

令和元年5月28日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05537

研究課題名(和文) 癌と周囲細胞に対する long non coding RNA の作用と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy based on functions of long non coding RNA in the cancer and cancer-associated cells

研究代表者

椎葉 正史 (SHIIBA, Masashi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：20301096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、long non coding RNA (lncRNA)による遺伝子発現調整機構の解明が急速に行われている。私達は、lncRNAであるUCA1、LINC00256Aが腫瘍増殖を促進することなく、浸潤・転移能を高め、放射線感受性を抑制することを明らかにした。また、周囲の非癌細胞と共培養下においても、同様にUCA1、LINC00256Aが腫瘍の浸潤・転移能を高めることを確認し、周囲の非癌細胞による影響と関係なく腫瘍の浸潤・転移能を高めることが示唆された。一方で、UCA1、LINC00256Aは周囲の非癌細胞との共培養により、腫瘍の浸潤・転移能ばかりでなく、腫瘍増殖を促進することも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々が同定したlncRNAであるUCA1、LINC00256Aは腫瘍の浸潤・転移能を高め、放射線感受性を抑制することが明らかとなった。また、周囲の非癌細胞と共培養下においては、UCA1、LINC00256Aが腫瘍の浸潤・転移能のみならず増殖能を高めることが明らかとなった。

上記の実験結果より、lncRNAであるUCA1、LINC00256Aは新規lncRNA関連治療法開発の有力な候補と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The research on long non-coding RNA (lncRNA) was very slow and little in the world, comparing with on miRNA, in recent years, the research on the regulation mechanism of gene expression by long non-coding RNA (lncRNA) has been rapidly advanced. However, there has been no report on lncRNA in oral cancer, therefore, this study was planned. Micro array analysis revealed 5 lncRNAs associated with oral cancer. In those, two lncRNAs, UCA1 and LINC00256A, were discovered to play significant rolls on controlling growing, invasion, metastasis, resistance to chemotherapy and/or radiation. Those two lncRNAs were suggested to promote tumor invasion and metastasis without tumor growth and suppresses radio sensitivity. It was also suggested that the interaction with cancer-associated fibroblasts (CAFs) promotes tumor invasion and metastasis as well as tumor growth.

研究分野：医歯薬学 歯学・外科系歯学

キーワード：long non coding RNA UCA1 LINC00256A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の制御は核内に存在する様々なタンパク質とタンパクをコードしていない non coding RNA (ncRNA) が核内複合体を形成し、それらが DNA の構造調節や機能制御等の遺伝情報管理に中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。ncRNA のうち、小型の microRNA (miRNA) については、データベース、ターゲット遺伝子リスト、複数の解析用 array などが整備され、現在、世界中で盛んに研究されている。他方で、ncRNA のうち long non coding RNA (lncRNA) については、従来はあまり解析が行われてこなかった。しかし、最近、Ajilient 社製 array 等に lncRNA が搭載され、さらに lncRNA data base が公開されて急激に研究環境が整いつつあり、世界中で、lncRNA による遺伝子発現調整機構の解明が急速に開始され始めたところである。癌に関しては、胃癌、肺癌、肝細胞癌等において、H19, HOTAIR, MALAT1 などの lncRNA が特異的に関連し、浸潤、転移、増殖などに影響を与えていることが報告された。このような中、口腔癌に関しては報告が全くなかったが、私は、先行研究により、5 種類の口腔癌関連 lncRNA を同定し、さらに、lncRNA である UCA1、LINC00256A が腫瘍の浸潤・転移能を高め、この作用は腫瘍増殖を促進することなく起きることを明らかにした。さらに、癌細胞の性質ばかりでなく、周囲非癌細胞（線維芽細胞、血管内皮細胞等）に対する癌のメカニズムとして、ncRNA の癌細胞からの分泌に注目が集まっている。研究環境が日増しに改善されていくこともあり、さらに多くの様々な機能に関連した lncRNA が同定されていくものと考えられ、新規治療法や創薬の可能性が期待されている。

## 2. 研究の目的

### (1) 癌細胞における lncRNA の機能の解明

口腔扁平上皮癌に特徴的な lncRNA を検索・同定する。

先行研究で同定した lncRNA も含め、shRNA または合成 lncRNA 導入実験により、癌の増殖、浸潤、転移、抗癌剤耐性、放射線耐性に対する作用を明らかにする。

作用が明らかになった lncRNA について、相補的配列の有無をキーとして遺伝子データベースからターゲット遺伝子候補を検索・同定する。

ターゲット遺伝子候補に関するルシフェラーゼ発現解析システムを構築し、lncRNA による発現制御カスケードが実際に機能していることを確認する。

### (2) 正常組織由来培養細胞と癌周囲非癌細胞に対する機能の解明

以上の癌細胞を用いた実験系で明らかになった lncRNA の機能とカスケードが癌周囲非癌細胞（線維芽細胞、血管上皮）に対してどのように機能しているかを検討する。

lncRNA の正常組織由来細胞に対する作用と、癌周囲非癌細胞に対する作用、ならびにその作用の差異を明らかにする。

共培養系を用いて、癌細胞の非癌細胞に対する lncRNA を介した作用を明らかにする。

以上、研究 (1)、(2) により、lncRNA の癌および周囲非癌細胞に対する作用機序を明らかにするとともに、増殖、浸潤、転移、抗癌剤耐性、放射線耐性などをコントロールする新規 lncRNA 関連治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 癌細胞における lncRNA の機能解析研究

lncRNA 搭載 array 解析：口腔癌細胞 4 種類と正常口腔扁平上皮細胞を用いて、癌細胞において共通に発現増強している lncRNA と、共通に発現減弱している lncRNA を検索する。

lncRNA data base と文献検索：我々の先行研究の成果も踏まえ、様々な種類の癌の特異的発現 lncRNA を検索・リストアップする。さらに、上皮間葉系相互作用にも影響を与えていることが報告されている lncRNA を検索する。

Real time PCR：多数の口腔癌由来細胞株と口腔癌臨床サンプルから抽出精製された RNA を用いて、でリストアップされた lncRNA に関して発現量を調べ、口腔癌特異的に発現増強、あるいは減弱している lncRNA を確定する。

臨床的機能解析：臨床的諸指標と比較して、臨床的に意味のある lncRNA を同定する。

遺伝子的機能解析：候補 lncRNA の shRNA または lncRNA または合成 lncRNA 導入実験（増殖試験、invasion assay、migration assay、MTS assay による抗癌剤耐性実験、放射線耐性実験等）により遺伝子学的機能解析を行う。

増殖、浸潤、転移、抗癌剤耐性、放射線耐性等に関連した lncRNA の塩基配列を基に、遺伝子データベースにおいて、相補的塩基配列を有する遺伝子を検索同定する。

さらに、lncRNA の shRNA あるいは合成 lncRNA 導入前と導入後の細胞における遺伝子発現状態を micro array 解析により比較し、特異的に変動した遺伝子を検索する。

、でピックアップしたターゲット遺伝子候補に関して、ルシフェラーゼ発現解析システムを構築し、lncRNA による発現制御カスケードが実際に機能していることを確認する。

### (2) 正常組織由来培養細胞と癌周囲非癌細胞に対する機能の解明

lncRNA の shRNA または合成 lncRNA 導入により、フィルターを介した共培養系を用いて、癌細胞の非癌細胞に対する作用、また正常組織由来細胞と癌周囲非癌細胞に対する作用、なら

びにその作用の差異を、増殖試験、invasion assay、migration assay、MTS assay による抗癌剤耐性実験、放射線耐性実験等により明らかにする。

非癌細胞に対する lncRNA によると思われる作用を絞り込む。

#### 4. 研究成果

(1) lncRNA 搭載 array 解析：口腔癌細胞 4 種類と正常口腔扁平上皮細胞を用いて、癌細胞において共通に発現増強している lncRNA と、共通に発現減弱している lncRNA を検索する。

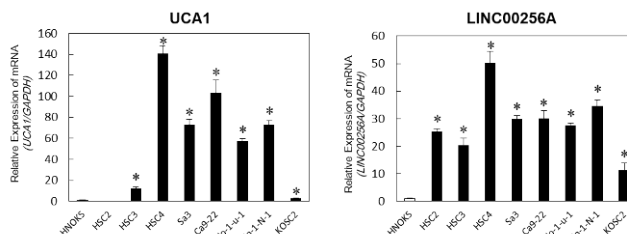
口腔癌細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4, Sa3) と正常口腔扁平上皮細胞の遺伝子発現状況を、micro array により網羅的に解析した。25 種の遺伝子において 4 種の細胞株で共通して発現亢進を認め、25 種の遺伝子において発現減弱を認めた。

(2) lncRNA data base と文献検索：我々の先行研究の成果も踏まえ、様々な種類の癌の特異的発現 lncRNA を検索・リストアップする。さらに、癌周囲非癌細胞への作用も考慮して、上皮間葉系相互作用にも影響を与えていることが報告されている lncRNA を検索する。

様々な種類の癌に対し、特異的な発現を示す lncRNA の文献を検索したところ、約 2500 の報告を認め、口腔癌に対しては 12 の報告を認めた。また、上皮間葉系相互作用において特異的な発現を示す lncRNA は 89 の報告が存在した。

(3) real time PCR: 多数の口腔癌由来細胞株と口腔癌臨床サンプルから抽出精製された RNA を用いて、(1), (2) でリストアップされた lncRNA に関して発現量を調べ、口腔癌特異的に発現増強、あるいは減弱している lncRNA を確定する。

lncRNA 搭載 array 解析と様々な種類の癌の特異的発現 lncRNA の文献検索より選出された lncRNA の口腔癌細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4, Sa3) と正常口腔扁平上皮細胞の遺伝子発現状況を RT-qPCR 法によりその発現を確認したところ、UCA1 と LINC00256A において口腔癌細胞株での発現増強を認めた。



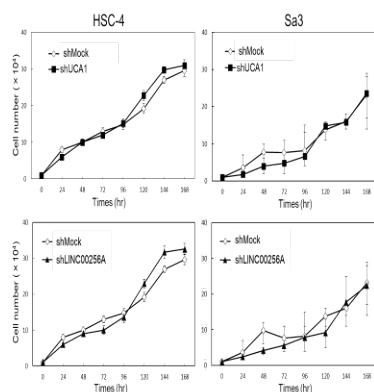
(図 1: HNOKs と口腔癌細胞株 8 種における UCA1、LINC00256A の発現量, RT-qPCR)

(4) 臨床的機能解析：臨床的諸指標と比較して、臨床的に意味のある lncRNA を同定する。

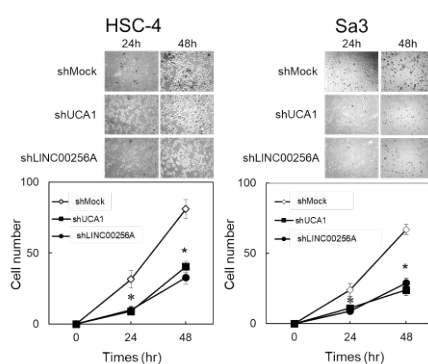
UCA1 と LINC00256A の口腔癌患者の臨床サンプルにおける mRNA 発現を RT-qPCR 法により確認したところ、臨床的諸指標との相関は認めなかった。

(5) 遺伝子的機能解析：候補 lncRNA の shRNA または lncRNA または合成 lncRNA 導入実験 (増殖試験、invasion assay、migration assay、MTS assay による抗癌剤耐性実験、放射線耐性実験等) により遺伝子学的機能解析を行う。

