

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659469

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌の形質に関わる MicroRNA とその標的遺伝子の解析

研究課題名（英文） Analysis of microRNAs and their target genes associated with phenotypes of oral squamous cell carcinomas.

研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00200824

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌（OSC）細胞株ならびに正常口腔粘膜上皮細胞を用いて microRNA マイクロアレイ解析ならびに real time PCR を行い、OSC 細胞において発現の上昇している microRNA を 9 種、発現の低下している miRNA を 13 種同定した。これらの中で、OSC 細胞で発現が低下していた miR-34a に注目して解析した結果、miR-34a は癌抑制遺伝子として作用していることが明らかとなり、癌組織においても発現が低下していた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the expression of microRNAs in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines and normal oral keratinocytes by using microarray analysis and real time-PCR. It was demonstrated that the expression of 9 microRNAs was up-regulated and that of 13 microRNAs was down-regulated in OSCC cells compared with normal cells. We also revealed that miR-34a, one of down-regulated genes, acts as a tumor suppressor gene in OSCC cells and that the expression of the microRNA is down-regulated in OSCC tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	0	1,900,000
2010年度	700,000	0	700,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	150,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌、マイクロ RNA、悪性形質

1. 研究開始当初の背景

近年のヒトゲノムプロジェクトの発展とともに、癌をはじめとした種々の疾患においてマイクロアレイや SNP などを用いた遺伝子解析により、それらの疾患の発症機序の解明、予後の判定、さらには、治療に対する感受性の違いを明らかにする試みがなされてきている。しかしながら、多くの疾患は単一の遺

伝子によって生じるものではなく、また、遺伝子の発現レベルとその遺伝子産物である蛋白質の発現レベルとの間には関連が認められない場合も多く、種々の疾患を遺伝子のみから検討することには無理がある。そのため、種々の疾患を蛋白質発現のレベルで検討する、いわゆるプロテオミクス解析がおこなわれているが、現在のプロテオミクス解析

のレベルは、cDNA マイクロアレイ解析のように網羅性や定量性の両者を兼ね備えているとは言い難い。このような研究の流れの中で、近年、注目を浴びているのがヒトゲノム解析の成果として見つかったタンパク質をコードしない Non-coding RNA (ncRNA) である。ncRNA は全 RNA の約 98% を占めており、これらは細胞内で様々な機能を有することが最近の研究で明らかになった。したがって、今後、癌をはじめとする種々の疾患の研究においては、mRNA や蛋白質のみならず、ncRNA という方向からの解析も必要であると思われる。

MicroRNA (miRNA) は 18~24 塩基程度の小さな ncRNA で、現在 300 以上が報告されており、ほとんどは標的遺伝子の mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に部分相補的に結合し、標的遺伝子の翻訳を抑制する。最近では多くの miRNA が発癌と関連した LOH (loss of heterozygosity) や染色体の欠失・増幅などのみられる染色体不安定部に位置していることが報告されており、miRNA と発癌との密接な関連 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:2999-3004, 2004*)、癌抑制遺伝子として機能している可能性 (*Cell, 120:635-647, 2005*)、癌の診断マーカーあるいは予後予測因子となり得る可能性 (*Int. J. Cancer, 120:953-960, 2007*) が示唆されているが、口腔癌における miRNA に関する検討はなされていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、口腔癌、特に株化口腔扁平上皮癌細胞における miRNA の発現プロファイルを miRNA アレイにて検索し、その中から増殖、浸潤、転移および放射線・抗癌剤に対する抵抗性に関与する miRNA を同定するとともに、同定された miRNA の標的遺伝子を明らかにする。さらには、同定された miRNA の発現と臨床病態との関連について臨床材料を用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) 当教室で樹立した口腔扁平上皮癌細胞 (OSC-1~6 細胞) および正常口腔粘膜上皮細胞より miRNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて Total RNA を抽出後、Agilent human miRNA microarrays (V2) (Agilent Technologies) を用いて miRNA の解析を行なった。

(2) その中より、上記の癌細胞の形質との間に関連が認められる miRNA を候補遺伝子とする (miR-34a)。

(3) miR-34a が OSC 細胞の増殖、細胞周期ならびに浸潤能に関与しているか否かを、pre-miR-34a (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) あるいは miR-34a に対する

Specific locked nucleic acid (LNA) inhibitor (Exiqon, Vedbaek, Denmark) を OligofectAMINE (Invitrogen) を用いてトランスフェクションすることにより強発現あるいはノックダウンした後、MTT アッセイ、フローサイトメトリーによる解析、Boyden chambers (BioCoat matrigel, Collaborative Biomedical Products-Becton Dickinson) を用いた Cell invasion assay にて検討した。

(4) 舌癌組織における miR-34a の発現を、舌癌 16 症例のパラフィン包埋組織より正常組織および癌組織を採取し、RNA を抽出した後、リアルタイム PCR を行った。

4. 研究成果

(1) いずれの OSC 細胞においてもコントロールに比べ 10 倍以上の発現増強を示した miRNA が 9 種類、1 倍未満の発現低下を示した miRNA が 13 種類同定された (データ示さず)。

今回取りあげた miR-34a の発現強度は、OSC-1、-2、-4 および -6 ではコントロールの 0.1 倍以下であったが、OSC-3 および -5 ではそれぞれコントロールの約 2.5 および 4 倍であった (図 1)。

正常口腔粘膜上皮細胞および OSC 細胞における miR-34a の発現をリアルタイム PCR にて検討したところ、OSC 細胞における miR-34a の発現は正常口腔粘膜上皮細胞の 0.01 から 0.7 倍と、いずれの OSC 細胞においても低下しており、その発現低下の程度はマイクロ RNA アレイ解析の結果とほぼ一致していた。

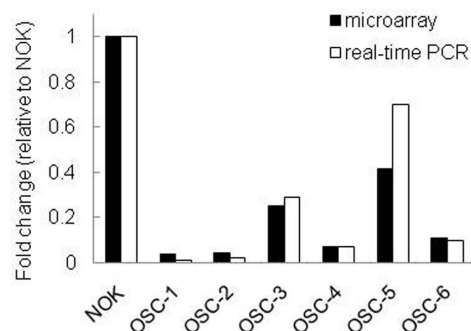


図 1. OSC 細胞における miR-34a の発現

(2) 細胞増殖に及ぼす影響について検討したところ、miR-34a の発現が特に低い OSC-1 および -2 細胞に miR-34a を導入したところ、細胞増殖はいずれの OSC 細胞においてもその増殖は有意に抑制された (図 2A)。

一方、miR-34a のアンチセンスを OSC-3 および -5 細胞に導入したところ、OSC-3 細胞では有意に細胞増殖が促進され、OSC-5 細胞では有意ではないものの軽度細胞増殖が促進された (図 2B)。

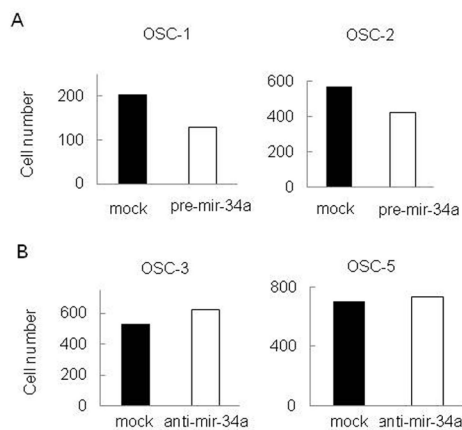


図 2. miR-34a の強発現およびノックダウンが OSC 細胞の増殖に及ぼす影響

(3) miR-34a が OSC 細胞の細胞周期に与える影響について検討したところ、OSC-1 および OSC-2 細胞いずれにおいても miR-34a を導入することにより G0/G1 期の細胞比率が増加し、S 期および G2/M 期の細胞比率が減少し、G0/G1 アレストが生じることが明らかとなった (図 3A)。

これに対し、OSC-3 および OSC-5 細胞の miR-34a をノックダウンすると、G0/G1 期の細胞比率が減少し、S 期および G2/M 期の細胞比率が増加した (図 3B)。

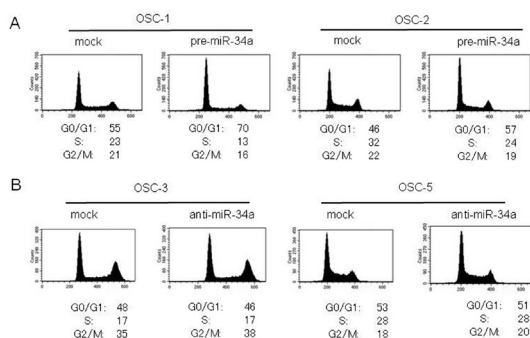


図 3. miR-34a の強発現およびノックダウンが OSC 細胞の細胞周期に及ぼす影響

(4) 次に、miR-34a が OSC 細胞の浸潤能に及ぼす影響について Invasion assay を用いて検討した。図 4A はその結果であるが、miR-34a を OSC-1 および OSC-4 細胞に導入することにより、いずれの細胞においても浸潤能は有意に抑制された。

逆に、miR-34a をノックダウンすると、OSC-3 細胞の浸潤能は有意に増強した (図 4B)。

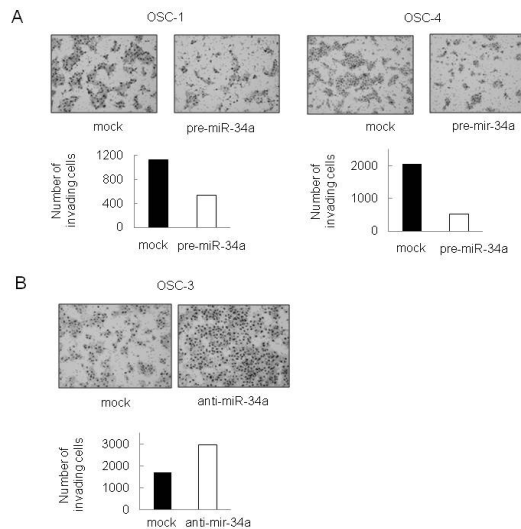


図 4. miR-34a の強発現およびノックダウンが OSC 細胞の浸潤能に及ぼす影響

(5) 舌癌組織における miR-34a の発現を検討したところ、癌部においては 2 例を除き、隣接した正常組織と比べて miR-34a の発現が低下しており、癌部における miR-34a の発現強度の平均はコントロールの約 0.65 倍であった (図 5)。尚、miR-34a の発現強度と病期との関連について検討したが、明らかな相関は認められなかった (データ示さず)。

