

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 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791960

研究課題名（和文） 化学療法に耐性を示す口腔癌は血清中の miRNA で判定できるか

研究課題名（英文） The judgment of oral carcinoma which shows tolerance to the chemotherapy by miRNA in serum.

研究代表者

松田 彩 (MATSUDA AYA)

北海道大学・大学院歯学研究科・学術研究員

研究者番号：60514312

研究成果の概要（和文）：口腔癌細胞株よりシスプラチン耐性株とシスプラチン感受性株を樹立した。これらの細胞株を用いてシスプラチン耐性に関与する遺伝子とそれに結合する miRNA を検索した。miRNA の発現パターンによりシスプラチン耐性能が変化し、また血液などの液性成分中の miRNA が口腔癌の悪性度に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The cisplatin resistant cell and the cisplatin sensitive cell were established from the oral carcinoma cell line. The genes which participate in cisplatin tolerance using these cells, and miRNAs combined with the genes were searched. It was suggested that the expression patterns of miRNA change cisplatin resistant, and miRNA in blood is participating in malignancy of oral carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,323,188	396,956	1,720,144
2010年度	276,812	83,044	359,856
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

白金錯体化合物であるシスプラチンは口腔癌の化学療法における中心的薬剤として広く使用されている薬剤であり、シスプラチンを中心とした多剤併用化学療法により良好な治療効果を得られる。しかし、癌が薬剤に対して抵抗性を示すことがあり、これが臨床で大きな問題になっている。したがって、化学療法開始前に、癌の薬剤に対する感受性の程度がわかれば、治療方針を立てる上で非常に有益である。現在までにシスプラチン耐性細胞株を用いて、シスプラチン耐性マーカーの特定の試みが多くなされているが、実際

に臨床応用はなされていない。これまではタンパク質をターゲットとしたシスプラチン耐性遺伝子の検索が多くなってきたが、最近タンパク以外に miRNA がシスプラチン耐性に関与する可能性が示唆されている。

miRNA は真核生物で遺伝子の発現を制御するノンコーディング RNA の一種であり、遺伝子発現調節において重要な役割を演じていることが近年明らかになってきた。miRNA はターゲットとなる mRNA に結合し、その分解や翻訳抑制によりタンパク合成を阻害することが知られており、個体の発生、細胞の増殖、分化、アポトーシスなど多岐にわたる現

象に関与することが明らかになってきている。ハイスループットなリアルタイム PCR やマイクロアレイにより、口腔癌、乳がん、慢性リンパ性白血病などさまざまな癌種で miRNA の網羅的な発現プロファイルが行われている。現在までに多くの miRNA が癌の発生、進展に関わっていることが報告されており、いくつかの miRNA は癌化の過程において癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子として働くことがわかってきた。

miRNA は血清中で RNase で分解されず、安定して存在していることが報告されている。また、肺癌や前立腺がんなどの患者の血清中の miRNA の発現パターンが特異的であることが報告されており、miRNA が癌の早期発見のためのマーカーとなりうることが示唆されている (Chen et al., 2008)。

これまでに申請者は miRNA の一つである miR-214 がヒトアデノウイルスの初期転写遺伝子 E1A の mRNA をターゲットとし、E1A の発現を制御することによりアデノウイルスの感染を抑制することを明らかにした (柳川, 2007)。miR-214 は卵巣がんにおいて癌抑制遺伝子である PTEN の mRNA に結合してタンパク合成を抑制し、細胞の生存シグナルの伝達系において重要な役割を担っている Akt pathway を活性化することにより、シスプラチン耐性を誘導することが報告されている (Yang et al., 2008)。ヒトにおける miRNA は現在、500 種類以上が同定されており、癌化に関与する miRNA は他にも多く存在すると考えられる。

そこで、申請者は口腔癌細胞において miRNA が化学療法に対する感受性を左右するかどうか、また血清中の miRNA の発現のパターンにより、口腔癌の化学療法に対する感受性の程度を予測できるかどうか明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

I : 患者の血清中のマイクロ RNA (miRNA) を用いて口腔癌の化学療法に対する感受性の程度を判定すること

II : 口腔癌が抗がん剤に対して耐性を獲得するメカニズムに miRNA がどのように関与しているかを解明すること

3. 研究の方法

(1) シスプラチン耐性細胞の樹立

96 穴培養皿を用いて、段階希釈法により口腔癌細胞 HSC3 を単細胞培養し、株化した。それぞれの細胞株をシスプラチンで処理し、処理後 4 日目に親株よりも細胞数が多いものをシスプラチン耐性株、親株よりも細胞数が少ないものをシスプラチン感受性株とした。

(2) DNA マイクロアレイ

(1) で樹立したシスプラチン耐性株、シスプラチン感受性株から RNeasy Mini kit (QUAGEN) により RNA を精製し、Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイキット

(Agilent) を用いて遺伝子発現を解析した。

(3) リアルタイム PCR

培養細胞から TRI reagent (SIGMA) を用いて全 RNA を精製した。ランダムプライマーを用いて ReverTra Ace (TOYOBO) により RT を行い、cDNA を合成した。その cDNA を鋳型とし、FOXAI のプライマーを用いて SYBR Green Realtime PCR Master Mix -Plus- (TOYOBO) により、リアルタイム PCR を行った。

miRNA の発現は TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を用いて解析した。培養細胞から TRI reagent (SIGMA) により全 RNA を精製し、miR-214 のプライマーを用いてリアルタイム PCR をおこなった。

(4) miRNA アレイ

(1) で樹立したシスプラチン耐性株、シスプラチン感受性株から miRvana miRNA isolation kit (Ambion) により RNA を精製し、miRvana miRNA Bioarrays (Ambion) を用いて miRNA の発現を解析した。

4. 研究成果

実験に使用するシスプラチン濃度、シスプラチン処理時間を決定するために、HSC3 を 12 穴培養皿に播き、11ug/ml、15ug/ml、22ug/ml の濃度のシスプラチンで、臨床で用いるときと同様に 1 時間処理し、細胞数を計測した。その結果、22ug/ml の濃度のシスプラチンで処理した HSC3 では、処理後 4 日目に 1 日目とほぼ同数の細胞数を保った (図 1)。そのためこの濃度でシスプラチン耐性の判定をすることとした。

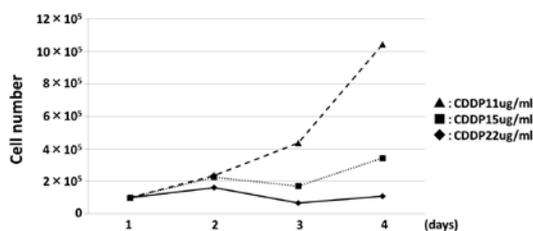


図1: シスプラチン濃度によるHSC3細胞の増殖の変化

HSC3 をシングルセルクローニング法により株化し、22ug/ml のシスプラチンで 1 時間処理し、シスプラチン処理後 4 日目の細胞数を計測した。その結果、細胞数が 0 日目と比較して増えたものを耐性株 (R1、R2)、細胞数が 0 日目と比較して減少したものを感受性株 (S1、S2) とした (図 2)。

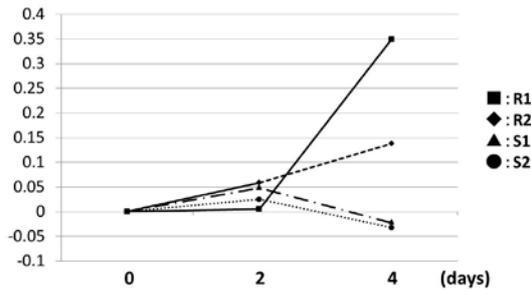


図2: CDDP耐性細胞株とCDDP感受性細胞株のシスプラチン処理時の細胞数の割合

シスプラチン耐性株 R1、R2 とシスプラチン感受性株 S1、S2 から RNA を精製し、DNA マイクロアレイを行った。その結果、シスプラチン耐性細胞株で発現が亢進している候補遺伝子 FOXA1 が検索され、リアルタイム PCR により FOXA1 mRNA の発現がシスプラチン耐性株でシスプラチン感受性株よりも高いことが示された (図3)。

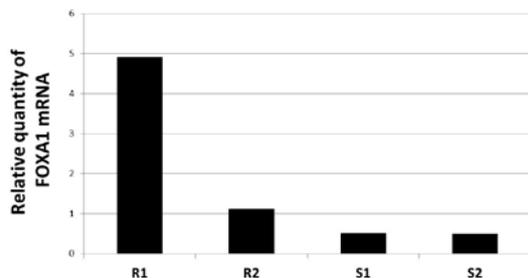


図3: シスプラチン耐性細胞株とシスプラチン感受性細胞株における FOXA1 mRNA の発現

また、シスプラチン処理をした親株の HSC3 でリアルタイム PCR により FOXA1 mRNA の発現を検討したところ、シスプラチン濃度が高いほど、FOXA1 の発現が高いことが示された (図4)。

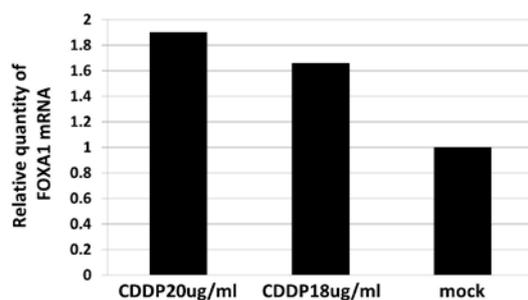


図4: シスプラチン処理をしたHSC3におけるFOXA1の発現

シスプラチン耐性株 R1、R2 とシスプラチン感受性株 S1、S2 から small RNA を含む全 RNA を精製し、miRNA アレイを行った。その結果、シスプラチン感受性細胞で発現が亢進している miRNA のうち、miRNA のターゲット検索サイト Pictar を用いて seed sequence との相補性や Free energy の大きさから FOXA1 と結合することが予測される miRNA を 10 個検索した (図5)。

miRNA	Free energy (kcal/mol)
hsa-miR-200a	-22.8
hsa-miR-106a	-22.7
hsa-miR-17-5p	-22.5
hsa-miR-141	-21.9
hsa-miR-132	-20.8
hsa-miR-20a	-20.5, -15.6, -12.5
hsa-miR-99a	-19.9
hsa-miR-93	-18.6
hsa-miR-194	-16.3
hsa-miR-30e	-12.9, -12.7

図5: シスプラチン感受性細胞で発現が亢進し、FOXA1と結合することが予測される候補miRNA

これらのうち、現在までに癌に関連する機能が報告されているものとして、hsa-miR-200a、hsa-miR-106a、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-20a、hsa-miR-93 があげられ、そのうち hsa-miR-106a と hsa-miR-20a は薬剤耐性についても報告があった (図6)。

miRNA	発現上昇	発現低下	薬剤耐性	予後
hsa-miR-200a		肝細胞癌		
hsa-miR-106a	肺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、前立腺癌		高発現の乳癌で doxorubicin 耐性 (target RB1) 低発現の胃癌で vincristine 耐性	大腸癌
hsa-miR-17-5p	乳癌、肺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、前立腺癌			
hsa-miR-20a	結腸直腸癌、膵臓癌、前立腺癌		高発現の卵巣癌で doxorubicin、vinblastine 耐性	
hsa-miR-93	食道癌			

図6: シスプラチン感受性細胞で発現が亢進するmiRNAの機能

15ug/ml の濃度で 1 時間シスプラチン処理した口腔癌細胞 HSC3、HSC4 で増殖数を比較したところ、シスプラチン処理後 2 日目、4 日目で HSC3 の増殖数が HSC4 よりも高く、シスプラチン耐性が高いことが示された (図7)。

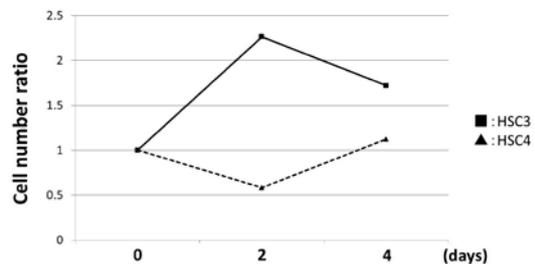


図7: シスプラチン処理した口腔癌細胞の増殖数の比較

miR-214 が卵巣がんにおいてシスプラチン耐性を誘導することが報告されていることから、HSC3、HSC4 の miR-214 の発現量をリアルタイム PCR により計測した。その結果、HSC3 で HSC4 よりも miR-214 の発現量が高いことが示された (図8)。このことより口腔癌でも miR-214 の発現量が高いとシスプラチン耐

