

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659947

研究課題名（和文） 口腔癌における分泌型microRNAの発現と機能

研究課題名（英文） Expression and function of secreted microRNAs in oral cancer

研究代表者

浜川 裕之（Hamakawa Hiroyuki）

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20127905

研究成果の概要（和文）：

本研究では口腔癌患者の血液および唾液に特異的に存在する microRNA (miRNA) の同定を試みた。口腔癌患者血清に共通して存在量が増加する miRNA を 17 種類、存在が検出できなくなる miRNA を 15 種類同定した。その中でも、hsa-miR-181b は口腔癌患者血清のみならず唾液においても特異的にその存在量が著明に増加していた。これら miRNA は口腔癌の診断に応用できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we attempted to explore specific microRNAs (miRNAs) in serum and saliva derived from patients with oral cancer. Specifically 17 increased miRNAs and 15 undetectable miRNAs in serum from oral cancer patients were commonly identified. Among these miRNAs, hsa-miR-181b was markedly elevated in not only serum but also saliva from oral cancer patients. These miRNAs may be useful for detection of oral cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

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：口腔癌、microRNA、エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

血清中の microRNA (miRNA) の発見により、種々の悪性腫瘍においてそのバイオマーカーとしての有用性が検証されている。実際に、舌癌患者の血漿中では miR-184 の存在量が増加しており、腫瘍切除後にはその存在量が減少することが報告されている (Clin Cancer Res 14:2588-2592, 2008)。われわれも健常者および口腔癌患者血清中に miRNA が存在し、その網羅的発現解析が可能であることを確認した。また、miRNA は血清あるいは血漿以外の様々な体液中にも存在するこ

とが明らかにされている。Michael らは、ヒト唾液からエクソソームを抽出し、その中に miRNA が存在することを示した (Oral Dis 16:34-38, 2010)。さらに、Park らは miR-125a、miR-200a が口腔癌患者において健常人の唾液中の発現よりも低いことを明らかにした (Clin Cancer Res 15:5473-5477, 2009)。以上の所見は、口腔癌患者の血液および唾液中に特有の分泌型 miRNA が存在していることを示唆した。一方、最近の研究から癌細胞と周辺の正常細胞間のエクソソームによるコミュニケーション

の重要性が示唆されている。Stogらは、血清中のエクソソームから抽出された RNA を用いて神経膠芽腫における EGFRvIII の発現と miR-21 の発現上昇を観察した (Nat Cell Biol 10:1470-1476, 2008)。すなわち、血清エクソソーム中の RNA は神経膠芽腫の悪性度を高めたのである。しかしながら、口腔癌におけるエクソソーム中 miRNA の機能は不明である。

2. 研究の目的

本研究では口腔癌患者由来の体液中に存在する分泌型 miRNA のプロファイルを明らかにした上で、それら miRNA のヒト正常口腔粘膜上皮細胞および口腔癌細胞の増殖能に及ぼす影響を検討する。口腔癌における分泌型 miRNA の発現様式や機能を解明することにより、口腔癌に対する新規の診断法や治療戦略を見出す。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌特有の分泌型 miRNA の同定

癌の既往のない健康な男女および口腔癌患者より同意を得た上で血清および唾液を採取し、分泌型 miRNA を抽出する。なお、分泌型 miRNA はキアゲン社製の miRNeasy Mini kit を用いて抽出する。それぞれの検体より抽出された分泌型 miRNA を用いてマイクロアレイおよび次世代シーケンサーによる網羅的発現解析を行う。健常者からは全く検出されず、口腔癌患者にのみ検出される分泌型 miRNA を同定する。同時に、ヒト miRNA knockdown および overexpression library をヒト口腔癌細胞に導入し、その細胞増殖活性を評価することにより、口腔癌の増殖を促進する癌遺伝子様 miRNA (OncomiR) と口腔癌の増殖を抑制する癌抑制型 miRNA (TS-miR) を同定する。ヒト口腔癌細胞の増殖に参与する miRNA を探索する。

