

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463075

研究課題名(和文)4NQO誘発ラット舌癌モデルにおけるmicro RNAの解析

研究課題名(英文)The analysis of micro RNA in 4NQO-induced rat tongue cancer model

研究代表者

米本 和弘 (YONEMOTO, KAZUHIRO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80422731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：4NQO誘発ラット舌癌モデルにおいて、ヒト扁平上皮癌において発現異常が報告されているmiRNA 5種をターゲットとし、ヒト扁平上皮癌と同様な発現異常が認められるかどうかを検証することにより、口腔発癌モデルとしての有益性を検証することを目的とした。本研究においてヒト扁平上皮癌と同様にmiR-21の発現上昇とmiR-99a miR-100の発現の低下が確認されたが、いずれも有意差は認められなかった。また、ヒト扁平上皮癌では発現上昇の報告があるmiR155,miR-130bは、本研究においては発現が低下していた。

研究成果の概要(英文)：We aim to examine the usefulness of 4-NQO induced rat tongue cancer as human oral carcinogenesis model by analyzing miRNA's which expression abnormality is reported in human squamous cell carcinoma. We identified upregulation of mir21 and downregulation of miR-99a and miR-100 like human squamous cell carcinoma in this study, but it was not the significant difference. On the other hand, the expression of miR155 and miR130b was downregulation unlike human squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔癌

キーワード：miRNA 4NQO舌癌ラットモデル

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、ヒト口腔癌において *p16*、*MGMT* の DNA メチル化異常が高頻度に生じていること (Kato K, et al: J Cancer Res Clin Oncol.2006) や、*RECK* 遺伝子のメチル化異常がヒト口腔癌の予後に影響すること (Long NK, et al: Oral Oncol.2008) 緑茶ポリフェノールである epigallocatechin-3-gallate (EGCG) が口腔癌細胞内のメチル化により不活化した *RECK* 遺伝子を脱メチル化し、癌の浸潤能を抑制すること (Kato K, et al: Br J Cancer.2008) を報告し、口腔癌の epigenetic な解析をおこなってきた。

現在、我々は 4NQO 誘発ラット舌癌モデルを用いて遺伝子プロモーター領域のメチル化異常、ヒストンメチル化修飾について解析をすすめており、*p16* 癌抑制遺伝子が発癌過程の比較的早期にメチル化異常を生じることを見出しており、さらに *E-cadherin* など他の癌抑制遺伝子についても解析を進めている最中であるが、miRNA についても解析をすすめていく必要があると考える。

近年、以前は無用と考えられていた蛋白をコードしない non-coding RNA である miRNA が、さまざまな機能を担っていることが次第に明らかになってきた。miRNA は 22 塩基程度の短鎖 DNA であり、ヒトでは 700 種類以上が同定されている。miRNA は DNA から pri-RNA として転写され、pre-miRNA を経て、成熟型 RNA に生合成される。この成熟型 RNA が標的 messenger RNA (mRNA) の非翻訳領域 (3' -UTR 領域) に結合し、蛋白の翻訳阻害や mRNA の分解することにより遺伝子発現を抑制しているとされている。現在、miRNA は発癌やその発育進展において重要な役割を果たしていると考えられており、癌抑制遺伝子の発現を抑制することにより癌抑制遺伝子の様に働く「tumor-suppressive miRNA」や、逆に癌抑制遺伝子の発現を抑制することで癌抑制遺伝子の様に作用する「oncogenic miRNA」の存

在が報告されており、更にこれらは、組織特異的、発生段階特異的に発現することがわかってきた。しかし、一つの miRNA が複数の標的遺伝子の発現を制御し、逆に一つの遺伝子が複数の miRNA により制御されるとされ、その機構は複雑多岐にわたり、更には他の epigenetic な現象との相互制御など詳細については不明である。

口腔癌においては切除標本や細胞株を用いた報告は多数あるが、4NQO 誘発ラット舌癌モデルを用いた発癌における miRNA の関与を解析した報告はない。

2. 研究の目的

本研究により、4NQO 誘発ラット舌癌モデルの発癌における miRNA の関与を解析し、口腔発癌における epigenetic な変化について明らかにすることが可能と考えられる。また、その結果は、**今後発展すると思われる epigenetic な異常の修復(遺伝子の再活性化など)を動物モデルで確認することを可能にし、口腔癌治療に有効な口腔発癌抑制物質の新たな開発につながるものと考えられ、意義は高いと考える。**

3. 研究の方法

(1) 4-NQO 誘発ラット舌癌モデルの作製

6 週齢 F344 ラットをグループ 1 (20ppm 4-NQO 飲水投与群)、グループ 2 (非処置群) に分けた。

グループ 1 は、実験開始より 8 週間 20ppm の 4-NQO の飲水投与を行い、32 週後にラットを犠牲死し舌組織を採取した。舌組織は 2 分割し、一方はホルマリン固定 (病理検索用) し、一方は -80 で凍結保存した。グループ 2 は、32 週後に犠牲死し舌組織をグループ 1 と同様に採取・保存した。

(2) 病理組織学的検索

ホルマリン固定を行った組織はパラフィン包埋し、病理組織学的検索用に連続切片を作成した。病理組織学的検索には H・E 染色を行い、組織型の分類 (異形成、早期癌、浸潤

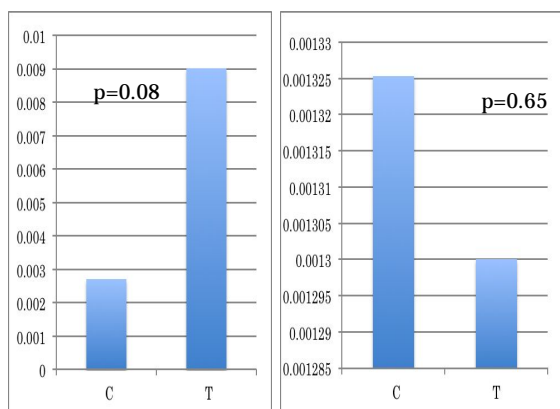
癌)を行った。

(3)real-time PCR 法による miRNA の解析

病理組織学検索により早期癌、浸潤癌と診断された舌組織(11 匹)と非処置群の舌組織(7 匹)を用いて、ヒト扁平上皮癌において発現異常が報告されている miRNA(miR-21、miR-155、miR-130b、miR-99a、miR-100)5 種をターゲットとし real-time PCR 法を用いてヒトと同様な発現異常が認められるかどうかを検証した。

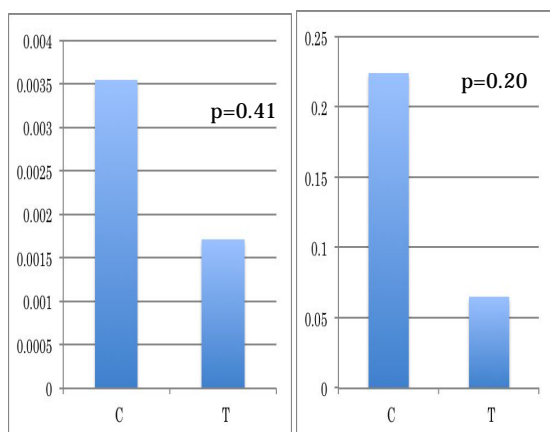
4 . 研究成果

ヒト扁平上皮癌と同様に miR-21 の発現上昇と miR-99a、miR-100 の発現の低下が確認されたが、いずれも有意差は認められなかった。一方、ヒト扁平上皮癌では発現上昇の報告がある miR155,miR-130b は、本研究においては逆に発現が低下していた。(Fig1) 今後はさらに検体数を増やして、再検討していく予定である。



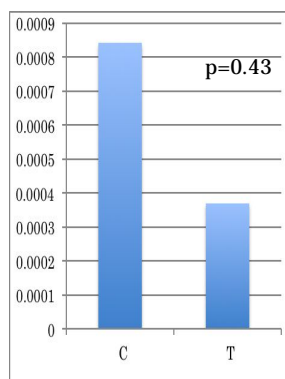
miR-21

miR-155



miR-99a

miR-100



miR-130b

(Fig 1) C : 正常組織 T : 腫瘍組織

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)

〔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

米本 和弘 (YONEMOTO KAZUHIRO)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80422731

(2)研究分担者

牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50345790

柴田 敏之 (SHIBATA TOSHIYUKI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50226172