

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10126

研究課題名(和文) 口腔癌の新たなバイオマーカーとしてのエクソソームによる高感度診断法と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of highly sensitive diagnostic and therapeutic methods using exosomes as a new biomarker for oral cancer

研究代表者

篠塚 啓二 (SHINOZUKA, Keiji)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：30431745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たな診断・治療法を開発するため、口腔扁平上皮癌細胞株におけるエクソソームを介して細胞外に放出されるmiRNAに着目した。口腔扁平上皮癌細胞株とヒト正常口腔粘膜細胞を用いて、miRNAマイクロアレイ解析の結果、著明な発現変動を示し、口腔癌に関与していることが示唆される20種類のmiRNAを同定した。これらを用いて、パスウェイ解析を行ったところ、6つのネットワーク形成が確認され、いずれも癌に関連する機能に強く関連を認めた。遺伝子群を調節する発現変動分子の上流調整因子には4つのmiRNAsが関与しており、これらは癌の発生・進行、上皮間葉転換に影響を与える分子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク、mRNA、miRNA、DNAなどの物質を内包しているエクソソームは血液、尿、唾液、骨髄などさまざまな体液中で確認されており、比較的容易に採取できる。このエクソソームに含まれる分子を解析することで、低侵襲かつ効率的に疾患の診断を行える可能性がある。また、エクソソームはある1つの受容体や酵素を阻害するのではなく、内包する物質がもつ総合的な効果で細胞の性質を変化させる性質をもつ点で、既存の治療薬とは全く概念が異なる。このようなことから、本研究の成果は全く新しいタイプの診断、治療法の開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on a systematic analysis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) exosomal miRNAs in order to develop new diagnostic and therapeutic methods. We performed microRNA microarray analysis in OSCC-derived cell lines and human normal keratinocytes (HNOKs) and identified 20 exosomal miRNAs that were differentially expressed in four OSCC-derived cell lines compared with those in HNOKs. To identify important functional networks and gene ontologies in OSCC, the identified miRNAs and their potential target genes were analyzed using Ingenuity Pathway Analysis. We detected six highly significant genetic networks which were enriched in cancer-related function. Four highly significant upstream miRNAs associated with tumorigenesis, tumor development, and regulation of the epithelial-mesenchymal transition. These analyses provide a comprehensive view of the functions of dysregulated exosomal miRNAs in OSCC, providing insight on its tumorigenesis and development.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔がん microRNA エクソソーム マイクロアレイ解析 ネットワーク解析 がん関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

口腔癌罹患数は年々増加傾向にあり、診断時には頸部リンパ節転移や遠隔転移をきたし、進行例も珍しくなく、予後も極めて不良である。口腔扁平上皮癌の治療は手術、化学放射線療法、分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬などの集学的な治療が行われている。また、CT、MRI、エコー、PET といった画像解析機器の進歩も目覚ましく、術前診断、術後経過の診断精度も向上している。しかしながら、5年生存率は、ここ10年間向上していない。予後を向上させるためには発癌メカニズムの解明が必要であるが、未だに十分に解明されていないのが現状である。最新の癌ゲノム研究から、口腔扁平上皮癌の発癌に関わる分子ネットワークを探索し、診断や治療の基礎となる知見を得ることの重要性が指摘されている。近年、機能性 RNA 研究から、がん細胞は様々な大きさの細胞外小胞を分泌し、がんの微小環境を構築していることが明らかとなってきた。エクソソームは、50-150 nm の大きさの細胞外小胞であり、その中には、機能性 RNA が封入されている。エクソソーム中の機能性 RNA は、周囲の細胞に取り込まれ、細胞間のコミュニケーションに重要な役割を担っていることが明らかとなってきており、その生物学的意義を明らかにすることで口腔癌の発癌メカニズムの解明につながることを期待されている。その中でもエクソソームに封入されている microRNA (以下 miRNA) は、がんの診断・治療の分子マーカーとして注目され、研究が進んでいる。また、エクソソームは培養細胞の上清液にも存在することが知られ、培養細胞上清液の miRNA を網羅的に解析した基盤研究は胃癌などでは行われているが、口腔癌では報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、新たな診断・治療法を開発するため、口腔扁平上皮癌細胞株におけるエクソソームを介して細胞外に放出される miRNA に着目し、口腔癌において活性化している分子ネットワークを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株とヒト正常口腔粘膜細胞 (Human normal oral keratinocytes、以下 HNOKs) の培養上清液中に含まれるエクソソームを回収し、エクソソームに含まれる miRNA を抽出した。腫瘍マーカーの候補となる miRNA を解析するために、ヒト 752 種類に対する miRNA プライマーが含まれている miRNA マイクロアレイ解析 (miRCURY LNA miRNA PCR System) を用いて、抽出した培養上清中の miRNA の発現状態を網羅的に解析した。発現状態について、HNOKs と比較して口腔扁平上皮癌細胞株 4 種類すべてに共通して発現増強もしくは減弱している miRNA を検索した。さらに選定した miRNA とその標的遺伝子について、Ingenuity Pathway Analysis (以下 IPA) software を用いて、パスウェイ解析を行い、miRNA を起点とした機能性 RNA ネットワークの探索を行った。

4. 研究成果

miRNA マイクロアレイ解析の結果、口腔扁平上皮癌細胞株 4 種類すべてについて、HNOKs と比較して、1.5 倍以上の発現が亢進された miRNA は 8 種類であった。一方で、1.5 倍以上の発現が減弱された miRNA は 12 種類であった。このように、癌細胞株で著明な発現変動を示し、口腔癌に関与していることが示唆される合計 20 種類の miRNA を同定した (図 1)。

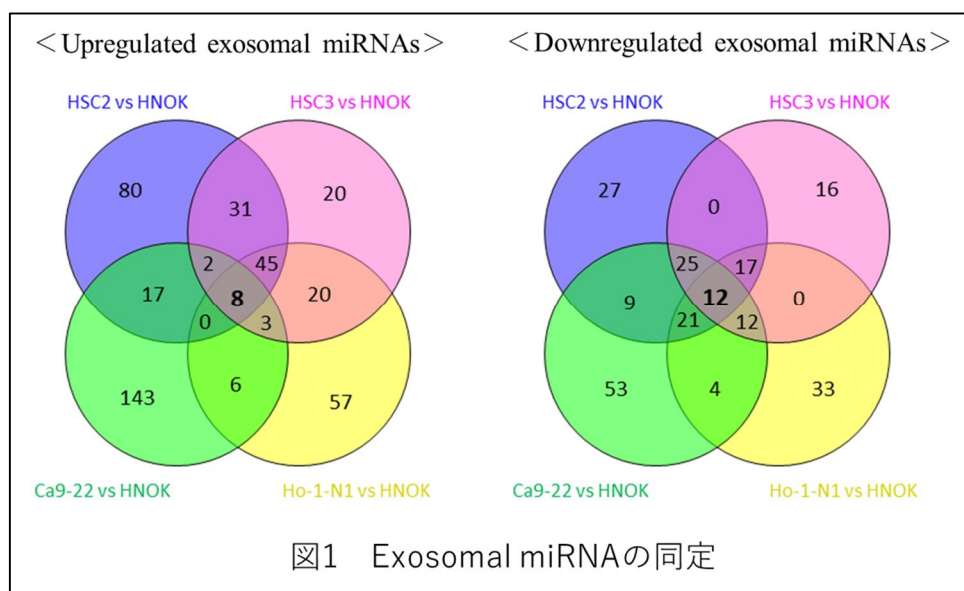
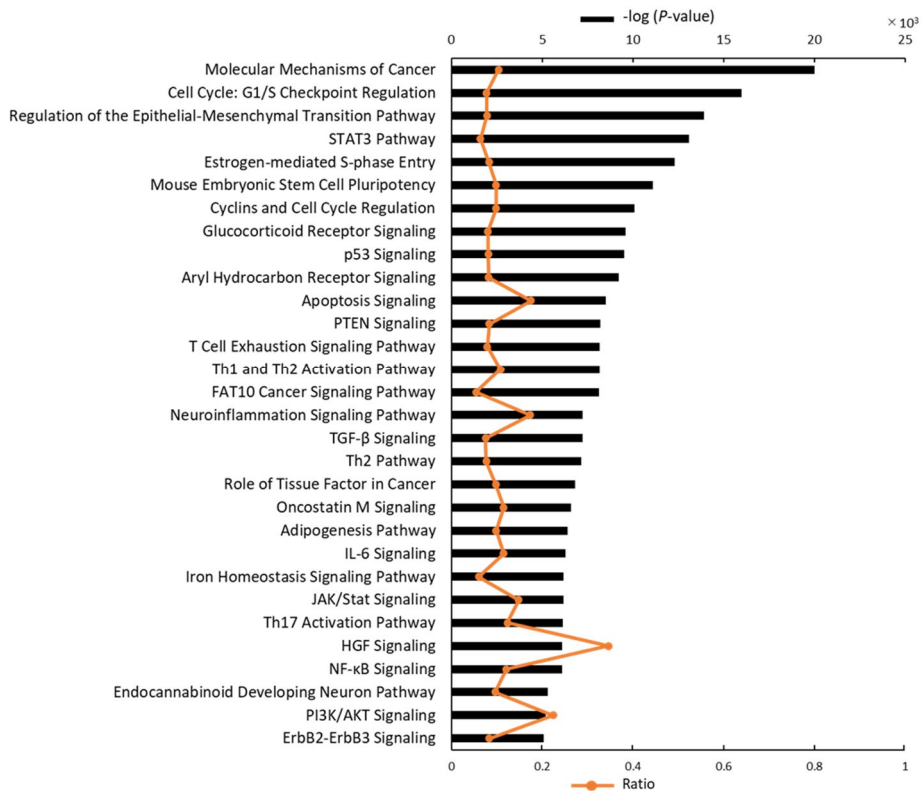


