

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20501

研究課題名(和文) microRNAを切り口とした口腔癌発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of oral cancer carcinogenesis mechanism from a microRNA perspective

研究代表者

内田 文彦 (UCHIDA, Fumihiko)

筑波大学・附属病院・医員

研究者番号：70736008

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)：口腔白板症の摘出標本(ホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE))より microRNAを抽出し、網羅的発現解析(マイクロアレイ)を行った。そして、正常口腔粘膜上皮と口腔癌における microRNAの網羅的発現解析結果と比較し、白板症病変における microRNAの発現パターンを明らかにした。すなわち、発癌に必要となる(高発現する、もしくは発現抑制される)スイッチ役の miRNA候補を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated whether leukoplakia can be distinguished by miRNA expression levels. microRNA microarray profiling was used to compare microRNA expression in 5 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) leukoplakia resected specimen. Some microRNAs exhibited statistically significant differences in expression between the leukoplakia, normal oral mucosal epithelium and oral cancer samples. microRNA expression profiles in leukoplakia may potentially be used to identify oral cancer carcinogenesis mechanism, and microRNAs that are up-regulated in leukoplakia may be targets for therapeutic intervention.

研究分野：外科系歯科学

キーワード：microRNA 口腔がん 発癌

1. 研究開始当初の背景

近年、全く新しいカテゴリーのRNAが発見された。それがmicroRNA(miRNA)である。miRNAもゲノムから転写されるが、mRNA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miRNAは、主に翻訳阻害とmRNA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いる。そして、miRNAにはさらに重要な特徴がある。第一は、非常に小さなRNA分子のためRNaseに耐性がありホルマリン固定やパラフィン処理された組織中でも保存性が高いということである。この固有の安定性から、過去に遡って病理組織診断に用いられた検体をサンプルとして用いることができ、より多くのサンプルでの解析が可能となる。第二に、miRNA調節遺伝子発現は細胞系に保存されており、一般に発癌により制限が解除される。従って、組織内・体液中のmiRNAの反応促進や抑制を特定することで、診断に利用することが可能となる。

口腔前癌病変である白板症におけるmiRNAの発現動態およびその意義については未だ不明な点が多い。白板症病変におけるmiRNA発現パターンを明らかにし、口腔癌病変との比較を行えば、発癌に必要なスイッチ役のmiRNAが同定できる可能性がある。miRNAはもともと生体内において複数の遺伝子を標的にその発現レベルのファインチューナー的役割を担っている。疾患は複数の遺伝子・タンパク質の発現制御ネットワークの破綻であるから、一つの遺伝子やタンパク質を治療標的にするより、疾患特異的なmiRNAを標的にすることで、関連するネットワーク上の複数の遺伝子発現調節を同時に改善する効果が期待できる。さらには、miRNA創薬は、抗体医薬と異なり合成可能であるため、前癌病変関連miRNAについて明らかにすることは非常に有用であると考えられる。また、白板症の外科治療後の再発や発癌の原因については、びまん性白板症などで肉眼的に境界が不明瞭で取り残しをしたため、白板症の周囲粘膜が白板症の発症の素地を有している、すなわち、多中心性に発症したため、

白板症の病的因子が必ずしも除去されていないため、などが挙げられるが、上記原因の中で、解決できないものは多中心性再発・発癌である。すなわち、発癌分子機構を明らかにするには、前癌病変もしくは癌病変の周囲組織に注目する必要があると考えられる。しかし、非癌部上皮組織のmiRNA発現パターンの解析を行い、白板症の再発・発癌との関連を解析した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

miRNAを切り口とした発癌のメカニズムを解明することであり、本研究を遂行することで口腔癌の癌化のメカニズム解明の新たな知見が得られ、さらにmiRNA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を目的とした。

3. 研究の方法

白板症の臨床標本(切除検体のホルマリン固定・パラフィン包埋(FFPE)組織)を用いて、miRNAの網羅的発現解析をし、既存の口腔癌組織での発現動態と比較する。例えば、白板症組織で発現が亢進しており、口腔癌組織でさらに高発現するmiRNAは口腔癌の発癌に必要なスイッチ役の候補miRNA(oncomiR)として同定できると考えた。

4. 研究成果

研究実施計画の初年度においては、白板症の摘出検体からの抽出RNAの純度が悪く発現解析が遂行できなかったため、「口腔がん切除断端組織でp62の発現が高いと予後が不良になる」という先行研究を参考に、白板症摘出標本におけるp62タンパクの発現を調べた。結果は、p62の発現が陽性であると悪化のリスク因子である上皮異型が有意に多くなることがわかった。このことから、白板症組織におけるp62の細胞内蓄積が悪化のマーカーとなる可能性が考えられ、p62が前癌病変である白板症の発癌に関与する可能性が明らかとなった。そして、p62の発現を制御しているmiRNAの発現動態に着目することが本研究の目的達成につながると考えられた。

次年度は、予定通り、白板症摘出標本のFFPEより純度の高いmiRNAを抽出できたため網羅的発現解析を行った。そして、正常口腔粘膜上皮と口腔癌におけるmiRNAの網羅的発現解析結果と比較した。正常口腔粘膜上皮と白板症で比較すると、白板症において発現が8倍以上のmiRNAが3種類、4倍以上のmiRNAが3種類、2倍以上のmiRNAが30種類検出できた(図1)。