(2) 正常口腔粘膜上皮細胞および口腔癌細胞により分泌されるエクソソームの機能解析

口腔癌手術標本の正常粘膜部と腫瘍部組織の一部を採取し、細切したのち細胞分解酵素で 2 時間処理する。遠心にて細胞を回収し、牛胎児血清を含む培養液にて培養皿に播種し、一晚静置する。細胞の接着を確認したのちに、培養液を無血清培地に交換し培養を開始する。これで得られた正常口腔粘膜上皮細胞と口腔癌細胞の培養上清を回収し、ExoQuick にてそれぞれの細胞が分泌するエクソソームを抽出する。正常細胞由来のエクソソームで口腔癌細胞を、癌細胞由来のエクソソームで正常細胞を 72 時間処理し、エクソソームのそれぞれの細胞の増殖に及ぼす影響を WST-8 assay にて評価する。

4. 研究成果

(1) 口腔癌特有の分泌型 miRNA の同定

われわれは、口腔癌患者血清 (10 検体) と非担癌患者血清 (10 検体) の miRNA マイクロアレイ解析により、口腔癌患者血清に共通して存在量が増加する miRNA を 17 種類、存在が検出できなくなる miRNA を 15 種類同定した。その中でも、hsa-miR-181b は口腔癌患者血清のみならず唾液においても特異的にその存在量が著明に増加していた。hsa-miR-181b は白板症から口腔癌への進行に参与していることが報告されている (Cervigne NK, et al. Hum Mol Genet 18:4818-4829, 2009) ことから唾液中の miRNA が白板症から口腔癌への進行を促す可能性を示唆している。次に、ヒト 918 種類に対する miRNA knockdown library を用いた miRNA の網羅的機能阻害解析では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞および唾液腺癌細胞において 14 種類の OncomiR を同定した (特願 2010-254021)。その中でも、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-133a/b、hsa-miR-346 に対する機能阻害核酸すなわちアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞および唾液腺癌細胞のみならず、ヒト膀胱癌細胞、ヒト胆管癌細胞、ヒト肺癌細胞、ヒト前立腺癌細胞に対しても著明な増殖抑制効果を示した。さらに、1,000 種類のヒト合成 miRNA library を用いた網羅的過剰発現解析では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞および唾液腺癌細胞において 17 種類の TS-miR を同定した (特願 2011-113348)。特に、合成 hsa-miR-629*、hsa-miR-1289 の過剰発現は両細胞の増殖を著明に抑制した。以上の結果は、miRNA が口腔癌の診断や治療に応用できる可能性を示唆している。

(2) 正常口腔粘膜上皮細胞および口腔癌細胞により分泌されるエクソソームの機能解析

同一口腔癌患者由来の正常口腔粘膜上皮初代培養細胞と口腔癌初代培養細胞それぞれの培養上清よりエクソソームを抽出し、正常細胞由来のエクソソームで口腔癌細胞を、癌細胞由来のエクソソームで正常細胞を 72 時間処理したところ、それぞれのエクソソームは各細胞の増殖に全く影響を及ぼさなかった。エクソソームの精製度や濃度など処理条件の詳細な検討が必要である。

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 7 件)