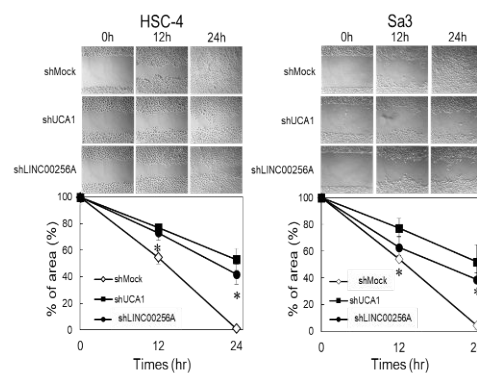
shUCA1 と shLINC00256A を 2 種類の口腔癌細胞株 (HSC4, Sa3) へ導入し、機能解析を行った。shMock との比較において、有意な増殖能の変化はなく(図 2)、浸潤能と遊走能の有意な低下を認めた。(図 3,4) また、抗癌剤に対する耐性の変化はなく(図 5)、放射線感受性の亢進を認めた。(図 6)



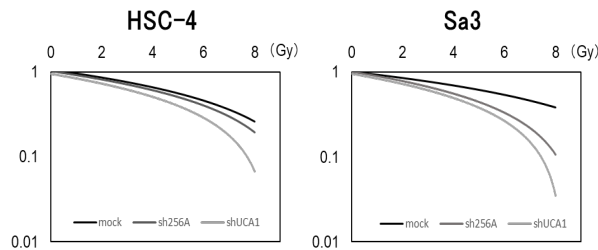
(図 2: shUCA1、shLINC00256A 導入による増殖能の検証, proliferation assay)



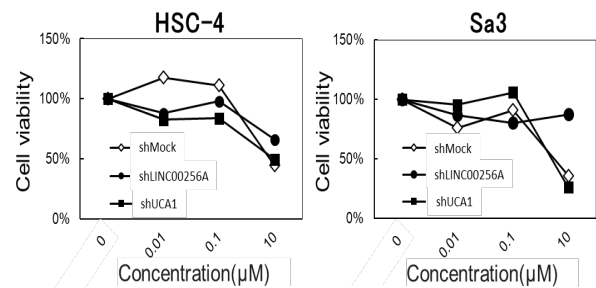
(図 3: shUCA1、shLINC00256A 導入による浸潤能の検証, invasion assay)



(図 4: shUCA1、shLINC00256A 導入による浸潤能の検証, migration assay)



(図 5 : shUCA1、shLINC00256A 導入による放射線耐性の検証、放射線耐性実験)



(図 6 : shUCA1、shLINC00256A 導入による抗癌剤耐性の検証、抗癌剤耐性実験)

(6)増殖、浸潤、転移、抗癌剤耐性、放射線耐性等に関連した lncRNA の塩基配列を基に、遺伝子データベースにおいて、相補的塩基配列を有する遺伝子を検索同定する。  
UCA1 と LINC00256A の相同的配列について検索した。UCA1 において DHRS4-AS1 が相同的配列を持つ候補として同定した。LINC00256A については相同的配列を持つ候補は存在しなかった。

(7)さらに、lncRNA の shRNA あるいは合成 lncRNA 導入前と導入後の細胞における遺伝子発現状態を micro array 解析により比較し、特異的に変動した遺伝子を検索する。

2 種の口腔癌細胞株 (HSC4、Sa3) において Control と shUCA1 の間で共通して発現の変動を認める遺伝子は 59 個認められた。また、Control と shLINC00256A の間で共通して発現の変動を認める遺伝子は 6 個認められた。しかし、shUCA1 と shLINC00256A の両遺伝子に共通変動遺伝子は存在しなかった。

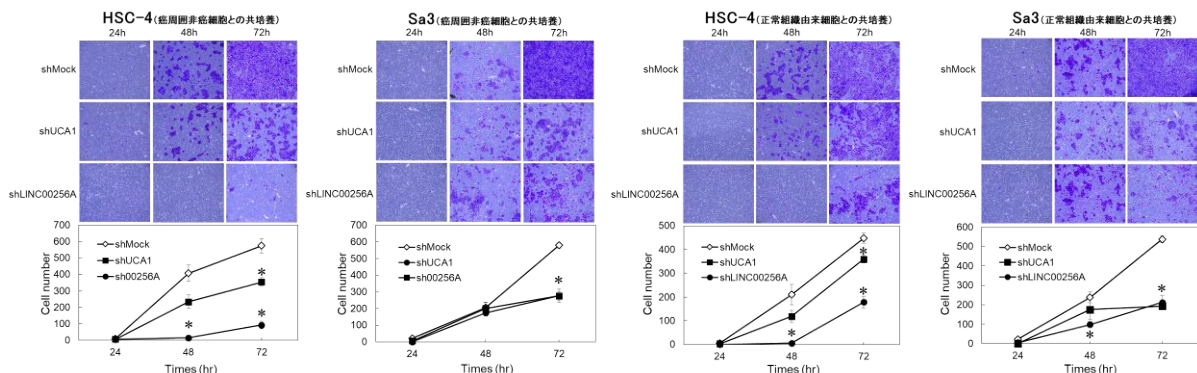
(8) (6),(7)でピックアップしたターゲット遺伝子候補に関して、ルシフェラーゼ発現解析システムを構築し、lncRNA による発現制御カスケードが実際に機能していることを確認する。

(6)(7)において、ターゲット遺伝子候補を認めなかった。

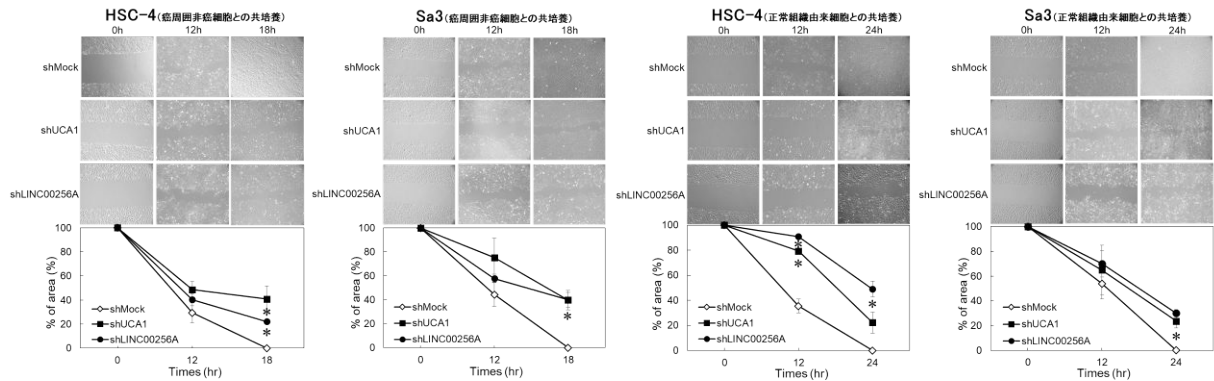
(9) lncRNA の shRNA または合成 lncRNA 導入により、フィルターを介した共培養系を用いて、癌細胞の非癌細胞に対する作用、また正常組織由来細胞と癌周囲非癌細胞に対する作用、ならびにその作用の差異を、増殖試験、invasion assay、migration assay、MTS assay による抗癌剤耐性実験、放射線耐性実験等により明らかにする。

4 人の臨床検体から癌周囲より採取した線維芽細胞を癌周囲非癌細胞、正常組織より採取した線維芽細胞を正常組織由来細胞と定義した。shUCA1 と shLINC00256A を導入した 2 種類の口腔癌細胞株 (HSC4、Sa3) を使用し、フィルターを介して正常組織由来細胞または癌周囲非癌細胞と共培養を行った。

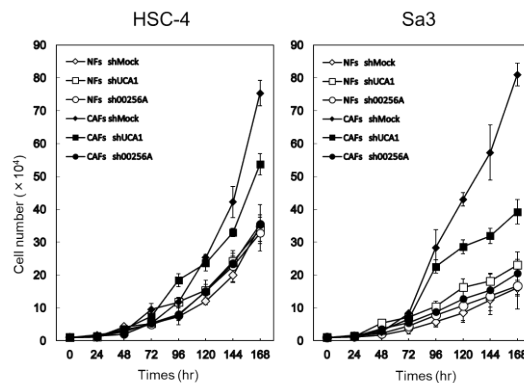
shUCA1 と shLINC00256A を導入した細胞は shMock との比較において、浸潤、遊走能の有意な低下を認め (図 7,8)、癌周囲非癌細胞との共培養においては、増殖能の有意な低下も認められた。(図 9) 抗癌剤耐性実験においては有意な差を認めなかった。(図 10) また、正常組織由来細胞と癌周囲非癌細胞との比較においては、癌周囲非癌細胞との共培養で shMock 細胞の増殖能の有意な亢進を認められたが、浸潤、遊走能はいずれにおいても有意な差は認めなかった。



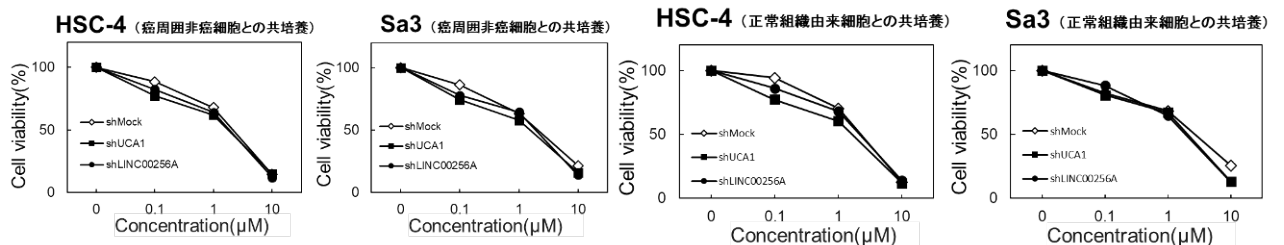
(図 7 : shUCA1、shLINC00256A 導入細胞と癌周囲非癌細胞または正常組織由来細胞との共培養による浸潤能の検証, migration assay)



(図 8 : shUCA1、shLINC00256A 導入細胞と癌周囲非癌細胞または正常組織由来細胞との共培養による遊走能の検証, migration assay)



(図 9 : shUCA1、shLINC00256A 導入細胞と癌周囲非癌細胞または正常組織由来細胞との共培養による増殖能の検証, proliferation assay)



(図 10 : shUCA1、shLINC00256A 導入細胞と癌周囲非癌細胞または正常組織由来細胞との共培養による抗癌剤耐性の検証, 抗癌剤耐性実験)

(10) 非癌細胞に対する lncRNA によると思われる作用を絞り込む。

2 種の lncRNA である UCA1 と LINC00256A は非癌細胞に関与せず、口腔癌細胞の浸潤・遊走能の亢進に関与することが示唆された。また、この lncRNA は口腔癌細胞と癌周囲非癌細胞との相互関係により、口腔癌細胞の増殖能の亢進に関与することが示唆された。

各 4 検体の癌周囲非癌細胞と正常組織由来細胞における lncRNA 発現状況を、micro array により網羅的に解析した。9 種の遺伝子において癌周囲非癌細胞で共通して発現亢進を認め、38 種の遺伝子において発現減弱を認めた。これらの lncRNA の発現状況を RT-qPCR で確認したが、各検体同様の有意な差は認めなかった。

5 . 主な発表論文等

- [ 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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：坂本 洋右

ローマ字氏名：SAKAMOTO, YOSUKE

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：50451745

研究分担者氏名：皆川 康之

ローマ字氏名：MINAKAWA, YASUYUKI

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：30639787

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。