図1 Exosomal miRNAの同定

さらに同定した miRNA 20 種類とその標的遺伝子についてパスウェイ解析を行ったところ、6 つのネットワークが形成された。その中で最もスコアが高く、同定した標的遺伝子を有意に含むネ

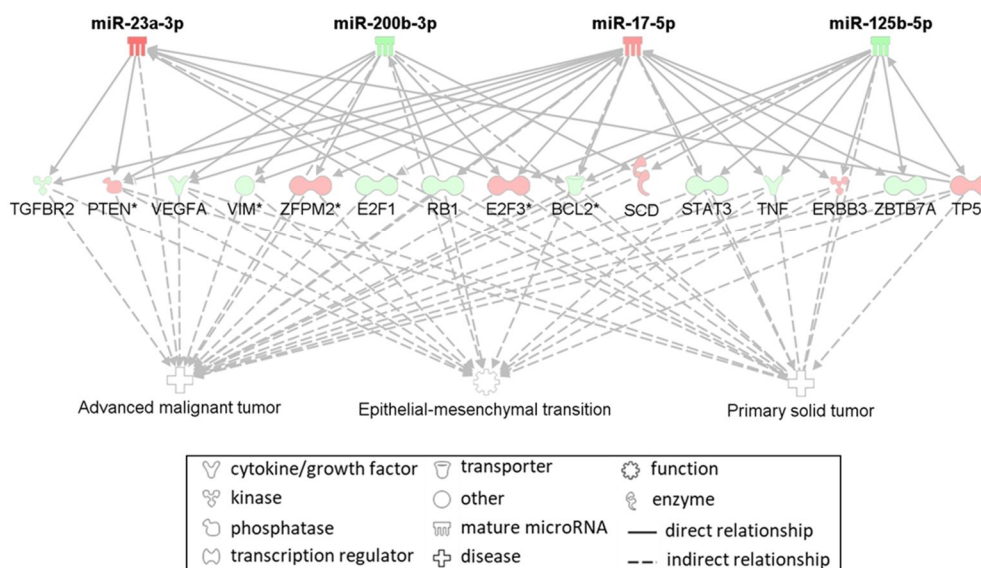
ネットワークは、miR-125b を中心としたパスウェイが形成されていた。さらに、選び出された miRNA とその標的遺伝子について、Gene ontology 解析を行い、遺伝子機能の重要性の高い順に分類した結果、疾患別には癌に最も関連しており、細胞分子機能別にみると cell death and survival、cellular development、cellular growth and proliferation、cell cycle など癌に関連する機能が上位を占めていた。細胞内プロセスとの関連を調べるため、標的遺伝子と既知の細胞内生体反応経路を比較する Canonical pathway 解析を行った結果、molecular mechanisms of cancer や cell cycle: G1/S checkpoint regulation に強く関連を認められた (図 2)。

図2 Canonical pathways



遺伝子群を調節する発現変動分子の上流調整因子候補を探索する Upstream regulator 解析を行った結果、4 つの upstream miRNAs (miR-125b-5p、miR-17-5p、miR-200b-3p、miR-23a-3p) を同定した。この 4 つの upstream miRNAs は固形癌の発生、癌の進行・浸潤・転移にかかわる上皮間葉転換に影響を与える分子であることが分かった (図 3)。

図3 Integrated network of the **top four upstream miRNA**



本研究により、エクソソーム由来 miRNA を起点とした分子ネットワークの解析を行ったところ、癌細胞株で著明な発現変動を示す 20 種類の miRNA を同定した。このうち、4 つの upstream miRNAs は口腔扁平上皮癌の新たな診断および腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masaoka T, Shinozuka K, Ohara K, Tsuda H, Imai K, Tonogi M.	4. 巻 63
2. 論文標題 Bioinformatics analysis of dysregulated exosomal microRNAs derived from oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 174-178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.20-0662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	外木 守雄 (Tonogi Morio) (50217519)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	
研究分担者	津田 啓方 (Tsuda Hiromasa) (60325470)	日本大学・歯学部・准教授 (32665)	
研究分担者	市ノ川 義美 (Ichnokawa Yoshimi) (20203101)	帝京大学・医学部・准教授 (32643)	
研究分担者	花上 伸明 (Hanaue Nobuaki) (40385232)	帝京大学・医学部・准教授 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小原 研心 (Ohara Kenshin) (70598507)	大阪大学・歯学部附属病院・医員 (14401)	

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