

機関番号：15401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791999
 研究課題名（和文） 上皮・間葉移行を介した扁平上皮癌の高度浸潤能獲得におけるマイクロ RNA の関与
 研究課題名（英文） The participation of micro RNA acquiring the ability with high-invasiveness via Epithelial-mesenchymal Transition in squamous cell carcinoma
 研究代表者
 小野 重弘（ONO SHIGEHIRO）
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：70379882

研究成果の概要（和文）：

樹立した細胞株と EMT を獲得した高度浸潤型細胞株における microRNA の発現を網羅的に解析するため、microRNA マイクロアレイ法により遺伝子発現解析を行った。その結果、9 個の microRNA を同定した。これらの結果は、口腔扁平上皮癌の浸潤・転移機構に大きく関与していると考えられるため、今後、予後予測、分子ターゲット治療などの臨床応用が期待されると強く考える。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to find significant microRNAs for acquiring high-invasiveness in SCC cell lines using microRNA microarrays. As a results of the investigation, I have identified 9 microRNAs related infiltration. These results suggest that identified microRNAs in this research will be candidates of a cancer therapy target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔外科学

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

口腔扁平上皮癌は、被覆上皮に由来する悪性腫瘍で周辺組織へ浸潤し、リンパ節や他臓器に転移する。癌の浸潤・転移は、患者の予後を左右する重要な因子であり、病理組織学的にいくつかの浸潤様式による分類が用いら

れている。特に、予後が悪い高度浸潤型の口腔扁平上皮においては、細胞間接着が消失し、個々の癌細胞が散在性に浸潤する像を呈する。われわれは、口腔扁平上皮癌における上皮・間葉移行（EMT）を介した接着因子 E-カドヘリンの発現消失が、高度浸潤能獲得に

強い相関を示すことを報告し、EMT 関連遺伝子を同定するために正常上皮細胞に近い細胞形態を示す扁平上皮癌細胞株とEMTを獲得し線維芽細胞様形態を示す高度浸潤型口腔扁平上皮癌細胞株を分子レベルあるいは細胞レベルで比較検討を重ねてきた。

一方で、癌の発生にタンパク質にコードされない、いわゆる non-coding RNA が関与していることが近年の多数報告されている。その中でも microRNA は、細胞の増殖、分化、アポトーシスに重要な役割を果たしていると考えられている。また、microRNA は、小さい一本鎖 RNA であり、タンパク質をコードするメッセンジャーRNA に対して、相補的な配列を有し、ターゲット遺伝子の翻訳（発現）を抑制する。癌において、発現異常の見られる microRNA およびターゲット遺伝子は一部しか同定されていない。

また、microRNA とヒト口腔扁平上皮癌の EMT を介した浸潤・転移との関連についての論文はほとんどない。microRNA が EMT を介した口腔扁平上皮癌の高度浸潤能獲得に大きく関与していることを証明することを目的とした。

2. 研究の目的

microRNA が EMT を介した口腔扁平上皮癌の高度浸潤能獲得に大きく関与していることを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

独自に樹立した扁平上皮癌細胞株とEMTを獲得した高度浸潤型扁平上皮癌細胞株におけるmicroRNAの発現を網羅的に解析するために、microRNAマイクロアレイ法により、網羅的遺伝子発現解析を行い、microRNAが誘導する高度浸潤能獲得の機序を明らかにする。マイクロアレイに関しては、サンプル調整後、GPバイオサイエンス社に委託し、結果を解析した。マイクロアレイ機器は、Affimetrix社製

のものを使用した。

用いた細胞は、以下に記載する。

正常上皮細胞に近い細胞形態を示す扁平上皮癌細胞株：

A431, OM1, HOC719PE

EMTを獲得し線維芽細胞様形態を示す高度浸潤型口腔扁平上皮癌細胞株：

HOC719NE, TSU, HOC313

転写因子Snailを強制発現させて、高度浸潤能を獲得した扁平上皮癌細胞株：

A431-sna, OM1-sna

上記遺伝子導入に用いたベクターのみ（空ベクター）を遺伝子導入した細胞：

A431mock, OM1mock

本研究で用いた口腔扁平上皮癌細胞株はすべて、独自で樹立したものである。

すべての細胞で、発現しているmicroRNAを網羅的に解析を行い、結果を以下の方法で、解析・検討した。

解析 1 Quality Control

解析 2 高度浸潤能獲得に関する遺伝子の探索

- A) A431 細胞株でベクターを導入した事により変動したmicroRNA の抽出
- B) A431 細胞株遺伝子導入した高度浸潤能獲得したことに起因するmicroRNA の抽出 ((1)で得られた空ベクター導入によって変動したmicroRNA は除く)
- C) OM1 細胞株でも同様の解析
- D) A431 とOM1 で共通して変動している microRNA の抽出

解析 3 高度浸潤能獲得に関するmicroRNA のターゲット遺伝子の探索

- A) 解析2-D)で得られた細胞株間共通で変動したmicroRNA のターゲット遺伝子を抽出

解析 4 浸潤型の違いに関するmicroRNA の探索

A) 低浸潤型細胞と高度浸潤型細胞で変動しているmicroRNA を抽出

4. 研究成果

樹立した細胞株と EMT を獲得した高度浸潤型細胞株における microRNA の発現を網羅的に解析するため、microRNA マイクロアレイ法 (Affymetrix) により遺伝子発現解析を行った。その結果、9 個の microRNA を同定した。

以下に、同定した microRNA を示す。ターゲットスキャンによって得られた目的因子については、現在、引き続き検討中である。

発現上昇の見られたmicroRNA

hsa-miR-30a

hsa-miR-320a

hsa-miR-320b

hsa-miR-320c

hsa-miR-30c-2-star

発現低下の見られたmicroRNA

hsa-miR-17

hsa-miR-18a

hsa-miR-27a-star

hsa-miR-200a-star

これらの結果は、口腔扁平上皮癌の浸潤・転移機構に大きく関与していると考えられる。現在、さらにこれらmicroRNAを遺伝子導入し、分子生物学的あるいは細胞生物学的に解析を進めているところである。今後、倫理委員会を経て得られた臨床検体などを用いてさまざまな因子を解析することにより、患者の予後予測あるいは分子ターゲット治療などの臨床応用が期待されると強く考える。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki-67 in the border between Lugol-stained and -unstained areas. Ohta K, Ogawa I, Ono S, Taki M, Mizuta K, Miyauchi M, Takechi M, Shigeishi H, Takata T, Kamata N. *Oncol Rep.* 査読あり 2010. 24(1):9-14.
2. Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, Higashikawa K, Kamata N.: Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 査読あり 2009. 34(6):1565-71.
3. DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, Shigeishi H, Ono S, Kamata N. *Int J Cancer.* 査読あり 2009. 124(12):2837-44.

[学会発表] (計 3 件)

1. 東川晃一郎, 田中扶美, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之, EMT 型口腔扁平上皮癌細胞における gamma-secretase inhibitor 抵抗性の解析: 第 54 回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 2009. 10. 9, 札幌
2. 田中扶美, 東川晃一郎, 重石英生, 小野重弘, 鎌田伸之, 口腔扁平上皮癌細胞における高度浸潤能獲得機構の解析: 第 54 回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 2009. 10. 9, 札幌
3. Tanaka F, Higashikawa K, Tobiume K, Ono S, Shigeishi H, Kamata N, A Snail-induced

secretory protein associated with the
invasiveness of squamous cell carcinoma :
第 68 回日本癌学会・学術総会,
2009.10.3, 横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 重弘 (ONO SHIGEHIRO)

広島大学

大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 70379882

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :