

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893024

研究課題名(和文) 口腔癌の頸部リンパ節転移を制御するmicroRNAの網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of microRNA expression suppressing cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

長谷川 正午 (Hasegawa, Shogo)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50361697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転移性・非転移性口腔癌細胞株を用いてmicro RNAマイクロアレイによる発現プロファイルを作成し、転移に関連するmRNA発現プロファイルを組み合わせて解析(ペアリング解析)を行った。転移性細胞株においてmiR-205の有意な発現低下が認められた。転移に関与するmRNAとmiR-205のペアリング解析を行ったところ、interferon regulatory factor 1 (IRF-1)がターゲット遺伝子として検出され、転移性口腔癌細胞株においてもIRF-1発現亢進を示した。miR-205を口腔癌細胞株に導入し、IRF-1の変化についても検討したが、有意な差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to examine miRNAs expression profiling on high metastatic potential cell lines and make integrated analysis of microRNA and mRNA with tumor metastasis in oral cancer. To identify the possible targets of these miRNA, we performed bioinformatics analysis by TargetScan algorithm and integrated analysis across the data of human cancer cell lines and our mRNA microarray data to identify miRNAs whose expression correlated with the inverse expression of mRNA targets predicted in silico. miRNA-205-5p was found down-regulated (more than -4 fold, $P < 0.001$) in metastatic cell lines compared to non-metastatic cell lines. Results obtained from different searches by TargetScan algorithm predicted interferon regulatory factor 1 (IRF1) as a potential target for miRNA-205-5p. By qRT-PCR analyses, we confirmed up-regulation of IRF1 in metastatic cell lines. These data provided the evidence for an inverse correlation between the expression of miRNA-205-5p and IRF1.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 転移 microRNA mRNA

1. 研究開始当初の背景

口腔癌はその組織型の 90% が扁平上皮癌であり、リンパ節転移の頻度が高く、頸部リンパ節転移が患者の生命予後を左右する重要な因子となっている。そのため予後の改善には、リンパ節転移をいかに治療するかが鍵となる。癌の転移はさまざまな DNA, RNA やタンパク質を介して複雑に制御された一定の病態基盤が存在すると考えられる。申請者はこれまで、43 例の口腔癌を対象にマイクロアレイにてメッセンジャーRNA 発現プロファイル解析を行い、頸部リンパ節転移に関連して発現に変化を認める 85 個のメッセンジャーRNA を明らかとした。さらに AdaBoost アルゴリズムを用いて 8 個の転移予測遺伝子 (DCTD, IL15, THBD, GSDML, SH3GL3, PTHLH, RP5-1022P6, C9orf46) を同定し、転移能を有する口腔癌を予測することに成功した (Nguyen ST, Hasegawa S et al. Cancer Sci. 2007)。

しかし、近年、全く新しいカテゴリの RNA が発見された。それが micro RNA である。micro RNA もゲノムから転写されるが、メッセンジャーRNA のようにタンパク質に翻訳されることはなく、15~25 ヌクレオチドの小さな RNA 配列である micro RNA は、主に翻訳阻害とメッセンジャーRNA の切断 (分解) というふたつのプロセスで標的となる複数の遺伝子を制御していることが明らかとなってきた。

micro RNA と癌の転移に関して、Memorial Sloan-Kettering Cancer Center の Tavazoie らは、ヒト乳癌細胞より骨・肺への高転移細胞株を樹立し、その細胞において発現が顕著に抑制されている miR-335, miR-126, miR-206 の 3 つの micro RNA に着目した。マウス実験モデルでは、これらの micro RNAs の発現を回復させることで、高転移細胞株の骨や肺への転移がみごとに抑制された。この 3 種の micro RNA は、乳癌患者の転移した癌組織においてもその発現が低下しており、さらに 20 例の臨床検体を検討した結果、これらの micro RNA の発現低下と転移とに相関が認められたことを報告している (Tavazoie et al. Nature. 2008)。このように micro RNA が癌の転移において重要な役割を果たしていることが少しずつ示されてきており、さまざまな癌において転移を押さえ込むことが可能な micro RNA の発見に精力が傾けられていた。一方、口腔癌では、転移が予後を左右する最も重要な因子であるにも関わらず、転移に関与する micro RNA の研究はわずかであり、そのメッセンジャーRNA との発現調節機構の詳細は未解明であった。

2. 研究の目的

口腔癌の臨床検体を用いて、micro RNA マイクロアレイを用いたハイスループットな発現解析を行うことで、頸部リンパ節転移の有無による micro RNA 発現プロファイルの差違を明らかとする。転移の有無により発現に変

動を認める micro RNA を Real-Time PCR で定量的に検証し同定した後、コンピュータ (in silico) 解析での標的メッセンジャーRNA を予測し、トランスクリプトーム解析により micro RNA-標的メッセンジャーRNA 相互作用を推測する。口腔癌の転移のメカニズム解明の新たな知見が得られ、さらに microRNA を核酸治療薬として臨床応用へと展開するための基礎的な研究基盤を確立させることができる。と考える。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト口腔癌由来細胞株 (SAT, HO1-U-1, SAS, HSC-3, HSC-3-M-3, OSC-19, 及び KON) を実験に供し、HSC-3, HSC-3-M-3, OSC-19 及び KON を高転移能細胞株とした。

(2) 患者およびサンプル

筑波大学附属病院で治療を行った 73 人の口腔癌患者からホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプルを収集した。さらに、5 人の癌のない患者から対照として FFPE 組織サンプルを採取した。すべての症例が組織学的に癌と診断され、口腔癌の診断と分類は、UICC の TNM システムに基づいておこなわれた。なお、本研究における倫理的配慮は、筑波大学附属病院倫理審査委員会の承認を得て、患者およびその家族に紙面と口頭にて研究の意義・方法、プライバシー保護、研究参加への自由意志の尊重を説明し、同意書で同意を確認した。

(3) RNA isolation および定量的 RT-PCR

癌細胞株および FFPE 組織試料から RNA を RNeasy キット (Qiagen) 及び miRNeasy FFPE キット (Qiagen) を用いて単離した。次いで、miRNA PCR アレイプラットフォーム (miScript miRNA PCR アレイ, Qiagen) を使用して、miRNA プロファイルを分析した。

(4) micro RNA ターゲット遺伝子分析

micro RNA の標的メッセンジャーRNA を同定するためには、micro RNA の発現と逆相関する標的メッセンジャーRNA を in silico で予測しなければならない。ヒト癌細胞株およびメッセンジャーRNA マイクロアレイデータに対して TargetScan アルゴリズムを用いてバイオフィオマティクス解析を行った。

(5) miRNA-メッセンジャーRNA の相互作用の検証

高転移能細胞株である HSC-3 と SAS 細胞に対し、micro RNA の mimic および inhibitor をトランスフェクションし、24 時間後に RNA を miRNeasy Mini キット (Qiagen) を用いて細胞から抽出した。メッセンジャーRNA の発現は Affymetrix のヒトゲノム U133 プラス 2.0 アレイを用いて解析した。

(6) micro RNA の過剰発現およびノックダウン

細胞を 6 ウェルプレートに播種し、80% コンフルエントの時点で micro RNA の mimic および inhibitor を RNAi MAX (Invitrogen) でト

ランスフェクトした。また, mimic および inhibitor とともに negative control を設定した。細胞は, 機能分析のためにトランスフェクションの 24 時間後に回収した。

(7) 細胞増殖アッセイ

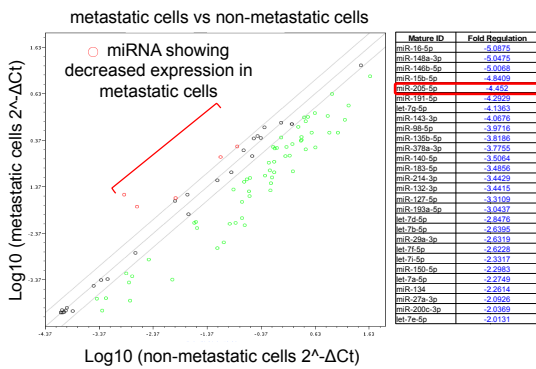
細胞増殖を評価するために, 6 ウェルプレートにトリPLICATEで播種し, 先と同様に micro RNA の mimic および inhibitor をトランスフェクションし, 24 時間後および 48 時間後に自動細胞カウンター (BioRad) を用いて計数した。

(8) 細胞浸潤および遊走アッセイ

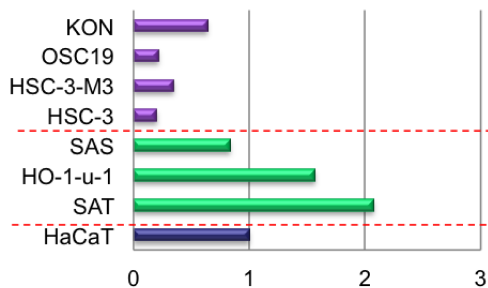
細胞浸潤および遊走能力を, CultreCoat BME 細胞浸潤アッセイ kit (Trevigen) および 96 ウェル細胞移動アッセイ kit (Trevigen) を使用して評価した。実験開始 24 時間前より細胞周期を同調させるために培養液から血清を取り除き, 血清飢餓 (serum starvation) とした。その後, 細胞を BME コーティングチャンバー及び非コーティングチャンバーに播種した。培養期間の終わりに細胞を洗浄し, カルセインを各ウェルに添加し 1 時間インキュベート, 次いでレシーバプレートを Varioskan Flash (Thermo Scientific) にて読み取った。Invasive index は, マニュアルに従い計算した。

4. 研究成果

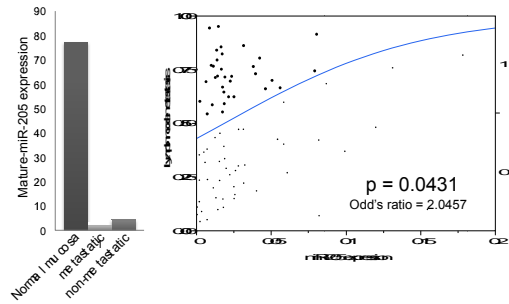
(1) Scatterplot of miRNA gene expression level in metastatic cells against non-metastatic cells



