

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 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 年 ～ 2011 年

課題番号：22659364

研究課題名（和文）microRNA による放射線耐性遺伝子 ICAM 発現抑制による強化放射線治療法

研究課題名（英文）Enhanced radiation therapy using microRNA via regulation of ICAM2 signalling

研究代表者

丹沢 秀樹 (TANZAWA HIDEKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50236775

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌において Intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) 遺伝子は放射線耐性に強く関与していることを既に報告した。本研究では ICAM2 の発現を制御している microRNA (miRNA) として miR-125b を同定したため、その効果について検証した。結果、正常口腔粘膜上皮と比較して口腔扁平上皮癌では miR-125b の発現が減弱していた。また、miR-125b を強発現させた細胞株では ICAM2 の発現抑制が確認されるとともに、in vitro および in vivo において X 線感受性の増強が認められた。以上により、miR-125b が ICAM2 の発現調整を行うことで、放射線治療感受性を増強できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that *intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2)* gene is closely associated with radioresistant mechanism in oral squamous cell carcinoma (OSCC). And we identified miR-125b potentially regulating ICAM2 gene expression. In this study, we evaluated the potential of targeting miRNA-125b for overcoming radio-resistance of OSCC with controlled ICAM2-associated signaling. Significantly downregulated expression of miR-125b was revealed in OSCC-derived cell lines and OSCC samples when compared with human normal keratinocytes. Furthermore, miR-125b-transfected cells showed an enhanced radiosensitivity to X-ray irradiation, and diminished ICAM2 mRNA expression.

The data suggest that upregulated expression of miR-125b can induce an enhanced radiosensitivity via regulation of ICAM2 signalling.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,800,000 | 390,000 | 3,190,000 |

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：microRNA、口腔癌、放射線耐性、ICAM 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

放射線耐性遺伝子や因子は世界中で研究が行われているが、実用的な耐性克服法にまで至った研究はほとんどない。私たちのグループは、平成15年から19年まで千葉大学で行われた21世紀COEプログラムにおける研究で、放射線耐性遺伝子を網羅的に検索し、25種類の放射線耐性遺伝子候補を同定した。これらの候補遺伝子の中で、ICAM遺伝子群は非常に多くの放射線耐性腫瘍において発現が高いことを多くの臨床材料で明らかにしてきた。

私たちは同様に、現在までの研究で、口腔癌特異的microRNAとしてmiR-125bを同定した。さらに、このmiR-125bがICAM2遺伝子の発現を制御していることも突き止めた。そこで、今回、ICAM2遺伝子の発現を抑制するmiR-125bを高発現させることにより放射線耐性を克服することを考案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線耐性腫瘍の①放射線に耐性を克服するとともに、②低線量で十分な殺腫瘍効果が得られる強化療法を開発し、さらに、③広範囲照射や繰り返し照射が可能となる新しい放射線治療法に道を開くことを目的とした、ブレイクスルーを狙った研究である。

3. 研究の方法

①miR-125b 発現解析

口腔扁平上皮癌由来細胞株と口腔癌臨床検体におけるmiR-125bの発現レベルをreal time RT-PCR法で明らかにする。その結果をもとに機能解析に適した細胞株を選択する。また、miR-125bの臨床的意義を考察する。

②miR-125b 強発現細胞作製

miR-125bを口腔扁平上皮癌由来細胞株に遺伝子導入させて発現亢進させ、miR-125b強発現細胞を作製する。

③ICAM2 遺伝子発現解析

miR-125b強発現細胞におけるICAM2遺伝子の発現状態の変化をreal time RT-PCR法で確認する。

④放射線感受性解析

miR-125b強発現細胞にX線を段階的に増やして照射し、miR-125bの発現亢進によるX線感受性の変化を明らかにする。

⑤in vivoでの放射線感受性の確認

ヌードマウスに口腔癌細胞を移植して腫瘍を生着させ、X線照射による腫瘍の縮小を調べた。

4. 研究成果

【miR-125b 発現解析】

口腔扁平上皮癌由来細胞株におけるmiR-125bの発現は解析した全9種類の細胞株で正常口腔粘膜上皮と比較して著明な発現低下を認めた。(図1)

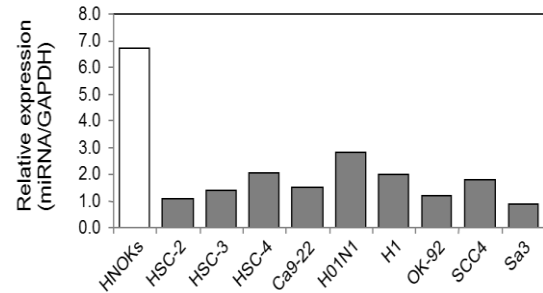


図1. 口腔癌細胞におけるmiR-125bの発現解析

臨床検体におけるmiR-125bの発現は50症例のうち43症例(86%)で正常組織と比較して腫瘍において低発現を示した。(図2)

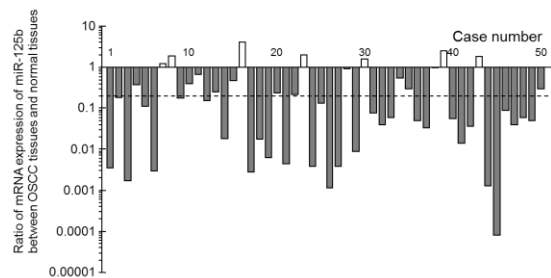


図2. 口腔癌臨床検体におけるmiR-125bの発現

正常組織と腫瘍部におけるmiR-125bの発現量の比較では、有意に腫瘍部でmiR-125bの発現減弱が認められた(P=0.0423)。(図3)

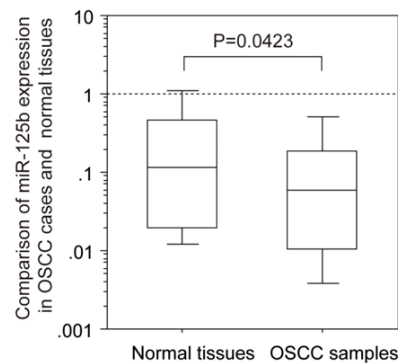


図3. 正常組織と癌部とのmiR-125b発現量の比較

【miR-125b 強発現細胞作製】

miR-125b を口腔癌細胞株 HSC-2 および HSC-3 に遺伝子導入して高発現細胞株を作製した。miR-125b の発現量を real time RT-PCR 法で確認し、親株と比較して著しく発現が亢進していることを確認した。(図 4)

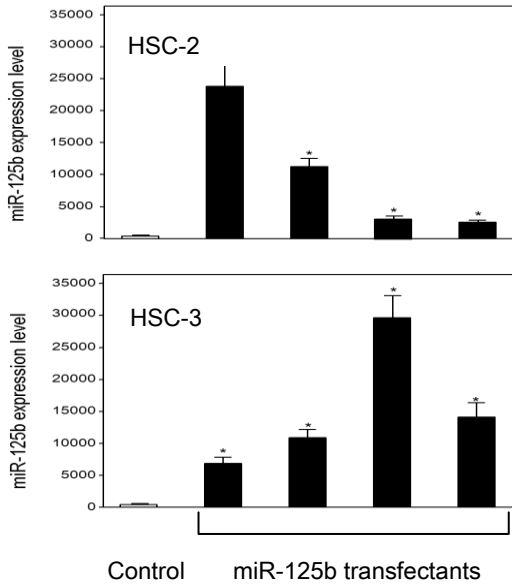


図 4. miR-125b 遺伝子導入細胞における発現量の確認

【ICAM2 遺伝子発現解析】

miR-125b と ICAM2 遺伝子との関連を調べるために作製した miR-125b 強発現細胞における ICAM2 遺伝子の発現量を real time RT-PCR 法にて解析した。miR-125b 強発現細胞においては有意に ICAM2 遺伝子の発現減弱がみとめられた。(図 5)

