

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593039

研究課題名(和文) マイクロRNAの発現解析を応用した口腔癌転移予測マーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of the oral cancer metastasis prediction marker with expression of miRNA analysis

研究代表者

吉濱 泰斗 (Yoshihama, Yasuto)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：90335620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔癌の転移予測マーカーとして、マイクロRNAを正常口腔粘膜組織と口腔癌組織で網羅的に比較解析した。その結果、12のマイクロRNAで発現の亢進をみとめ、11のマイクロRNAで発現の低下を認めた。

発現の亢進および低下が認められたマイクロRNAに関して口腔癌の原発巣と転移巣で比較検討したところ数種類のマイクロRNAで発現の亢進や低下の可能性を認めものの有意な変化は認められなかった。これらのマイクロRNAを口腔癌細胞に導入したが、細胞増殖への影響は認められたもの、転移能への影響は認められなかった。

研究成果の概要(英文)： In this study, we regarded miRNA as a metastasis prediction factor of oral cancer and cyclopaedically analyze was done in normal oral mucosa, oral cancer and metastasis tissues. As a result of microarray analysis, the expression of twelve miRNAs were increased and eleven miRNAs were decrease. While only non-significant differential expression of these miRNAs between oral cancer tissue and metastatic tissue was recognized, a tendency differential expression was recognizd.

Oral cancer cells proliferation were accelerated by These miRNAs introduce into the cells but the cells metastatic potential were not accelerated.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 miRNA microarray analysis 転移予測マーカー

1. 研究開始当初の背景

miRNAは1つ以上のmRNA配列の一部と相補的な関係にあり、主な機能として翻訳抑制、mRNA分解、脱アデニル化など様々な方法による遺伝子発現の制御を行うことが知られており、ゲノム情報発現系の新たな調節・制御分子として注目され、ヒトの全ての遺伝子の1/3以上がmiRNA分子に制御されていることを示唆する報告もされている。

これまでにmiRNA発現は部位や時期特異的であり、組織特異的な発現様式を示すことも報告されている。特に、正常組織とがんなどの疾患組織ではmiRNA発現様式が大きく異なり、新たな治療標的となりうる可能性や、診断や予後マーカーへの応用が期待されている。既に、白血病では血漿中におけるmiR-92a/miR-638発現レベル比がこの疾患のマーカーとなることが報告されている。また、卵巣がんにおける予後マーカーとなるという興味深い報告もある。

口腔癌においては特異的で臨床応用可能な腫瘍マーカーが少なく、特異性も低いことから、あらたな腫瘍マーカーが望まれている。

これらのことから口腔癌においてmiRNAの機能解析を行い、発現異常を理解することは、口腔癌の発癌、悪性化のメカニズムの理解、さらには新たな治療標的の検索につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

申請者らはこれまで、口腔正常粘膜上皮、口腔癌組織におけるmiRNAの発現プロファイルを階層的クラスターにて解析した際、口腔正常粘膜上皮と口腔癌組織は異なるクラスターに分類され、口腔癌においてもmiRNAの発現異常が生じていることを明らかにした。さらに、正常組織と比較してmiRNAの発現変化が大きい12のmiRNAに着目し、その発現と臨床病理学的情報との相関を図ると、選出した12のmiRNAの発現様相は頸部リンパ節転移との相関が強く認められ

た。このことから、抽出した12のmiRNAをより詳細に解析する事で、候補miRNAの生物学的特質の解明や口腔癌の浸潤・転移能や治療抵抗性に関連する有効な分子標的を同定することができ、さらに頸部リンパ節転移を予測し得るような予後マーカーを抽出できるのではないかと考えた。

そこで本研究では、頸部リンパ節転移に関連する12のmiRNAに着目し、口腔癌におけるその分子生物学的機能を明らかにする。また、腫瘍原発巣、転移巣とでの候補miRNAの比較を行うことで口腔癌の転移予測マーカーとなり得るかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

申請者らは口腔癌において、初めて網羅的にmiRNAの発現解析を行い、口腔癌患者において高頻度に発現異常を呈するmiRNAを同定した。さらにそれらの候補遺伝子のmiRNAが頸部リンパ節転移と強く関連することを明らかにした。よって本研究では、標的miRNAの生物学的機能の解析とmiRNAの転移予測マーカーとしての有用性の検索および標的miRNAのターゲット遺伝子の検索を行うこととし、口腔癌において未だ明らかとなっていないmiRNAの発現解析から、あらたな治療標的、臨床応用可能な診断マーカーの確立を行う事を目的として以下の方法を計画した。

1) 標的miRNAのバリデーション

実験材料として口腔癌細胞株(HSC2, HSC3, HSC4, SAS, Ca9-22, SCC111)、口腔癌組織(n=25)を材料として、各材料よりRNAを抽出し、網羅的miRNA解析より抽出した発現異常miRNAの発現量の検証を行う。

2) 標的miRNAの機能解析

口腔扁平上皮癌細胞に網羅的miRNA解析より抽出した12のmiRNAを口腔扁平上皮癌細胞へトランスフェクションし、細胞増殖

や抗癌剤 (5-FU、CDDP、タキソテール) に対する影響や転移能を検討する。

3) 腫瘍原発巣と転移巣における候補miRNAの同定

網羅的解析により抽出した12のmiRNAの腫瘍原発巣、転移巣 (n=25) での発現の相関を解析する。腫瘍原発巣、転移巣よりRNAを抽出し、候補miRNAの定量を行う。

4) 唾液・血清からの候補miRNAの同定

候補miRNAが口腔癌の転移予測マーカーとなり得るかを検証するために、唾液・血清 (n=25) からの候補miRNAの同定を試みる。唾液、血清は手術前に口腔癌患者より採取し、採取後 RNAを抽出する。抽出されたRNAよりmiRNAを定量し、腫瘍原発巣、転移巣の発現量と相関させ、腫瘍マーカー、転移予測マーカーとなり得るかを検証する。

5) 候補miRNAの標的遺伝子の検索

口腔扁平上皮癌細胞株に網羅的miRNA解析より抽出した12のmiRNAに対する miRNA Precursor Molecule (Ambion社) を用いて口腔扁平上皮癌細胞にトランスフェクションを行う。

トランスフェクションした口腔扁平上皮癌細胞よりRNAを抽出する。そこからcDNAを合成し、Hi遺伝子発現を解析する。

6) 標的候補遺伝子の同定

候補miRNAを遺伝子導入することによって、発現変化をうける標的候補遺伝子を同定する。

7) 標的候補遺伝子のバリデーション

候補miRNAをトランスフェクションすることによって、発現変化をうける標的候補遺伝子の発現の定量を行う。

4. 研究成果

1) 29個の口腔癌組織におけるmiRNAの発現量と7個の口腔正常粘膜組織におけるmiRNAの発現量を網羅的に解析し、全ての症例でデータの得られた177個のmiRNAを比較検討したところ、MiR-31*, miR-31, miR-135b, miR-193a-5p, miR-103, miR-224, miR-93, miR-200c, miR-183, miR203, miR-21, miR-223 が口腔正常粘膜組織と比較して、癌組織において4倍以上発現亢進しており、また、MiR-133a, miR-376c, miR-411, miR-30a-3p, miR-489, miR-139-5p, miR-483-5p, miR-30e-3p, miR-409-3p, let-7c, miR-486-5p は発現低下していた。さらに、転移の認められる口腔癌組織において、転移の認められない口腔組織と比較した際、miR-489, miR-483-5p, and miR-1291 が2倍以上発現低下していた。

2) 口腔癌組織において発現亢進の認められたmiR-223について、口腔癌細胞株 (SAS, SCC-111, CA 9-22, HSC-2, 3, 4) に対する細胞増殖への影響を検討したところ、miR-223 inhibitor をトランスフェクションすることにより、SAS, SCC-111, CA 9-22, HSC-2, SC-3 において細胞増殖の抑制を確認することが出来た。また HacaT 細胞株 (ヒト皮膚角化細胞株) においては細胞増殖抑制を認めないことが確認できた。

3) 癌組織において発現の増加を認めた12のmiRNA (MiR-31*, miR-31, miR-135b, miR-193a-5p, miR-103, miR-224, miR-93, miR-200c, miR-183, miR203, miR-21, miR-223) を口腔癌原発巣と転移巣で比較したところ数種類で転移巣における発現量の増加が認められた。また、口腔癌組織と正常口腔粘膜組織の網羅的解析により癌組織において発現の低下が認められたmiRNA (MiR-133a, miR-376c, miR-411, miR-30a-3p, miR-489, miR-139-5p, miR-483-5p, miR-30e-3p, miR-409-3p,

let-7c, miR-486-5p)も原発巣と転移巣の比較でいくつかのmiRNAで発現が低下している可能性があると思われた。

4)唾液と血清からの候補miRNAの同定においてはmiRNAの解析を行ったが有意な発現量の変化を認めることができなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉濱 泰斗 (YOSHIHAMA Yasuto)

昭和大学 歯学部 講師

研究者番号: 90335620

(2)研究分担者

近藤 誠二 (KONDO Seiji)

昭和大学 歯学部 准教授

研究者番号: 10432634

椋代 義樹 (MUKUDAI Yoshiki)

昭和大学 歯学部 助教

研究者番号: 50325099

葭葉清香 (YOSHIBA Sayaka)

昭和大学 歯学部 助教

研究者番号: 60555358

(3)連携研究者

()

研究者番号: