が現在模索されており、過剰発現や不足している microRNA の発現を抑制したり、補うことで、癌の治療が可能となることが期待されている。そこで、microRNA に注目し、microRNA array 技術を用いて、ヒト口腔癌組織と正常組織における microRNA の発現状態を網羅的に調べた結果、口腔癌において、癌制御 microRNA 遺伝子、癌促進 miRNA 遺伝子を同定した。これらの同定した microRNA に関する発展させた研究である。

2. 研究の目的

本研究では、同定した microRNA に関して、発癌との関連の再現性を確認すると共に、口腔癌の増殖能、遊走・浸潤能、転移能に影響するかどうかを指標とした microRNA の機能解析を行った。さらに、microRNA と口腔癌関連遺伝子間に存在する、microRNA により発現制御される遺伝子ネットワークを解明した。これらを解明することにより、口腔癌における microRNA を標的とした全く新しいタイプの新しい診断および治療開発を目指した。

3. 研究の方法

口腔癌由来細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22, KON, SCC4, OK92, OSC19, Sa3, H1) 正常口腔粘膜上皮細胞株を用いて以下の実験を行った。

- (1) 口腔癌組織、口腔正常粘膜上皮細胞より total RNA を抽出する。
- (2) 抽出した total RNA から micro RNA が含まれる 21~23 塩基程度の大きさの small RNA を small RNA 抽出専用キッ

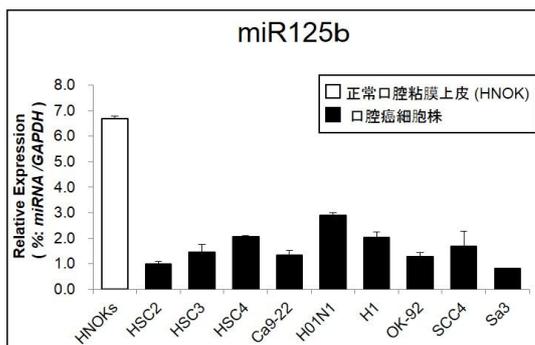
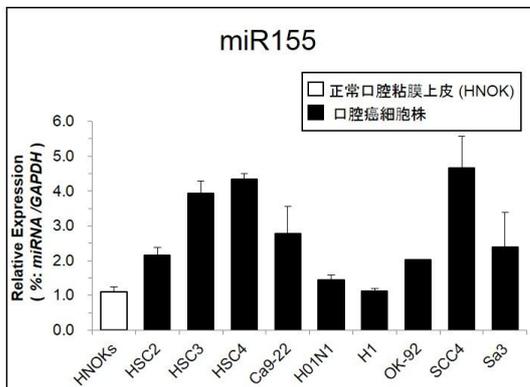
トを用いて抽出する。

- (3) 現在報告されているヒト miRNA752 種類のプローブを搭載したリアルタイム PCR 法による miRNA アレイ (miRCURY LNA) 解析によるプロファイリングを行う。
- (4) 本アレイを用いて口腔癌組織、口腔正常粘膜上皮細胞それぞれにおける micro RNA の発現状態を網羅的に明らかにする。
- (5) 口腔癌で特異的な発現が認められる micro RNA を選別する (以後、口腔癌関連 micro RNA と記述する)。
- (6) 口腔癌関連 micro RNA が関与する、ターゲット遺伝子 (mRNA) を検索し、以前に行った、cDNA マイクロアレイによる総合的・網羅的な遺伝子発現プロファイリング・データベースをさらに活用し、ターゲット遺伝子の中から、口腔癌細胞株で正常株と比較し、発現様式が有意に変化を示した遺伝子 (標的遺伝子) を同定する。
- (7) 口腔癌細胞株を用いて、Inhibitor あるいは Precuesor 導入により候補 microRNA の発現を過剰発現あるいは発現抑制させる。インヒビターとしては、Anti-miRNA Inhibitor、アゴニストには Pre-miR miRNA Precursor Morecule を用いる。遺伝子導入の際には、microRNA の発現を定量的にモニタリングするために、pMIR-Report miRNA Expression Reporter Vecto も同時に導入しておく。後の実験で、microRNA の発現のモニタリングはルシフェラーゼ活性を蛍光で定量化し、またトランスフェクションの効率率は β ガラクトシダーゼの活性で確認する。
- (8) (7)での形質転換細胞の変化より、形質転換細胞の性質 (増殖・分裂・形態・浸潤・転移など) の変化を観察し、microRNA の口腔癌組織における機能を評価する。評価の方法としては、増殖・分裂については BrdU の取り込みをフローサイトメトリーを用いてモニターし、Cell cycle の異常を検出する。浸潤については、Wound healing assay, Boyden chamber 法を用いて評価する。
- (9) 口腔癌関連 micro RNA を用いた標的遺伝子について、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software を用いて、Ontology 解析を行い、癌関連遺伝子ネットワークの解析を行う。また、細胞周期、接着、タンパク分解、転写、翻訳といった癌関連経路のネットワー

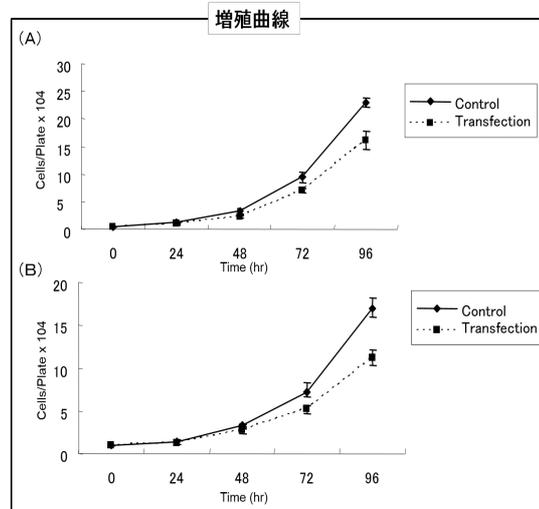
ク解析も行う。これらを行うことで、microRNA に制御される遺伝子ネットワークが明らかになり、さらに発癌のメカニズムを解明する。

4. 研究成果

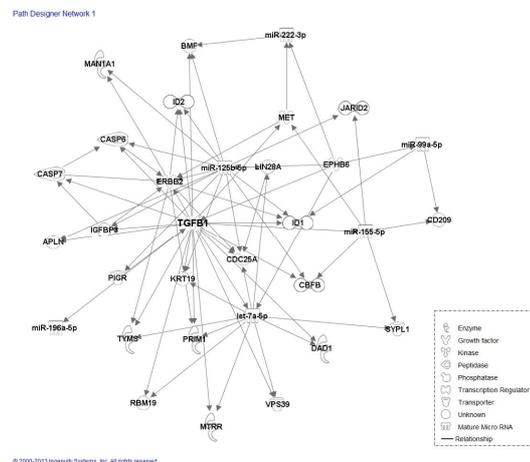
本研究において、正常口腔粘膜上皮細胞株と口腔癌細胞株を用いて、リアルタイム PCR 法による miRNA アレイ (miRCURY LNA) 解析によるプロファイリングを行った結果、正常口腔粘膜上皮と比較して口腔癌細胞株で著明な発現変動を示し、口腔癌に関与していることが示唆される miRNA を同定した。そのうち、以前に行った NCode™ Human miRNA Microarray V3 を使用してマイクロアレイ解析を行った結果とも比較し、共通して特に口腔癌細胞株で強発現していた miRNA は、miR-155 であった。一方、発現減弱していた miRNA は、miR-125b であった。



口腔癌細胞株 HSC2 を用いて、miR-155, miR-125b を遺伝子導入し、増殖能に関して検討を行った。その結果、miR-155 を発現抑制した細胞株と miR-125b を過剰発現させた細胞株はコントロール群と比較して、増殖能が有意に抑制されていた (A : miR-155, B : miR-125b)。



続いて、口腔癌関連 micro RNA が関与する、ターゲット遺伝子 (mRNA) を検索し、IPA Software を用いて、ネットワーク解析を行ったところ、TGF- を中心とするネットワークが形成された。



また、Ontology 解析を行った結果において、Function としては、Cell Death, Cellular Growth and Proliferation に関与するネットワークである結果を得た。

以上より、同定した microRNA は、口腔癌において、発症・進展に重要な機能を有していると考えられ、TGF- を制御することによる今後の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての可能性が示唆された。

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 3 件)

- 1) Shinozuka K, Ichinokawa Y, Hanaue N, Ohara K, Shimizu O, Kaneko T, Tonogi M, Ohki H, Hemiatrophy of the tongue and hypoglossal nerve palsy presenting with hypoglossal schwannoma: A rare case report. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol, 2017 (in press) 査読有
- 2) Noguchi H, Iwase T, Omagari D, Asano M, Nakamura R, Ueki K, Shinozuka K, Kaneko T, Tonogi M, Ohki H, Rapid detection of Candida albicans in oral exfoliative cytology samples by loop-mediated isothermal amplification. J Oral Sci, 2017 (in press) 査読有
- 3) Shinozuka K, Tang H, Jones RB, Li D, Nieto Y, Impact of polymorphic variations of gemcitabine metabolism, DNA damage repair, and drug resistance genes on the effect of high-dose chemotherapy for relapsed or refractory lymphoid malignancies. Biol Blood Marrow Transplan, 2016, 843-849. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

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)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠塚 啓二 (SHINOZUKA, Keiji)
 日本大学・歯学部・助教
 研究者番号：30431745

(2) 研究分担者

研究者番号： ()
 (3) 連携研究者 ()
 研究者番号： ()
 (4) 研究協力者 ()