

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03847

研究課題名(和文) non coding RNA吸着性環状RNAの癌増殖浸潤転移における役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of non-coding RNA adsorbed cyclic RNA in cancer growth invasion and metastasis.

研究代表者

笠松 厚志 (Kasamatsu, Atsushi)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60375730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌の進展や薬剤や放射線に対する耐性に関わるmiRNAやlong non coding RNAを特異的に吸着して調整機能を果たす癌抑制性環状RNAについて、網羅的遺伝子発現解析法を駆使して同定し、それらの機能を定性的・定量的に解析することで、核酸医薬としての可能性も検討することを最終目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験においてcircRNAの新たな定量的発現解析法を開発・確立し、OSCCにおいて有意に発現減弱を示すOSCC特異的環状RNA (circRNA-102450)を同定した。circRNA-102450は口腔癌でmiR-1178をスポンジのように吸着する事で、翻訳抑制機能を制御し、OSCCの進展に寄与している可能性が示唆されました。また、生体内で安定しているためバイオマーカーとして用いられると考え、口腔癌の進展度と有意な相関を示したことから血中circRNAの発現量を確認することは、臨床的に重要であると考えます。

研究成果の概要(英文)：The ultimate objective of this study was to identify tumor suppressor cyclic RNAs that specifically adsorb miRNAs and long non coding RNAs involved in cancer progression and resistance to drugs and radiation, and perform their regulatory function by using comprehensive gene expression analysis methods, and to analyze their functions qualitatively and quantitatively, and also to examine their potential as nucleic acid drugs.

研究分野：口腔科学

キーワード：口腔癌 non codingRNA circRNA miRNA circRNA Array

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環状 RNA は、1970 年代初頭に発見されており、splicing 後の RNA において re-splicing が起こることにより環状構造が形成されるが (Wiley Interdiscip Rev RNA. 2015;6(5):563-79) その詳細な機能については長い間解明されていない。

環状 RNA は生物界に広く存在し血液や唾液にも分布している (Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(20):7361-7366、Clin Chem. 2015; 61(1):221-230) また、血液や唾液中に存在するエクソソーム内にタンパク質、核酸とともに環状 RNA や miRNA 等の non-coding RNAs が存在していることも確認されている (Cell Res. 2015;25(8):981-4)

つい最近、環状 RNA の機能に関し、非常に興味深い知見が得られている。それは、環状 RNA が特定の miRNA や long non coding RNA をスポンジのように吸着する働きをし、miRNA や long non coding RNA の機能を調節することである (Nat Commun. 2016;6;7:11215) このデータは、環状 RNA が癌の進行・転移ばかりでなく、薬剤や放射線に対する感受性や耐性の調整をしている可能性があることを示唆している。しかし、実際の癌で、どの性質に関して、どの程度の調整をしているのかという疑問が残っている。また、核酸医薬としての可能性はどの程度あるのか、非常に興味深い課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、癌の進展や薬剤耐性や放射線耐性に関わる miRNA や long non coding RNA を特異的に吸着して調整機能を果たす癌抑制性環状 RNA について、網羅的遺伝子発現解析法を駆使して同定し、それらの機能を定性的・定量的に解析することで、核酸医薬としての可能性を検討したいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌細胞株 (OSCCs) における特異的 circRNA を同定し、それらの発現状況を確認することで、吸着されて機能を抑制される miRNA、long non coding RNA の存在を明らかにする。

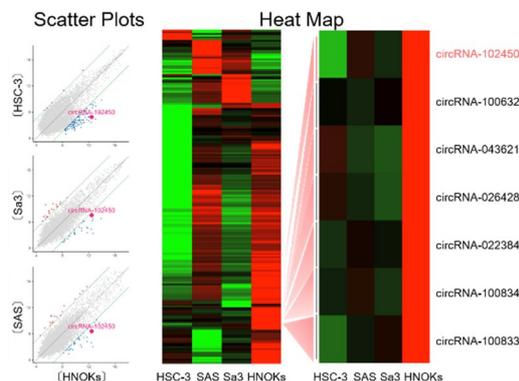
(2) 同定された口腔癌特異的 circRNA を人工的に合成し口腔癌細胞株に導入することで、miRNA や long non coding RNA の発現の変動を確認し、その発現の変動に伴う口腔癌細胞の細胞増殖能・浸潤能・遊走能の変化を確認する。

(3) 同定された癌抑制 circRNA について、それらの核酸医薬としての有効性を検討する

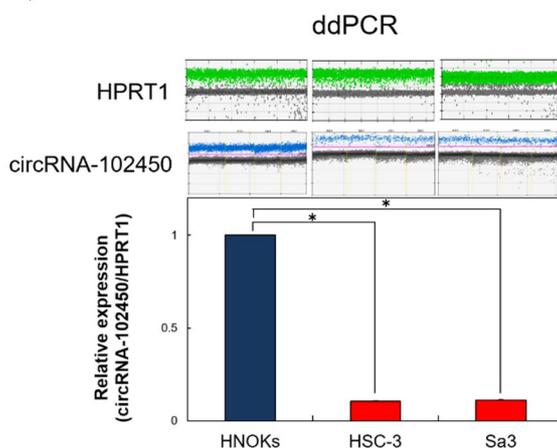
4. 研究成果

(1) 口腔癌細胞株 (OSCCs) における特異的 circRNA を同定し、それらの発現状況を確認することで、吸着されて機能を抑制される miRNA、long non coding RNA の存在を明らかにする。

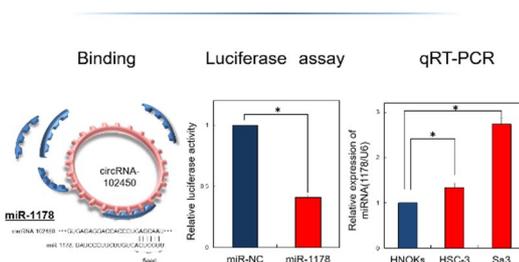
環状 RNA 特異的マイクロアレイ解析を行い、スカッタープロットおよびヒートマップを用いて評価した。フォールドチェンジ 3.0 以上で発現量の変化を示したものは計：196 個あり、そのうちダウンレギュレーションを示したのは 155 個。アップレギュレーションしていたのは 41 個だった。そのうちすべての細胞株でフォールドチェンジが 3.0 以上下がっていたものは 7 つ。共通してアップしているものは認めなかった。以上から、口腔癌で特異的に発現減少が示唆された circRNA-102450 に着目した(下図)。



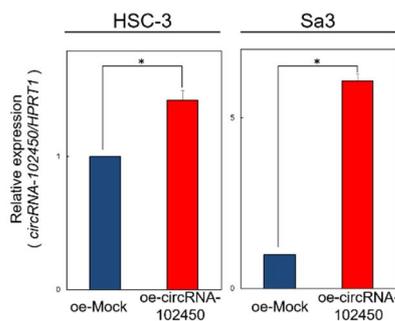
ddPCR で circRNA-102450 の OSCC 細胞株における発現量を確認したところ、HNOKs に比べ優位に発現低下を示した(下図)。



Circular RNA Interactome にて seed 領域の配列から circRNA-102450 に最も吸着する可能性が高い miR-1178 に着目した。ルシフェラーゼアッセイにて circRNA-102450 と miR-1178 の直接的な吸着を確認し、OSCC 細胞株では、miR-1178 の発現が亢進していることを確認した(下図)。

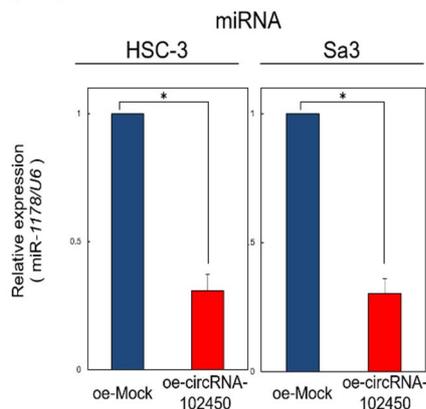


circRNA-102450 の発現増強株を樹立し、ddPCR にて circRNA-102450 の発現増強を確認した(下図)。

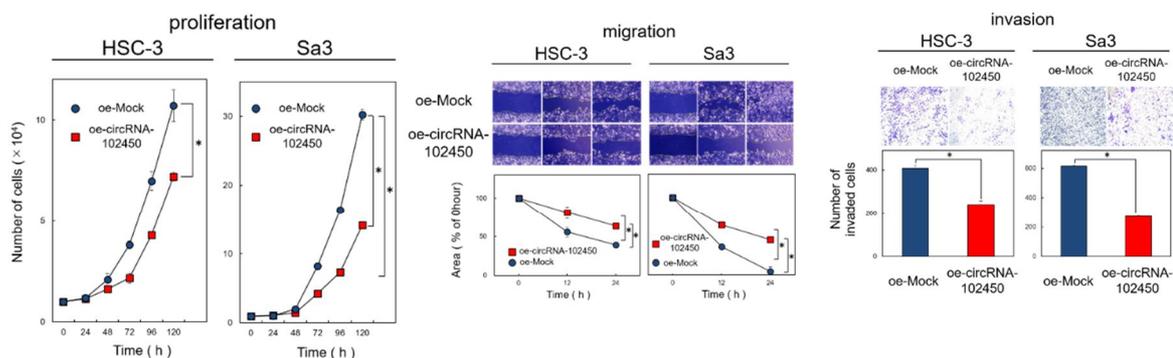


(2) 同定された口腔癌特異的 circRNA を人工的に合成し口腔癌細胞株に導入することで、miRNA や long non coding RNA の発現の変動を確認し、その発現の変動に伴う口腔癌細胞の細胞増殖能・浸潤能・遊走能の変化を確認する。

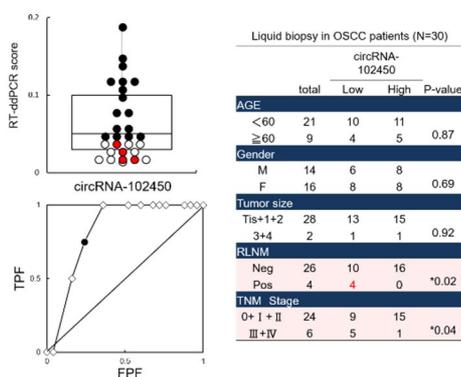
circRNA-102450 の発現増強株で miR1178 の発現が减弱することを確認した(下図)。



circRNA-102450 の発現増強株で細胞増殖能, 遊走能, 浸潤能が有意に低下することを確認した。



(3) 同定された癌抑制 circRNA について、それらの核酸医薬としての有効性を検討する(下図)。



Liquid Biopsy を用いて臨床検体 (血液) における circRNA の発現の変動を確認し、臨床指標との関係を明らかにした。ddPCR のスコアは 0.017 から 0.19 で、ROC カーブを用いてカットオフ値を 0.04 とした。circRNA-102450 の ddPCR のスコアがカットオフ値より低い症例はリンパ節転移およびステージ分類にて有意な相関を示した。circRNA-102450 の高発現を示したグループではリンパ節転移は認められず、低い発現量のグループのみリンパ節転移を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤壽晃 鵜澤一弘 笠松厚志 田中希 野淵嵩史 駒綾香 大島早智 伊豫田学 中嶋大 坂本洋右 椎葉正史
2. 発表標題 安藤壽晃癌抑制型環状RNA: 口腔癌誘発性マイクロRNAの特異的吸着効果による新規診断法の開発
3. 学会等名 日本口腔外科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鵜澤 一弘 (Uzawa Katsuhiko) (30302558)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	坂本 洋右 (Sakamoto Yosuke) (50451745)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	中嶋 大 (Nakashima Dai) (50431747)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	丹沢 秀樹 (Tanzawa Hideki) (50236775)	千葉大学・真菌医学研究センター・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------