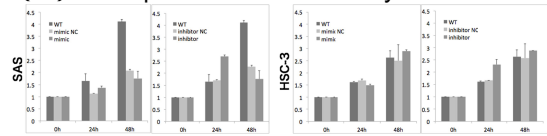
(2) Expression levels of miR-205 in metastatic cell lines and non-metastatic cell lines



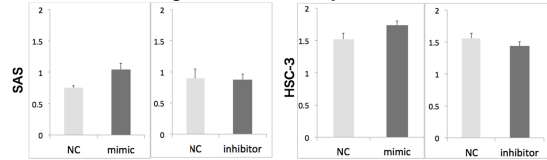
(3) miR-205 expression in OSCC and normal mucosa and Correlation between neck metastasis and miR-205 expression



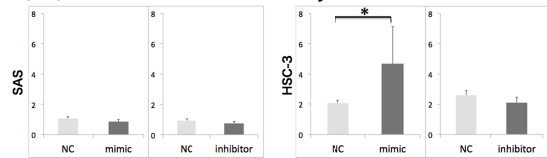
(4) Cell proliferation assay



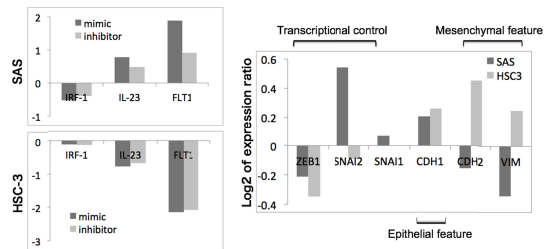
(5) Cell migration assay



(6) Cell invasion assay



(7) mRNA expression by microarray associated with inflammation and EMT



転移性細胞株において miR-205 の有意な発現低下が認められた。転移に關与する mRNA と miR-205 のペアリング解析を行ったところ, interferon regulatory factor 1 (IRF-1) がターゲット遺伝子として検出され, real-time PCR でも転移性口腔癌細胞株において IRF-1 発現亢進を示した。miR-205 を口腔癌細胞株に導入し, 増殖能, 浸潤能などの細胞機能の変化についても検討したが, 有意な差は認められなかった。miR-205 の発現低下は IRF-1 の発現を亢進させることで, 口腔癌の転移を引き起こす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 0件)

[学会発表](計 6件)

1. 長谷川正午, 内田文彦, 馬場 脩, 長井宏樹, 伊藤孝明, 大和地正信, 菅野直美, 山縣憲司, 柳川 徹, 武川寛樹. 口腔癌の頸部リンパ節転移における miR-205 と Interferon Regulatory Factor 1 の関係. 第 59 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2014 年 10 月 17 日, 千葉市.
2. 内田文彦, 長谷川正午, 馬場 脩, 寺邊健人, 伊藤孝明, 大和地正信, 菅野直美, 山縣憲司, 柳川 徹, 武川寛樹. 口腔癌の頸部リンパ節転移における miR-155-5p と zinc finger protein 703 の関係. 第 59 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2014 年 10 月 17 日, 千葉市.
3. 馬場 脩, 伊藤孝明, 内田文彦, 大和地正信, 菅野直美, 山縣憲司, 長谷川正午, 柳川 徹, 鬼澤浩司郎, 武川寛樹. 口腔がんにおける miR-203 の機能解析と臨床応用. 第 59 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2014 年 10 月 17 日, 千葉市.
4. Shogo Hasegawa, Fumihiko Uchida, Osamu Baba, Takaaki Ito, Masanobu Yamatoji, Naomi I, Kanno. Kenji Yamagata, Toru Yanagawa. Hiroki Bukawa. miR-205-5p Targets Interferon Regulatory Factor 1 and Suppresses Metastasis in Oral Cancer Cells. AAOMS 96th Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition in Conjunction with the Japanese Society and Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 8th September 2014, Hawaii (USA).
5. Fumihiko Uchida, Shogo Hasegawa, Osamu Baba, Takaaki Ito, Masanobu Yamatoji, Naomi I, Kanno. Kenji Yamagata, Toru Yanagawa. Hiroki Bukawa. miRNA-155-5p Targets ZNF703 and Suppresses Metastasis in Oral Cancer Cells. AAOMS 96th Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition in Conjunction with the Japanese Society and Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 8th September 2014, Hawaii (USA).
6. Osamu Baba, Takaaki Ito, Fumihiko Uchida, Masanobu Yamatoji, Naomi I, Kanno. Kenji Yamagata, Shogo Hasegawa, Toru Yanagawa. Hiroki Bukawa. Utility

of Saliva in the Evaluation of MicroRNA Functions as a Tumor Suppressor in Oral Squamous Cell Carcinoma. AAOMS 96th Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition in Conjunction with the Japanese Society and Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 8th September 2014, Hawaii (USA).

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 正午 (HASEGAWA SHOGO)
筑波大学・医学医療系顎口腔外科学・講師
研究者番号: 50361697

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: