

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592136

研究課題名（和文） 癌特異的エピゲノム異常を指標とした口腔癌抑制microRNAの網羅的探索

研究課題名（英文） Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer

研究代表者

小崎 健一 (KOZAKI KEN-ICHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50270715

研究成果の概要（和文）：本研究では口腔癌の新たな診断・治療体系の構築に寄与すべく、癌特異的エピゲノム異常を指標とした癌抑制遺伝子型 microRNA (miRNA)の網羅的探索と詳細な解析を強力に推進し、*miR-218*と*miR-585*を同定した。さらに Rictor が *miR-218*の新規標的分子であることを明らかにした。TOR-Akt シグナル経路を抑制する *miR-218*が、口腔癌の新規治療法の開発や個別化医療の実現などに大きく貢献しうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed function-, methylation- and expression-based screening in oral cancer cell lines, and identified two novel tumor-suppressive microRNAs, *miR-218* and *miR-585*, silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. Moreover, we found that Rictor is a novel target of *miR-218*, suggesting that *miR-218* targeting Rictor may provide a novel strategy for the treatment of oral cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究開始前に申請者は、癌転移の分子機序に関する多角的な研究を行うとともに、口腔扁平上皮癌および口腔前癌病変の外科切除組織の収集・保存ならびに詳細な解析を推進してきた。一方、研究分担者らは自作の高密度 bacterial artificial chromosome (BAC)-based array を実用化し、comparative genomic hybridization (CGH)法と豊富なゲノム情報やゲノム資源を基盤とした高感度且つゲノムワイドなアレイ CGH 技術を独自

に確立するとともに、申請者らとの多種類の癌細胞株を用いたゲノム・エピゲノム解析によって、多数の新規癌関連遺伝子群を同定し、報告してきた。

(2) microRNA (miRNA)は蛋白質へ翻訳されない non-coding RNA であるが、遺伝子サイレンシングなどにより標的分子の発現を阻害することによって、発生・分化のみならず、古典的な癌遺伝子や癌抑制遺伝子と同様に様々な癌種の発症・進展過程における分子機

序へ深く関与することが明らかにされつつあった。また、miRNA の発現プロファイルによる癌の個別診断法や予後予測法の開発、あるいは新たな抗癌剤として siRNA (shot interfering RNA) などのアンチセンス核酸医薬への臨床応用も期待されていた。しかし、本研究開始時には、miRNA と癌との関連性や標的分子を含めた分子機序が解明された miRNA は極めて少なく、口腔癌における報告も皆無であった。

(3) 国内外での miRNA 研究は、本研究開始時には既に活発化しつつあり、年間に発表される英文論文数は現在に至るまで指数関数的に増大してきた。また、申請者らの世界に先駆けた研究成果(*Cancer Res.*, 2008)の後に、癌でエピゲノム異常を受ける癌抑制遺伝子型 miRNA が欧米の研究グループからも相次いで報告されてきたが、癌抑制遺伝子型 miRNA 遺伝子の単離・同定をエピゲノム異常の網羅的あるいは機能的スクリーニングから展開させる報告は本研究開始時には皆無であり、現在でも極少数であるため、これまでの研究実績と技術的な安定性を基盤にした本研究の独自性は極めて高いと考えられる。

2. 研究の目的

癌遺伝子や癌抑制遺伝子に関する研究の飛躍的な進展により、「癌は遺伝子の病気」として発癌に関するメカニズムが徐々に解明され、予防・診断・治療に臨床応用されつつある。しかし、口腔前癌病変の癌化あるいは口腔癌の術後再発に関する知見は未だ乏しく、その克服には口腔癌の発症・進展や多様な悪性形質の獲得に関わる分子機序についての詳細な解明が必須である。本研究では口腔癌の新たな診断・治療体系の構築に寄与すべく、近年、ゲノム情報発現系の新たな調節・制御分子として注目されている miRNA に着目し、癌特異的エピゲノム異常を指標とした口腔癌抑制 miRNA の網羅的探索と詳細な解析を強力に推進することによって、口腔癌の発症・進展過程における miRNA とその(癌遺伝子様)標的分子を中心とした新たな分子機序の解明と本研究成果に基づいたテーラーメイド医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

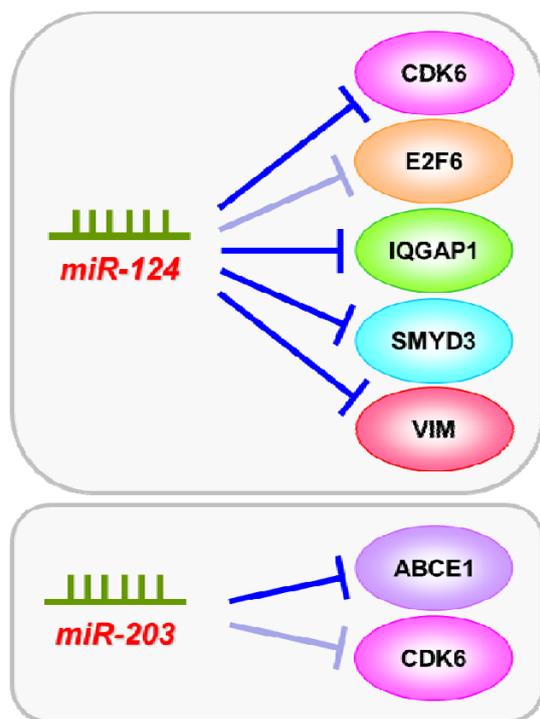
(1) 本研究では癌細胞株における DNA 過剰メチル化を指標とした網羅的スクリーニングに定量的発現解析を組み合わせた絞り込み、さらに癌部/非癌部組織が揃ったペア検体を用いた臨床検体レベルでの検討と *in vitro* 解析系による詳細な機能的解析によって、新規癌抑制遺伝子型 miRNA の同定を進めるとともに、同定した各 miRNA の標的分子の同

定とそれらの分子機序の解明を試みた。
(2) 327 種類の miRNA 配列を搭載した合成二本鎖 RNA ライブラリー(Ambion 社)を用いて、*in vitro* 細胞増殖抑制活性を指標とした機能的スクリーニング法による網羅的探索を行い、さらに細胞株ならびに臨床検体における DNA メチル化解析と発現解析を組み合わせた絞り込みによって新規癌抑制遺伝子型 miRNA の同定を進めるとともに、同定した miRNA の標的分子の同定とそれらの分子機序の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) **DNAメチル化スクリーニングによる癌抑制遺伝子型miRNAの網羅的探索:** 本研究では、口腔扁平上皮癌(OSCC)と肝細胞癌(HCC)でのDNA過剰メチル化を指標とした網羅的スクリーニングによって癌抑制遺伝子型miRNAの探索を行った。先行したHCCにおける解析では、5'側近傍500bp以内にCpG islandが存在する39種類のmiRNA(43 CpG island)についての細胞株を用いた網羅的DNAメチル化解析に定量的発現解析を組み合わせた絞り込みの結果、HCC細胞株ならびに臨床検体においてDNA過剰メチル化と発現抑制が高頻度に一致する *miR-124* と *miR-203* を選出し、癌抑制遺伝子としての抗腫瘍活性を機能的に明らかにするとともに、CDK6 など計7種類の直接的な標的分子を同定した(図1: Furuta et al., *Carcinogenesis*, 2010)。一方、OSCCにおいてもHCCと同様に細胞株

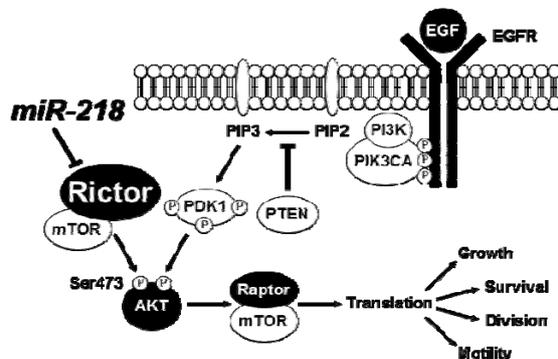
図1 HCCで同定した癌抑制遺伝子型 miRNAとその標的分子



を用いてCpG island近傍に座位する 51 種類のmiRNA (42 CpG island)についてのDNAメチル化解析に定量的発現解析を組み合わせた絞り込みを行い、OSCC細胞株ならびに臨床検体においてDNA過剰メチル化と発現抑制が高頻度に一致する新規癌抑制遺伝子型miRNAを同定し、その標的分子を含めた分子機序の解析を進めている。

(2) **in vitro**機能的スクリーニングによる癌抑制遺伝子型miRNAの網羅的探索: 本研究では、合成二本鎖RNAライブラリー(Ambion社)を用いて、OSCC細胞株での**in vitro**細胞増殖抑制活性を指標とした機能的スクリーニングを行い、DNAメチル化解析と定量的発現解析を組み合わせた絞り込みによって、327 種類のmiRNA配列からOSCCにおいて腫瘍特異的DNA過剰メチル化により発現抑制される新規癌抑制遺伝子型miRNAとして *miR-218* と *miR-585* を同定した。さらに、同定した *miR-218* は直接的な標的分子として Rictor を同定し、*miR-218* が Rictor を翻訳抑制することによってAkt活性が抑制されることを明らかにした。以上の研究成果から、TOR-Aktシグナル経路を負に制御しうる *miR-218* は、OSCCにおける新規癌治療法の開発などに大きく貢献する可能性が示唆された(図 2: Uesugi et al., 投稿中)。

図2 OSCCで癌抑制遺伝子型miRNAとして同定した *miR-218* と直接的標的分子 Rictorによる分子機序



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 14 件)

① Muramatsu, T., Imoto, I., Matsui, T., Kozaki, K., Haruki, S., Sudol, M., Shimada, Y., Tsuda, H., Kawano, T. and Inazawa J.: YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 32: 389-398 2011. [Epub 2010 Nov 26]. 査読有

② Haruki, S., Imoto, I., Kozaki, K., Matsui, T., Kawachi, H., Komatsu, S., Muramatsu, T., Shimada, Y., Kawano, T. and Inazawa, J.: Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 31:1027-1036, 2010. [Epub 2010 Mar 3]. 査読有

③ Furuta, M., Kozaki, K., Tanaka, S., Aii, S., Imoto, I. and Inazawa J.: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 31: 766-776, 2010. [Epub 2009 Oct 20]. 査読有

④ 小崎健一, 稲澤譲治: 癌細胞におけるDNAメチル化異常とmicroRNA発現制御. (株) ニューサイエンス社, *細胞*, 42: 232-235, 2010. 査読無

⑤ Begum, A., Imoto, I., Kozaki, K., Tsuda, H., Suzuki, E., Amagasa, T. and Inazawa, J.: Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 100: 1908-1916. 2009. 査読有

⑥ Komatsu, S., Imoto, I., Tsuda, H., Kozaki, K., Muramatsu, T., Shimada, Y., Aiko, S., Yoshizumi, Y., Ichikawa, D., Otsuji, E. and Inazawa J.: Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 30: 1139-1146, 2009. 査読有

⑦ 小崎健一, 稲澤譲治: 癌におけるDNAメチル化異常とmicroRNA発現制御. (株) メディカルレビュー社, *ゲノム医学*, 9: 15-22, 2009. 査読無

⑧ Ishihara, T., Tsuda, H., Hotta, A., Kozaki, K., Yoshida, A., Noh, A. Y., Ito, K., Imoto, I. and Inazawa, J.: ITCH is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci.*, 99: 1940-1949, 2008. 査読有

⑨ Qi, S., Mogi, S., Tsuda, H., Tanaka, Y., Kozaki, K., Imoto, I., Inazawa, J., Hasegawa, S. and Omura, K.: Expression of cIAP-1 correlates with nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 37: 1047-1053, 2008. 査読有

⑩ Kikuchi, R., Tsuda, H., Kozaki, K., Kanai, Y., Kasamatsu, T., Sengoku, K., Hirohashi, S., Inazawa, J. and Imoto, I.: Frequent inactivation of a putative conditional tumor

-suppressor gene, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res.*, 68: 5067-5075, 2008. 査読有

- ⑪ Nakamura, E., Kozaki, K., Tsuda, H., Suzuki, E., Pimkhaokham, A., Yamamoto, G., Irie, T., Tachikawa, T., Amagasa, T., Inazawa, J. and Imoto, I.: Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 99: 1390-1400, 2008. 査読有
- ⑫ Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K. and Inazawa, J.: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res.*, 68: 2094-2105, 2008. 査読有
- ⑬ 小崎健一, 稲澤譲治: 癌幹細胞とmicroRNA. (株)医歯薬出版, *医学のあゆみ*, 227(1): 62-66, 2008. 査読無
- ⑭ 小崎健一, 稲澤譲治: がん抑制microRNAと腫瘍特異的DNAメチル化異常. (株)医薬ジャーナル社, *Cancer Frontier*, 10: 57-63, 2008. 査読無

[学会発表] (計 53 件)

1. Kozaki, K. and Inazawa, J.: Tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cancer cells. **International Sessions** “miRNA dysregulation in cancers, and its clinical applications”, *69th Annual Meeting of Japanese Cancer Association* (Osaka), 2010年9月22日.
2. Kozaki, K., Uesugi, A., Furuta, M., Imoto, I. and Inazawa, J.: Functional screening of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA. *American Association for Cancer Research, 101th Annual Meeting 2010* (Washington, DC), 2010年4月19日.
3. 小崎健一、井本逸勢、稲澤譲治: 口腔癌における癌抑制遺伝子型microRNAのDNAメチル化異常. **第3回 硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム**, (東京), 2010年2月16日.
4. Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K. and Inazawa, J.: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and Japanese Cancer Association*, (Waikoloa, Hawaii), 2010年2月8日.
5. Kozaki, K. and Inazawa, J.: Tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation. **Symposium** “Cancer epigenetics-from basic science to clinical practice”, *68th Annual Meeting of*

Japanese Cancer Association (Yokohama), 2009年10月2日.

6. 小崎健一、古田繭子、上杉篤史、鶴田智彦、井本逸勢、稲澤譲治: DNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNAの機能的探索. **日本人類遺伝学会 第54回大会** (東京), 2009年9月25日.
7. 小崎健一、井本逸勢、茂木世紀、小村 健、稲澤譲治: 口腔扁平上皮癌において腫瘍特異的DNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNA. **第3回 日本エピジェネティクス研究会年会** (東京), 2009年5月23日.
8. 小崎健一: 特異的DNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNAの網羅的探索. **アプライドバイオシステムズセミナー** 「microRNA研究の最前線～ ベールを脱ぐMicroRNAの機能～」, (大阪), 2009年5月28日.
9. 小崎健一: 特異的DNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNAの網羅的探索. **アプライドバイオシステムズセミナー** 「microRNA研究の最前線～ ベールを脱ぐMicroRNAの機能～」, (東京), 2009年5月12日.
10. 小崎健一、井本逸勢、稲澤譲治: 口腔癌における癌抑制microRNAの腫瘍特異的DNAメチル化異常. **第2回 硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム**, (東京), 2008年11月25日.
11. Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K. and Inazawa, J.: Silencing of tumor suppressive microRNAs, miR-137 and miR-193a, by tumor-specific DNA hypermethylation in oral cancer. *67th Annual Meeting of Japanese Cancer Association* (Nagoya), 2008年10月29日.
12. 小崎健一、稲澤譲治: がん抑制microRNAと腫瘍特異的DNAメチル化異常. **日本人類遺伝学会 第53回大会 シンポジウム I** 「がんオミックス研究の成果とその臨床応用」 (横浜), 2008年9月28日
13. Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K. and Inazawa, J.: Silencing of tumor-suppressive microRNAs by DNA hypermethylation in oral squamous cell carcinoma. *American Association for Cancer Research, 99th Annual Meeting 2008* (San Diego, CA), 2008年4月16日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

- ① 名称: 癌の検出方法および抑制方法

発明者: 稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢、
古田繭子、有井滋樹
権利者: 富士フィルム株式会社・国立大
学法人東京医科歯科大学
種類: 特許

番号: 特願 2010-046564(P09-034)

出願年月日: 2010年 3月 3日

国内外の別: 国内

- ② 名称: 食道癌の検出方法及び抑制剤
発明者: 稲澤譲治、井本逸勢、小松周平、
小崎健一、津田均

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大
学・富士写真フィルム株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2009-073998

出願年月日: 2010年 3月 24日、
12/730,919

国内外の別: US

- ③ 名称: 癌の検出方法および癌抑制剤
発明者: 稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大
学・富士フィルム株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2008-012256(P07-040)

出願年月日: 2008年 1月 23日

国内外の別: 国内

- ④ 名称: 癌の検出方法および癌抑制剤
発明者: 稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大
学・富士フィルム株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2008-012256

出願年月日: 2008年 1月 22日、
12/357,894

国内外の別: US

- ⑤ 名称: 癌の検出方法および癌抑制剤
発明者: 稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大
学・富士フィルム株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2008-012256

出願年月日: 2008年 1月 23日、
09151217.8

国内外の別: EP

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

- ① 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分
子細胞遺伝:
[http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/frame
page.htm](http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/frame
page.htm)
- ② 東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセ
ンター:
<http://www.tmd.ac.jp/mri/hgr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小崎 健一 (KOZAKI KEN-ICHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教

授

研究者番号: 50270715

(2) 研究分担者

稲澤 譲治 (INAZAWA JOHJI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号: 30193551