1. Tanaka H, Nakashiro K, Iwamoto K, Tokuzen N, Fujita Y, Shirakawa R, Oka R, Goda H, Hamakawa H. Targeting Aurora

- kinase A suppresses the growth of human oral squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. Oral Oncol, in press, 2013, 査読有
2. Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Sato M, Fujita T, Kawakami Y, Hamakawa H. Prognostic impact of expression of bcl-2 and bax genes in circulating immune cells derived from patients with head and neck carcinoma. Neoplasia 15(3):305-14, 2013, 査読有
 3. Goda H, Nakashiro K, Oka R, Tanaka H, Wakisaka H, Hato N, Hyodo M, Hamakawa H. One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol 48(10):958-63, 2012, 査読有
 4. Mayorca-Guilliani AE, Yano H, Nakashiro K, Hamakawa H, Tanaka J. Premetastatic vasculogenesis in oral squamous cell carcinoma xenograft-draining lymph nodes. Oral Oncol 48(8):663-70, 2012, 査読有
 5. Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Yamashita N, Kawakami Y, Hamakawa H. Growth inhibition and apoptosis by an active component of OK-432, a streptococcal agent, via Toll-like receptor 4 in human head and neck cancer cell lines. Oral Oncol 48(8):678-85, 2012, 査読有
 6. Nishikawa Y, Miyazaki T, Nakashiro K, Yamagata H, Isokane M, Goda H, Tanaka H, Oka R, Hamakawa H. Human FAT1 cadherin controls cell migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the localization of β -catenin. Oncol Rep 26(3):587-92, 2011, 査読有
 7. Zhang T, Hamada K, Hyodo M, Itoh H, Tani K, Goda H, Nakashiro K, Hamakawa H. Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with IAI. 3B promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. Oncol Rep 25(3):795-802, 2011 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 岩本和樹、中城公一、田中宏史、岡 亮太、浜川裕之：ヒト口腔癌細胞における microRNA-629* の増殖抑制効果、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日、札幌
2. 岩本和樹、中城公一、田中宏史、徳善紀彦、岡 亮太、浜川裕之：ヒト口腔癌細胞

- 胞における microRNA-629 の機能解析、第 4 回日本 RNAi 研究会、2012 年 8 月 30 日-9 月 1 日、広島
3. 田中宏史、中城公一、浜川裕之：MicroRNA-361-p に対する LNA アンチセンスオリゴヌクレオチドの機能阻害効果の検討、第 4 回日本 RNAi 研究会、2012 年 8 月 30 日-9 月 1 日、広島
 4. 田中宏史、中城公一、岡亮太、浜川裕之：ヒト口腔癌細胞における癌遺伝子様 microRNA の同定、第 10 回中国四国口腔癌研究会、2011 年 11 月 25 日、松山
 5. Tanaka H, Nakashiro K, Oka R, Nishikawa Y, Goda H, Hamakawa H: MicroRNA-361-3p regulates the expression of OSR2 and functions as oncogenic microRNA in human oral cancer cells. 第 70 回日本癌学会、2011 年 10 月 3-5 日、名古屋
 6. 田中宏史、中城公一、岡亮太、浜川裕之：ヒト口腔癌細胞における癌遺伝子様 microRNA の探索、第 3 回日本 RNAi 研究会、2011 年 8 月 26 日、広島
 7. Tanaka H, Nakashiro K, Oka R, Nishikawa Y, Hamakawa H: MicroRNA-361-3p functions as an oncogenic microRNA in human oral cancer cells. 102nd American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 2-6, 2011, Orlando, FL

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：マイクロ RNA 又はその発現系を含む組成物

発明者：中城公一、浜川裕之、田中宏史

権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特許

番号：特願 2011-113348

出願年月日：2011 年 5 月 20 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 3 件)

1. 名称：アンドロゲン受容体遺伝子に特異的な siRNA

発明者：中城公一、浜川裕之

権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特許

番号：第 4961549 号

取得年月日：2012 年 4 月 6 日

国内外の別：国内

2. 名称：頭頸部癌の腫瘍マーカー

発明者：中城公一、浜川裕之

権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特許

番号：第 4967112 号

取得年月日：2012 年 4 月 13 日

国内外の別：国内

3. 名称：ADAT1 遺伝子に特異的な siRNA
発明者：中城公一、浜川裕之
権利者：国立大学法人愛媛大学
種類：特許
番号：第 5103621 号
取得年月日：2012 年 10 月 12 日
国内外の別：国内

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜川 裕之 (Hamakawa Hiroyuki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20127905

(2) 研究分担者

中城 公一 (Nakashiro Koichi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90314880