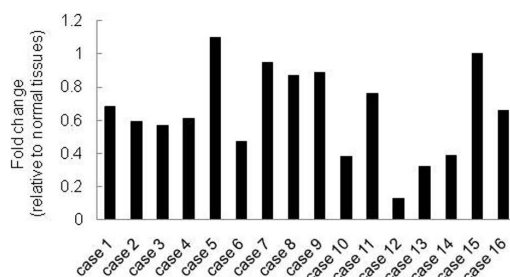


図 5. 舌癌組織における miR-34a の発現

(6) 上述のように microRNA は 20-24 塩基からなる短い non-coding RNA の一種で、標的遺伝子の翻訳を抑制することによりその遺伝子発現を調節する。近年、様々な癌において microRNA の発現異常が示されるとともに、その発現異常と癌の悪性度との関連が明らかにされつつある。しかしながら、口腔癌、特に口腔扁平上皮癌における microRNA の発現意義についてはほとんど明らかにされていない。そこで、今回われわれは口腔扁平上皮癌細胞株および口腔癌組織における microRNA に関する検討を行った。

OSC 細胞においても他臓器の癌と同様にいくつもの microRNA の発現強度に変化が認められ、9 種類の microRNA の発現強度はコントロールの 10 倍以上に増強しており、13 種類の microRNA はコントロールの 1 倍未満にその発現は低下していた。各 microRNA の標的遺伝子はそれぞれに異なっており、各 microRNA がどのような作用を発揮するかは細胞や培養条件によっても異なると考えられ、非常に複雑と思われる。しかしながら、これらの変化の総和が OSC 細胞の形質に関与していることは疑いの無い事実と思われる。そこで、その一端を少しでも明らかにすべく、発現変化の認められた microRNA の中から miR-34a を取り上げ解析した。

miR-34a に関しては、様々な癌腫でその発現が低下していることが知られており、癌の増殖・転移、アポトーシス、老化などに関与していることが知られている。Liu C らは、miR-34a の発現が前立腺癌幹細胞において低下していることを報告するとともに治療標的になる可能性を示唆しており、さらには、miR-34a が癌幹細胞マーカーである CD44 を標的遺伝子としていることを報告している。しかし、口腔扁平上皮癌における miR-34a の役割に関する報告は無い。

miR-34a は OSC 細胞においては上述のように癌抑制遺伝子として作用していると考えられた。データベースでの検討からすると、miR-34a の標的遺伝子の 1 つに細胞周期制御蛋白である CDK4 が挙げられる。そこで、CDK4 が本当に miR-34a の制御を受けているか否かを検討した。つまり、OSC 細胞に miR-34a を導入した際に CDK4 の発現がどう変化するかを検討した。その結果、OSC-1、-2、-4 および-6 細胞いずれにおいても miR-34a の導入により CDK4 の発現が低下した(データ示さず)。このことより、miR-34a は少なくとも 1 つは CDK4 を標的遺伝子としていることが確かめられた。

以上のことより、miR-34a は OSC 細胞における CDK4 の発現低下を介して細胞周期を G0/G1 期に停止させ、細胞増殖を抑制するのではないかと考えられた。今後、この miR-34a が OSC 細胞の化学放射線療法に対する感受性にどのように関与しているかを検討することが、癌治療という観点からすると重要であると思われる、その点を検討する必要があると思われる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tomohide Yoshimura, Ge Huabing, Wang Jianguo, Eri Sasabe, Tomohiro Yamada, Tetsuya Yamamoto. The down-regulated

micro RNA in oral squamous cell carcinoma acts as a tumor suppressor. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2011 Annual Meeting, September 18, 2011, Philadelphia Convention Center, Philadelphia, USA.

- ② 吉村友秀、笹部衣里、葛花冰、北村直也、山本哲也. 口腔扁平上皮癌細胞の放射線感受性に及ぼすマイクロ RNA の影響に関する検討. 第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2011 年 4 月 21 日、東京。
- ③ 吉村友秀、笹部衣里、北村直也、山本哲也. 口腔扁平上皮癌におけるマイクロ RNA の発現と増殖・浸潤における役割についての検討. 第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会、2010 年 11 月 13 日、高知。
- ④ 吉村友秀、笹部衣里、森下慶子、山田朋弘、山本哲也. 口腔扁平上皮癌細胞におけるマイクロ RNA の発現変化ならびにその機能. 第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 2010 年 6 月 25 日、札幌市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：00200824

(2) 研究分担者

笹部 衣里 (SASABE ERI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：40363288
森下 慶子 (MORISHITA KEIKO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：10527584