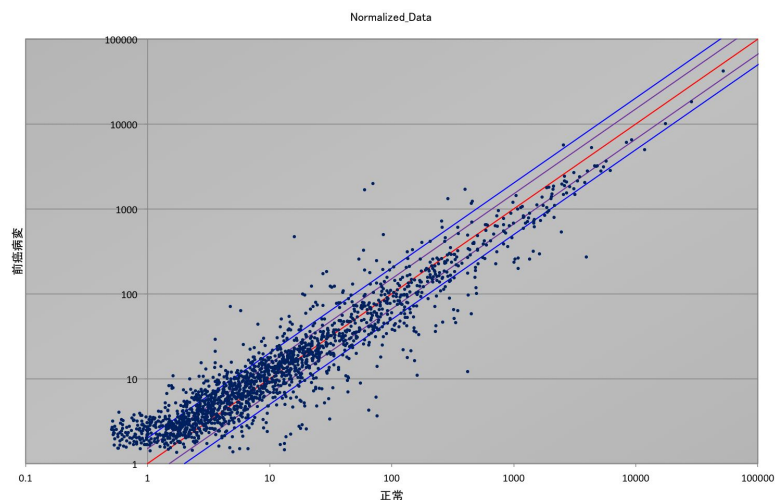


図1：白板症と正常口腔粘膜上皮での発現比較解析

さらに白板症と口腔癌で比較すると、白板症において発現が4倍以上のmiRNAが5種類、2倍以上のmiRNAが66種類検出できた(図2)。

また、正常口腔粘膜上皮と白板症で比較し、白板症において発現が1/8倍以下に低下し

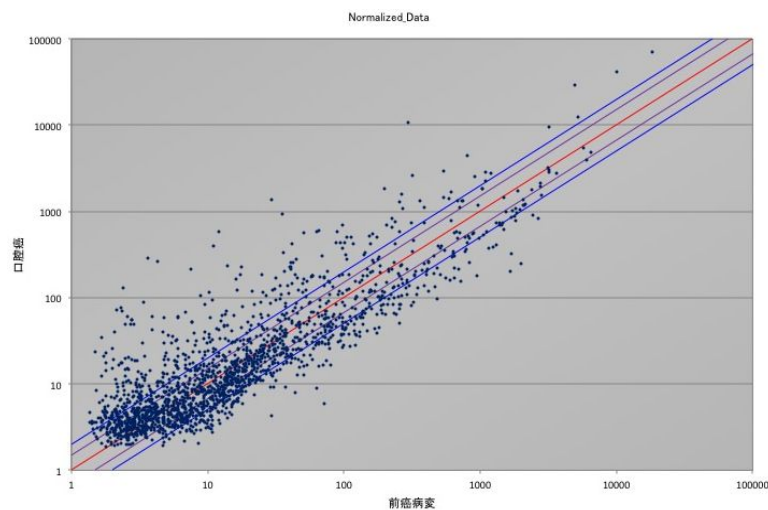


図2：白板症と口腔癌での発現比較解析

ていた miRNA が7個、1/4倍以下に低下していた miRNA が150個、1/2倍以下に低下していた miRNA が593個検出された(図1)。さらに、白板症と口腔癌とで比較すると、白板症で発現が1/8以下に低下していた miRNA が92個、1/4以下に低下していた miRNA が152個、1/2以下に低下していた miRNA が394個検出された(図2)。また、初年度に着目した p62 の発現を制御している miRNA の同定を TargetScan-VERT にて行ったところ、hsa-miR-7-5p であった。この miR-7-5 は、白板症と口腔癌での発現比較をした場合、口腔癌では4倍以上の発現を示した。

今後は今回抽出した miRNA をターゲットとし、また miR-7-5p に着目して発癌に関わるメカニズムの解析を進めていく予定である。

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2件)

1. Ito S, Kimura S, Warabi E, Kawachi Y, Yamatoji M, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Hasegawa S, Shoda J, Tabuchi K, Sakai S, Bukawa H, Sekido M, Yanagawa T. : p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis. *J Dermatol Sci*, 83, 226-33, doi:10.1016/j.jdermsci.2016.05.005, 2016
2. Baba O, Hasegawa S, Nagai H, Uchida F, Yamatoji M, Kanno NI, Yamagata K, Sakai S, Yanagawa T, Bukawa H. : MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *J Oral Pathol Med*, 45, 248-55, doi: 10.1111/jop.12351, 2016

〔学会発表〕(計2件)

1. 長井宏樹、内田文彦、長谷川正午、斉藤輝海、長尾 徹、小牧 完、馬場 脩、山縣憲司、柳川 徹、武川寛樹
口腔白板症における p62 の発現に関する病理組織学的・臨床的検討
第60回 公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会(2015年10月16日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場)
2. 寺邊健人、内田文彦、柳川 徹、長井宏樹、大森翔英、菅野直美、長谷川正午、山縣憲司、武川寛樹
口腔がん切除断端における酸化ストレス関連タンパク p62/SQSTM1、LC3-A、LC3-B の発現と腫瘍再発および予後の関連性の検討
第70回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会(2016年4月17日 福岡県福岡市 福岡国際会議場)

〔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
内田 文彦(Uchida, Fumihiko)
筑波大学・附属病院・医員
研究者番号： 70736008

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし