

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861918

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子型microRNAの機能的スクリーニングと核酸医薬への応用

研究課題名(英文) Functional screening of tumor suppressive microRNA and application to nucleic acid medicine

研究代表者

上杉 篤史 (Uesugi, Atsushi)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20637061

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)：本研究は、癌個別化医療に寄与する新規核酸医薬としての臨床応用が可能な癌抑制遺伝子型miRNAの同定を目標とする。

合成二本鎖miRNAライブラリーを口腔扁平上皮癌細胞株NA、SKN3とヒト正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株RT7へ遺伝子導入した。その結果、細胞増殖抑制活性を各種癌細胞株に認め、かつRT7では認めないmiRNAを選出し、標的分子の同定と分子機序についての解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：This study aims for identification of the tumor suppressive microRNA which is available for clinical application as new nucleic acid medicine contributing to cancer personalized medicine.

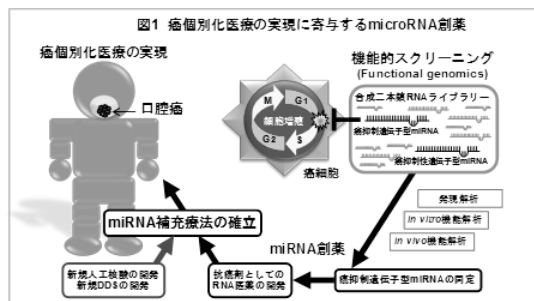
We transfected synthetic double strand miRNA library into NA,SKN3 oral squamous cell carcinoma cell lines and RT7 immortalization cell line derived from an oral mucosa epithelium .As a result, we recognized cytostasis activity in a cancer cell lines and picked miRNA not to accept on RT7.We perform analysis about the identification of target molecules and the molecular mechanism.

研究分野：歯科

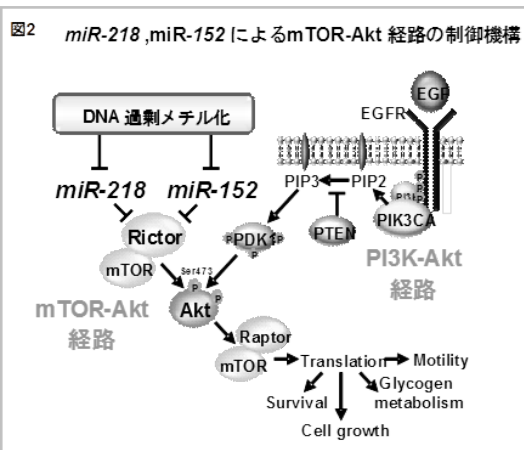
キーワード：口腔がん microRNA 核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

癌遺伝子や癌抑制遺伝子による研究の進展により、「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。現在、臨床応用されている主な分子標的治療薬は低分子化合物とモノクローナル抗体であるが、short interfering RNA (siRNA) も核酸医薬としての応用が期待されている。遺伝子から転写される mRNA を直接的な標的とする siRNA は臨床応用に際し off-target 効果などの安全性や生体内での安全性、あるいはデリバリーシステムなど解決すべき課題は多いが、全ての遺伝子に対しての応用が可能であるという利点を持つ。このため癌を含めた様々な疾患において、それらの責任遺伝子を標的とした RNA 創薬を目指した研究が行われている (図 1)。



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 microRNA (miRNA) は、蛋白質へは翻訳されない non-coding RNA であるが、標的分子の蛋白発現を転写後の配列特異的な RNA サイレncing によって抑制する機能性低分子 RNA である。これまでに数十種類の miRNA については、蛋白質をコードする既知の癌遺伝子や癌抑制遺伝子と同様に、発癌・進展過程の分子機序への関与が報告されている。



申請者は、機能解析を基盤とした網羅的検索によって、新規癌抑制遺伝子型 miRNA として口腔癌、子宮体癌から miR-218、miR-152 を各々同定し、この癌細胞における発現が腫

瘍特異的な DNA 過剰メチル化によって抑制的に制御されていること、さらに、mTOR と複合体を形成することで Akt のリン酸化を制御している Rictor を共通の標的分子としていることを明らかにし、報告した (図 2) (Cancer Res., 2011)。

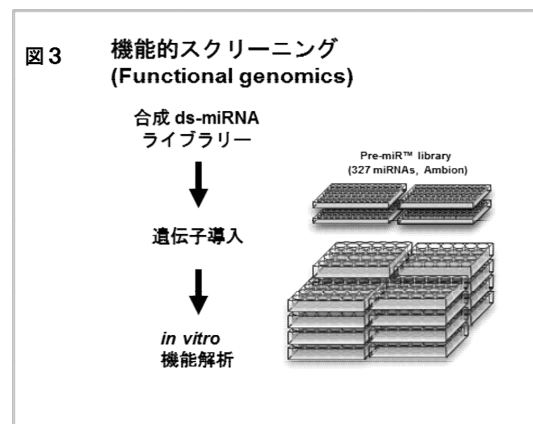
2. 研究の目的

(1) 合成二本鎖 miRNA (ds-miRNA) ライブラリーを用い、過去の解析よりも細胞株数を増やし、癌抑制遺伝子活性を指標とする機能的スクリーニングで新たな miRNA を検索する。

(2) 検索した癌抑制遺伝子型 miRNA の (癌遺伝子様) 標的分子を同定し、その分子機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 合成二本鎖 miRNA ライブラリーの機能的スクリーニング: 327 種類の miRNA 配列を持つ市販の合成二本鎖 miRNA ライブラリー (Pre-miRTM miRNA Precursor Library - Human V2, Ambion 社) を複数の口腔扁平上皮癌細胞株とヒト正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株 RT7 へ Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen 社) を用いて遺伝子導入後、各癌細胞株における in vitro 細胞増殖能を MTT 法で数値化して比較・検討する (図 3)。比較・検討の結果、細胞増殖抑制活性を各細胞株で共通して認め、且つヒト正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株 RT7 では細胞増殖抑制活性を認めない miRNA を候補として選出する。



(2) 標的遺伝子の同定と分子機序の統合的解析: 同定した癌抑制遺伝子型 miRNA に対する標的分子に関しては、Web で公開されている公的予測データベースの検索にて標的分子の候補を選出する。特異抗体が市販されている候補のみを合成二本鎖 miRNA 導入前後の細胞株における Western-blot 解析ならびにルシフェラーゼ・レポーター解析などによって検討し、同定を試みる。また、同定した癌抑制遺伝子型 miRNA と標的分子による分子機序についても、各種の発現解析や DNA メチ