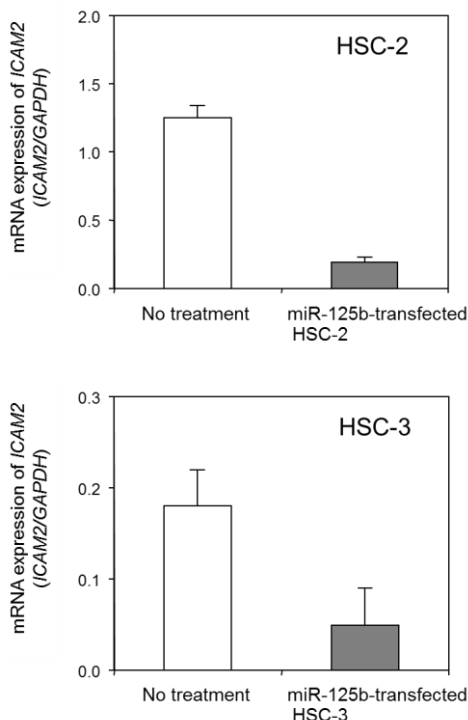


図 5. miR-125b 強発現細胞における ICAM2 発現量の確認

【放射線感受性解析】

miR-125b 遺伝子導入細胞 (miR-125b 高発現、ICAM2 遺伝子発現減弱) に X 線照射し、放射線感受性への影響を調べた。miR-125b の発現亢進によって ICAM2 遺伝子発現減弱が惹起され、放射線感受性が増強された。(図 6)

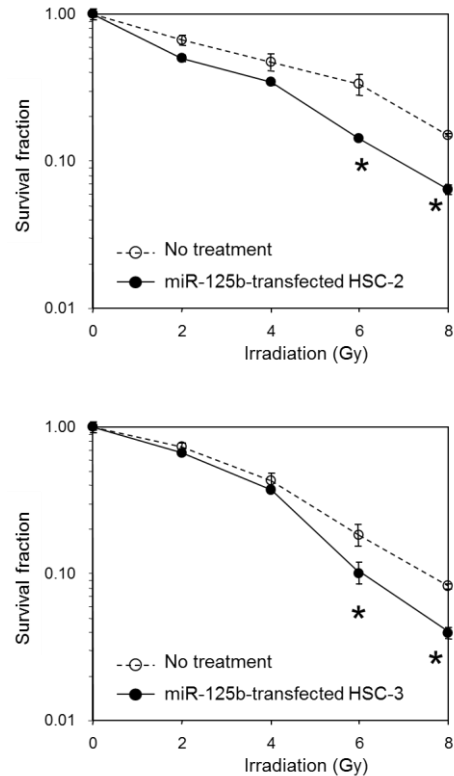


図 6. miR-125b 強発現細胞における放射線感受性

【in vivo での放射線感受性の確認】

口腔癌細胞をヌードマウスへ移植し、生着した腫瘍に X 線 8Gy 照射して放射線感受性を調べた。miR-125b 強発現細胞は放射線感受性が増強された。(図 7)

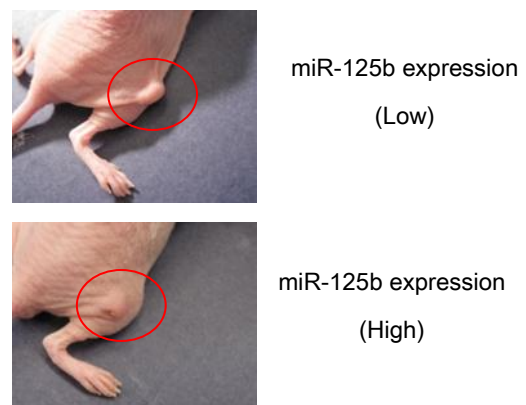


図 7. ヌードマウス移植実験

以上の結果から、miR-125b 投与による新規 X 線耐性克服治療法の基礎を確立することができた。

5. 主な発表論文等
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹沢 秀樹 (TANZAWA HIDEKI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：22659364

(2) 研究分担者

小河原 克訓 (OGAWARA KATSUNORI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20372360