性能が向上することが示唆された。

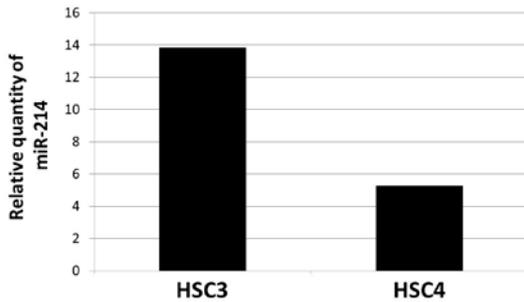


図8: 口腔癌細胞におけるmiR-214の発現

液性成分により、培養細胞に変化を生じるかどうかを調べるため、口腔癌細胞 HSC2、SAS の培養上清で線維芽細胞 BJ を培養し、細胞の増殖を検討した。その結果、HSC2 の培養上清で培養した BJ で細胞増殖が亢進した (図 9)。

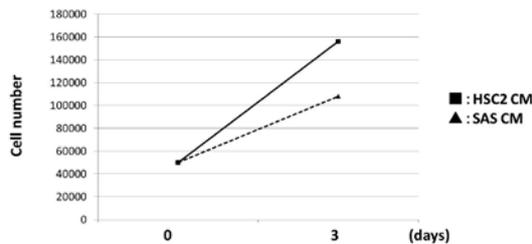


図9: 口腔癌細胞の培養上清による線維芽細胞の増殖の変化

また、これらの口腔癌細胞 SAS、HSC2 における miR-214 の発現をリアルタイム PCR により検索したところ、HSC2 で SAS よりも miR-214 が多く発現することが示され (図 10)、培養上清中の miR-214 が線維芽細胞の増殖を亢進することが示唆された。

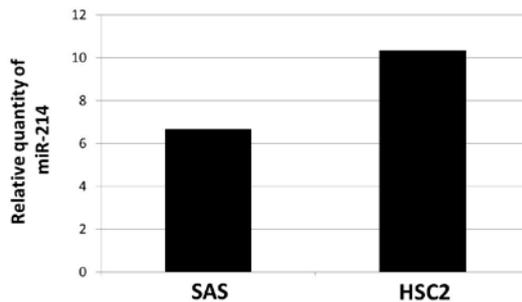


図10: 口腔癌細胞におけるmiR-214の発現

以上より、miRNA の発現パターンによりシスプラチン耐性能が変化し、また血液などの液性成分中の miRNA が癌の悪性度に関与していることが示唆された。

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)

①Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Ishikawa S, Akino T, Kondoh M, Maishi N, Matsuda A, Inoue N, Shindoh M, Hida K., Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 upregulation via VEGF signaling in tumor microenvironment, Am J Pathol, 査読有, 180, 2012, 1283-93, S0002-9440(11)01097-2 [pii]

②東野 史裕、北村 哲也、柳川彩、松田 彩、進藤 正信、新しい口腔癌の発生メカニズムとのトランスレショナルリサーチ、査読有、北海道歯学会誌、32 巻、2011、65-67
[学会発表] (計 3 件)

①松田彩、北村哲也、樋田京子、東野史裕、進藤正信、miR-214 はアデノウイルスの増殖に抑制的にはたらく、第 22 回日本臨床口腔病理学会、第 5 回アジア口腔病理学会、2011 年 8 月 24 日、九州大学 (福岡市)

②Yanagawa-Matsuda A, Kitamura T, Hida K, Higashino F, Shindoh M, miR-214 can regulate adenovirus replication, 第 63 回日本細胞生物学会、2011 年 6 月 27 日、北海道大学 (札幌市)

③柳川彩、北村哲也、東野史裕、樋田京子、進藤正信、miR-214 は E1A をターゲットにしてアデノウイルス感染の抑制にはたらく、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 彩 (MATSUDA AYA)

北海道大学・大学院歯学研究科・学術研究員

研究者番号：60514312