ル化解析、in vitro 機能解析などを組み合わせた統合的解析を行う。

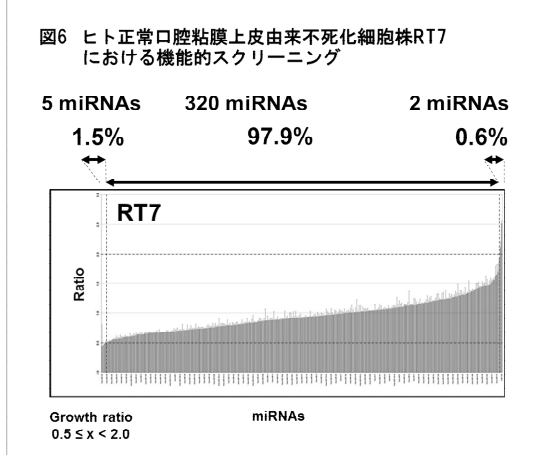
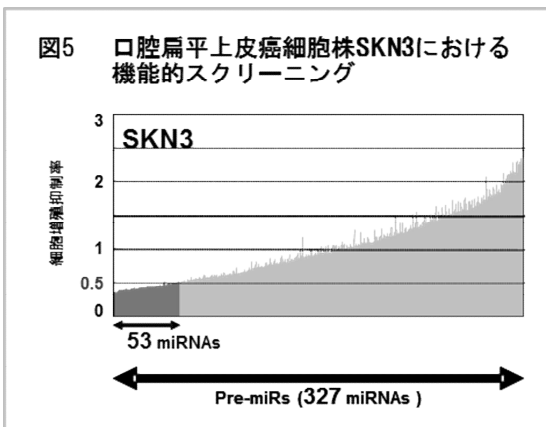
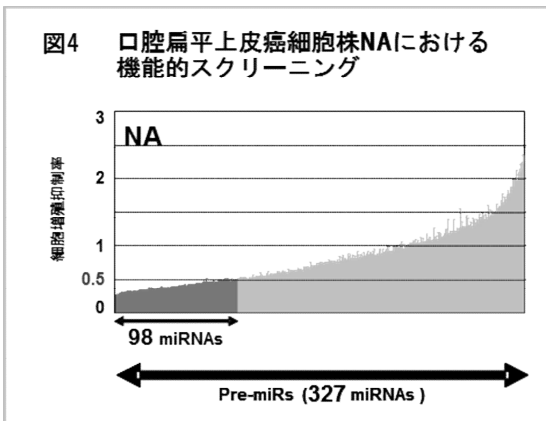
4. 研究成果

(1) 合成二本鎖 miRNA ライブラリーの機能的スクリーニング:

合成二本鎖 miRNA(ds-miRNA)ライブラリーを用いた機能的スクリーニングを施行し、癌抑制遺伝子型 miRNA を数種選出した。

327 種類の miRNA 配列を持つ市販の合成二本鎖 miRNA ライブラリー (Pre-miR™ miRNA Precursor Library - Human V2, Ambion 社) を口腔扁平上皮癌細胞株 NA, SKN3 とヒト正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株 RT7 へ Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen 社) を用いて遺伝子導入後、各癌細胞株における in vitro 細胞増殖能を MTT 法で数値化して比較・検討した。その結果、細胞増殖抑制活性を各細胞株で共通して認め、且つヒト正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株 RT7 では細胞増殖抑制活性を認めない miRNA を候補として選出した(図 4,5,6)。

(2) 標的遺伝子の同定と分子機序の統合的解析: 同定した癌抑制遺伝子型 miRNA に対する標的分子に関しては、Web で公開されている公的予測データベースの検索にて標的分子の候補を選出した、同定を試みている。



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 1 件)

Yuri K., Atsushi U. et al., Long-term outcome of non-surgical treatment in patients with oral leukoplakia, Oral Oncology, 51, 2015, 1020-1025. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

上杉篤史 他、顎口腔領域扁平上皮癌手術例における予後指標の検討、第 70 回日本口腔科学会学術集会、2016 年 4 月 17 日、福岡国際会議場、福岡県、福岡市

上杉篤史 他、口腔扁平苔癬患者におけるカンジダ検出率についての検討、第 60 回日本口腔外科学会総会、2015 年 10 月 16 日、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市

小田誠一郎、上杉篤史 他、類天疱瘡 6 例の臨床的検討、第 60 回日本口腔外科学会総会、2015 年 10 月 16 日、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市

上杉篤史 他、上下顎歯肉に生じた開口部形質細胞症の 1 例、第 24 回日本口腔内科学会、2014 年 9 月 19 日、九州大学医学部記念講堂、福岡県、福岡市

上杉篤史 他、口腔扁平苔癬における臨床診断と病理診断の相関～診断精度と上皮性異形成に関する検討～、第 23 回日本口腔内科学会、2013 年 9 月 13 日、学術総合センター一橋記念講堂、東京都、千代田区

〔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

上杉篤史 (UESUGI, Atsushi)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：20637061

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：