

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293407

研究課題名(和文) 口腔癌におけるlong non coding RNAの役割と臨床的意義の検討

研究課題名(英文) Studies of the clinical significance and the role of long non coding RNA in oral cancer.

研究代表者

椎葉 正史 (SHIIBA, MASASHI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20301096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：大型のlong non coding RNA(lncRNA)と癌との関連は未だ解析が進んでおらず詳細は不明である。本研究では口腔癌におけるlncRNAの役割を検討するため細胞株によるmicroarray解析(Agilent)から2つのlncRNA(UCA1とLINC00256A)を同定した。2つの口腔癌由来細胞株にカスタムshRNA(Sigma Aldrich)を導入し機能解析を行ったところ遊走能と浸潤能が有意に低下した。さらに導入した細胞株のmicroarray解析を行いターゲット遺伝子候補を同定した。本結果は、lncRNAおよび口腔癌の転移抑制治療にとって非常に有益なデータと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer-related microRNA(miRNA) has been known in many carcinomas and the possibility of cancer treatment using miRNA has been reported. However, the role of long non coding RNA(lncRNA) in cancer progression is still unknown. The current study, we identified two lncRNA (UCA1 and LINC00256A) by microarray analysis, in order to investigate the role of lncRNA. We made transformed cells by custom shRNA of UCA1 and/or LINC00256A and performed functional analysis. The cells transformed by shUCA1 and/or shLINC00256A showed significantly ($P<0.05$) decreased invasiveness and migration activities compared with the shMock cells. In addition, we performed microarray analysis using transformed cells and identified target genes. These results indicated that lncRNA may affect tumoral metastasis in OSCCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：long non-coding RNA 口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

多くの種類の癌において、関連する miRNA の報告が多くある中、そのターゲット遺伝子の同定や、ターゲット遺伝子を通じての創薬や治療法の開発は比較的少なく、現在、世界中が臨床応用に向かってしのぎを削っている状況であるが、私達は non coding RNA のうち短い miRNA に関しては、すでに、miR-125b→ICAM カスケードにより口腔癌の放射線感受性・耐性が制御されていることを発見・報告し、miRNA による放射線治療増強法を開発中である。一方、non coding RNA のうち、長い long non coding RNA (lncRNA) については、世界的に従来はあまり解析が行われてこなかった。やっと最近、癌と lncRNA の関係も、胃癌、肺癌、肝細胞癌等において、H19, HOTAIR, MALAT1 などの lncRNA が特異的に関連しており、浸潤、転移、増殖などに影響を与えていることが、わずかではあるが報告されて始めた。しかし、口腔癌に関してはまだ信頼できる報告は全くない。我々は miRNA だけでなく、lncRNA による上皮間葉系相互作用への調節機構も転移や浸潤機能に関与すると考えて、本研究に着手した。

2. 研究の目的

申請者らはヒトの遺伝子情報 (DNA) の翻訳調整機能を果たしているタンパクをコードしていない non coding RNA (ncRNA) のうち、口腔癌に関して報告がない long non coding RNA (lncRNA) が、上皮間葉系相互作用 (epithelial-mesenchymal interaction) などを通じて、癌の浸潤、転移、増殖にも大きな影響を与えていることを明らかにし、口腔癌の癌化、進展、浸潤などにおける lncRNA の役割・機能を解明する。さらに、新規治療法の開発や医薬品開発技術につながる基本的なデータの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) lncRNA 搭載 array 解析

口腔癌由来細胞 4 種類と正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞を用いて RNA の lncRNA スクリーニングを行い、すべての細胞株において共通に発現増強している lncRNA と、共通に発現減弱している lncRNA を検索する。

(2) lncRNA data base と文献検索

胃癌、肺癌、肝細胞癌など口腔癌以外の癌種で特異的に関連が指摘されている lncRNA を検索・リストアップする。さらに、上皮間葉系相互作用 (epithelial-mesenchymal interaction) にも大きな影響を与えていることが報告されている lncRNA を検索・リストアップする。

(3) real time PCR

1) 2) でリストアップされた候補遺伝子の

プライマーを作成する。10 種類程度の口腔癌由来細胞株と多数の口腔癌サンプルから RNA を抽出し、1) 2) でリストアップされた lncRNA の発現量を調べ、口腔癌特異的に発現増強、あるいは減弱している lncRNA を明らかにする。

(4) 臨床的機能解析

臨床的諸指標と比較して、臨床的に意味のある lncRNA を検索同定する。

(5) 上皮分化における機能解析

正常扁平上皮細胞の解剖学的分化層別に RNA を採取して用い、上皮の分化程度との lncRNA 発現の相関を調べる。

(6) 癌間質細胞における役割解析

癌組織において、癌細胞間に存在する間質細胞からの RNA を抽出し、癌と癌間質細胞とにおける lncRNA の発現状態の相関関係を調べる。

(7) 遺伝子的機能解析

候補 lncRNA の shRNA 導入による発現抑制 (増殖試験、invasion assay, scratching assay 等を含む) により遺伝子学的機能解析を行う。

(8) ターゲット遺伝子の検索・同定

以上の結果により lncRNA のターゲット候補遺伝子を絞り込み、各細胞株や臨床サンプルでのターゲット遺伝子の発現状態との相関を micro array, RT-PCR を用いて調べるとともに、lncRNA の shRNA 導入による発現抑制や lncRNA 導入による発現増強実験時の細胞株における遺伝子発現状態の変化も micro array, RT-PCR を用いて調べることにより、ターゲット遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) 口腔癌由来細胞株における lncRNA 搭載 Microarray 解析

口腔癌由来細胞 HSC2, HSC3, HSC4, Sa3 と正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞 (HNOKs) の total RNA を採取し Agilent® 社製 SurePrint G3® Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray にて発現解析を行った。その結果をトミーデジタルバイオロジー社のインジェスティブ パスウェイ アナリシス (IPA) を用い解析した。以上の結果、図 1 に示すようにすべての細胞株で共通して 2 倍以上の亢進を示した 25 遺伝子、0.5 倍以下の低下を示した 26 遺伝子を同定した。

腫瘍との関連が報告されているlncRNA

Gene Symbol	Gene Name	Chromosome	Transcript Variant	Expression	Associated Cancer
LINC00440	long intergenic non-protein coding RNA 440	1	1	↑	glioblastoma
LINC00448	long intergenic non-protein coding RNA 448	1	1	↑	glioblastoma
LINC00450	long intergenic non-protein coding RNA 450	1	1	↑	glioblastoma
LINC00451	long intergenic non-protein coding RNA 451	1	1	↑	glioblastoma
LINC00452	long intergenic non-protein coding RNA 452	1	1	↑	glioblastoma
LINC00453	long intergenic non-protein coding RNA 453	1	1	↑	glioblastoma
LINC00454	long intergenic non-protein coding RNA 454	1	1	↑	glioblastoma
LINC00455	long intergenic non-protein coding RNA 455	1	1	↑	glioblastoma
LINC00456	long intergenic non-protein coding RNA 456	1	1	↑	glioblastoma
LINC00457	long intergenic non-protein coding RNA 457	1	1	↑	glioblastoma
LINC00458	long intergenic non-protein coding RNA 458	1	1	↑	glioblastoma
LINC00459	long intergenic non-protein coding RNA 459	1	1	↑	glioblastoma
LINC00460	long intergenic non-protein coding RNA 460	1	1	↑	glioblastoma
LINC00461	long intergenic non-protein coding RNA 461	1	1	↑	glioblastoma
LINC00462	long intergenic non-protein coding RNA 462	1	1	↑	glioblastoma
LINC00463	long intergenic non-protein coding RNA 463	1	1	↑	glioblastoma
LINC00464	long intergenic non-protein coding RNA 464	1	1	↑	glioblastoma
LINC00465	long intergenic non-protein coding RNA 465	1	1	↑	glioblastoma
LINC00466	long intergenic non-protein coding RNA 466	1	1	↑	glioblastoma
LINC00467	long intergenic non-protein coding RNA 467	1	1	↑	glioblastoma
LINC00468	long intergenic non-protein coding RNA 468	1	1	↑	glioblastoma
LINC00469	long intergenic non-protein coding RNA 469	1	1	↑	glioblastoma
LINC00470	long intergenic non-protein coding RNA 470	1	1	↑	glioblastoma
LINC00471	long intergenic non-protein coding RNA 471	1	1	↑	glioblastoma
LINC00472	long intergenic non-protein coding RNA 472	1	1	↑	glioblastoma
LINC00473	long intergenic non-protein coding RNA 473	1	1	↑	glioblastoma
LINC00474	long intergenic non-protein coding RNA 474	1	1	↑	glioblastoma
LINC00475	long intergenic non-protein coding RNA 475	1	1	↑	glioblastoma
LINC00476	long intergenic non-protein coding RNA 476	1	1	↑	glioblastoma
LINC00477	long intergenic non-protein coding RNA 477	1	1	↑	glioblastoma
LINC00478	long intergenic non-protein coding RNA 478	1	1	↑	glioblastoma
LINC00479	long intergenic non-protein coding RNA 479	1	1	↑	glioblastoma
LINC00480	long intergenic non-protein coding RNA 480	1	1	↑	glioblastoma

**腫瘍との関連が報告されているlncRNAのうち
本arrayにおいて統計学的有意差を認めたもの**

Gene Symbol	Gene Name	Chromosome	Transcript Variant	Expression	Associated Cancer
TUG1	transmembrane protein 108-AS1	1	1	↑	glioblastoma
UCA1	urothelial cancer associated 1	1	1	↑	urothelial cancer
HOTUR	heterochromatin organization 1	1	1	↑	urothelial cancer
CRNDE	chromatin remodelling 1	1	1	↑	urothelial cancer
CDKN2B-AS1	cyclin dependent kinase 2B antisense RNA 1	12	1	↑	urothelial cancer
MEG3	maternal 3' UTR expressed gene 3	14	1	↓	urothelial cancer
IGF2-AS	insulin-like growth factor 2 antisense non-protein coding RNA 2	12	1	↓	urothelial cancer
TP73-AS1	TP73 antisense RNA 1	17	1	↓	urothelial cancer

(図1 Microarray の解析結果)

(2) lncRNA の検索と癌間質細胞における役割解析、候補 lncRNA のリストアップ
Data base より腫瘍との関連性が報告されている lncRNA をリストアップし図 2 に示すように Microarray 解析結果と照合し確定した。

4cell 線全てで2倍以上の高発現を示したlncRNA(25gene)

Gene Symbol	Gene Name
LINC00440	long intergenic non-protein coding RNA 440
LINC00448	long intergenic non-protein coding RNA 448
LINC00450	long intergenic non-protein coding RNA 450
LINC00451	long intergenic non-protein coding RNA 451
LINC00452	long intergenic non-protein coding RNA 452
LINC00453	long intergenic non-protein coding RNA 453
LINC00454	long intergenic non-protein coding RNA 454
LINC00455	long intergenic non-protein coding RNA 455
LINC00456	long intergenic non-protein coding RNA 456
LINC00457	long intergenic non-protein coding RNA 457
LINC00458	long intergenic non-protein coding RNA 458
LINC00459	long intergenic non-protein coding RNA 459
LINC00460	long intergenic non-protein coding RNA 460
LINC00461	long intergenic non-protein coding RNA 461
LINC00462	long intergenic non-protein coding RNA 462
LINC00463	long intergenic non-protein coding RNA 463
LINC00464	long intergenic non-protein coding RNA 464
LINC00465	long intergenic non-protein coding RNA 465
LINC00466	long intergenic non-protein coding RNA 466
LINC00467	long intergenic non-protein coding RNA 467
LINC00468	long intergenic non-protein coding RNA 468
LINC00469	long intergenic non-protein coding RNA 469
LINC00470	long intergenic non-protein coding RNA 470
LINC00471	long intergenic non-protein coding RNA 471
LINC00472	long intergenic non-protein coding RNA 472
LINC00473	long intergenic non-protein coding RNA 473
LINC00474	long intergenic non-protein coding RNA 474
LINC00475	long intergenic non-protein coding RNA 475
LINC00476	long intergenic non-protein coding RNA 476
LINC00477	long intergenic non-protein coding RNA 477
LINC00478	long intergenic non-protein coding RNA 478
LINC00479	long intergenic non-protein coding RNA 479
LINC00480	long intergenic non-protein coding RNA 480

4cell 線全てで0.5倍以下の低発現を示したlncRNA(26gene)

Gene Symbol	Gene Name
TPF12P6	transmembrane phosphoinositide 3-phosphatase and tetra homolog 2
CEP450	chromosome 17 open reading frame 59
LINC00440	long intergenic non-protein coding RNA 440
LINC00448	long intergenic non-protein coding RNA 448
LINC00450	long intergenic non-protein coding RNA 450
LINC00451	long intergenic non-protein coding RNA 451
LINC00452	long intergenic non-protein coding RNA 452
LINC00453	long intergenic non-protein coding RNA 453
LINC00454	long intergenic non-protein coding RNA 454
LINC00455	long intergenic non-protein coding RNA 455
LINC00456	long intergenic non-protein coding RNA 456
LINC00457	long intergenic non-protein coding RNA 457
LINC00458	long intergenic non-protein coding RNA 458
LINC00459	long intergenic non-protein coding RNA 459
LINC00460	long intergenic non-protein coding RNA 460
LINC00461	long intergenic non-protein coding RNA 461
LINC00462	long intergenic non-protein coding RNA 462
LINC00463	long intergenic non-protein coding RNA 463
LINC00464	long intergenic non-protein coding RNA 464
LINC00465	long intergenic non-protein coding RNA 465
LINC00466	long intergenic non-protein coding RNA 466
LINC00467	long intergenic non-protein coding RNA 467
LINC00468	long intergenic non-protein coding RNA 468
LINC00469	long intergenic non-protein coding RNA 469
LINC00470	long intergenic non-protein coding RNA 470
LINC00471	long intergenic non-protein coding RNA 471
LINC00472	long intergenic non-protein coding RNA 472
LINC00473	long intergenic non-protein coding RNA 473
LINC00474	long intergenic non-protein coding RNA 474
LINC00475	long intergenic non-protein coding RNA 475
LINC00476	long intergenic non-protein coding RNA 476
LINC00477	long intergenic non-protein coding RNA 477
LINC00478	long intergenic non-protein coding RNA 478
LINC00479	long intergenic non-protein coding RNA 479
LINC00480	long intergenic non-protein coding RNA 480

図 2 腫瘍関連 lncRNA の検索結果)

さらに、癌間質細胞から RNA を抽出し、図 3 に示すように、lncRNA の発現状態および相関関係を解析し、候補 lncRNA を絞り込んだ。

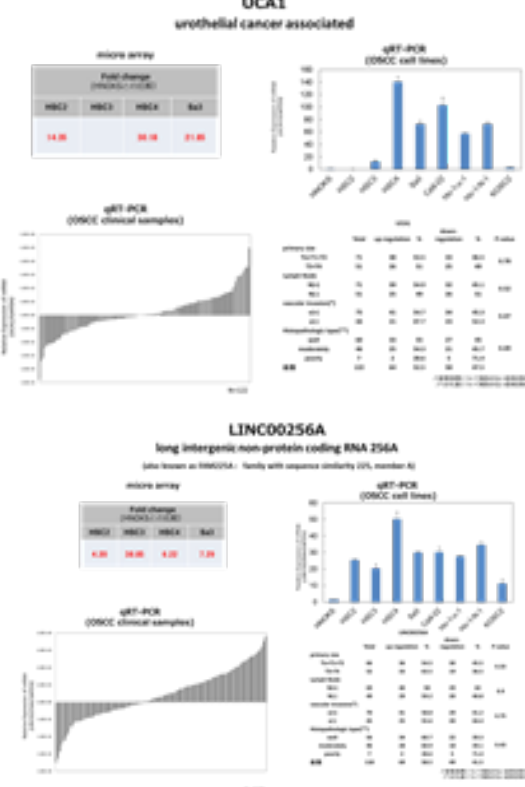
※癌間質線維芽細胞 (CAF) における発現 (CAF microarrayより)

	①CAF/NF	②CAF/NF	③CAF/NF
LINC256A ↑	1.859903	0.017903	-1.03775
UCA1 ↑	0.209461	0.025883	5.632168
CRNDE ↑	0.043355	1.393153	-0.20806
TP73-AS1 ↓	1.573317	-0.27781	2.423514
IGF2-AS ↓	1.243802	1.814062	0.27472
RPL13P5 ↑	-0.44501	-0.71257	-0.04871
ZNF542 ↑	-0.89603	0.294419	-6.05482

(log2 ratio)

(図 3 癌間質細胞における lncRNA の発現状態と候補 lncRNA)

(3) 候補 lncRNA の臨床的機能解析
候補 lncRNA を絞り込むために、9 種類の口腔癌由来細胞株と 100 例の臨床検体による real time PCR 解析結果と臨床指標との相関を解析した。その結果から、図 4 に示す UCA1, LINC00256A の 2 つの lncRNA を選定した

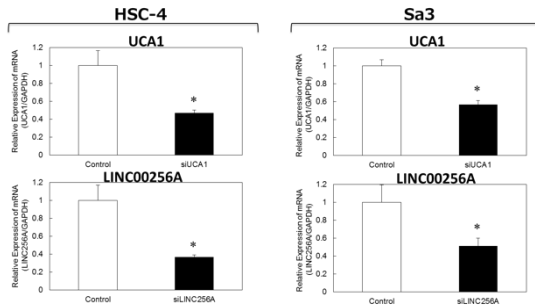


(図 4 UCA1, LINC00256A の臨床的機能解析の結果)

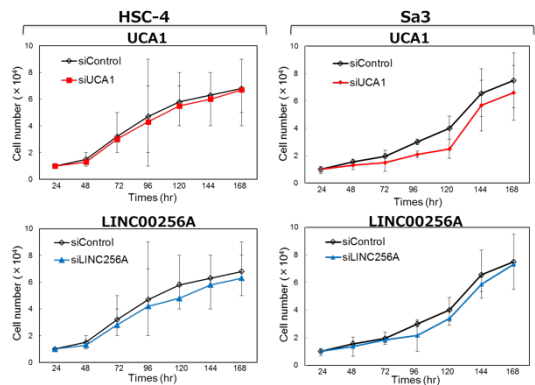
(4) 選定した lncRNA 発現抑制における遺伝子的機能解析
UCA1, LINC00256A の 2 つの lncRNA それぞれの発現を抑制するために、それぞれカスタム siRNA を作製し、microarray および qRT-PCR で使用しかつ発現変動を認めていた HSC-4, Sa3, 2 種の細胞株に siRNA の導入を行い transient transformant を作製した。図 5 に示すように、HSC-4, Sa3 それぞれにおいて

siRNA 導入による UCA1, LINC00256A の siRNA 導入による knockdown を確認した。

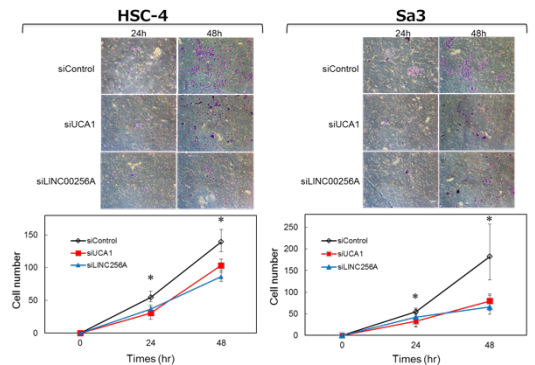
siRNA を導入した HSC-4, Sa3 の細胞株を用いて増殖能、浸潤能、遊走能試験を行った。増殖能試験ではコントロールと比較して有意な差を認めなかった (図 6)。しかし、浸潤能試験 (図 7)、遊走能試験 (図 8) では有意な機能の低下を認めた。



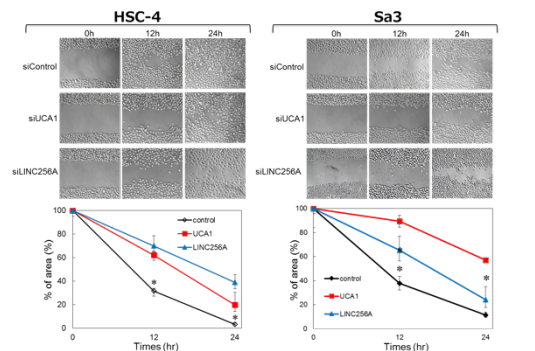
(図 5 siRNA 導入確認)



(図 6 増殖能試験: siRNA 導入細胞)



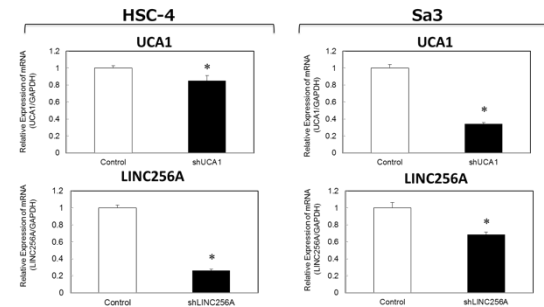
(図 7 浸潤能試験: siRNA 導入細胞)



(図 8 遊走能試験: siRNA 導入細胞)

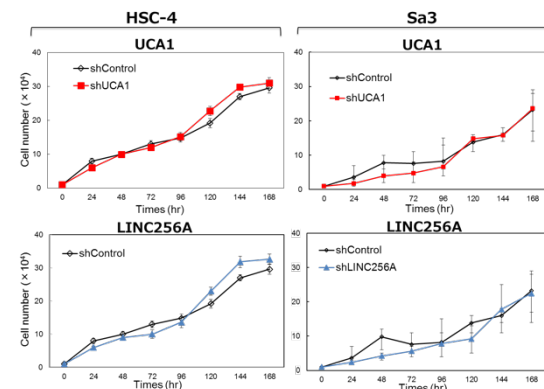
続いて、UCA1, LINC00256A それぞれのカスタム shRNA を作製し、HSC-4, Sa3 細胞株に shRNA を導入し、stable transformant を作製した。

図 9 に示すように、HSC-4, Sa3 それぞれに shRNA の導入確認を行った。

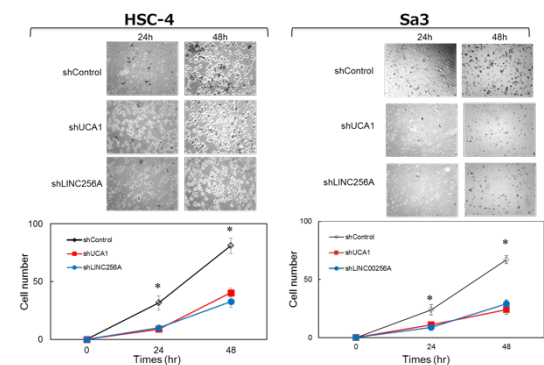


(図 9 shRNA 導入確認)

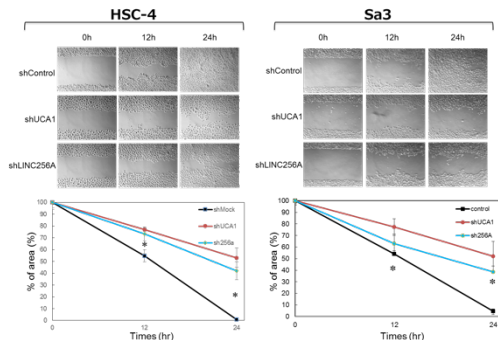
siRNA 導入細胞と同様に、増殖能、浸潤能、遊走能試験を行った。増殖能試験では、siRNA 導入細胞と同様に、コントロールと比較して有意な差を認めなかった (図 10) が、浸潤能試験 (図 11) および遊走能試験 (図 12) では有意な機能の低下を認めた。



(図 10 増殖能試験: shRNA 導入細胞)



(図 11 浸潤能試験: shRNA 導入細胞)



(図 12 浸潤能試験: shRNA 導入細胞)

(5) shRNA 導入細胞の microarray 解析によるターゲット遺伝子の検索・同定

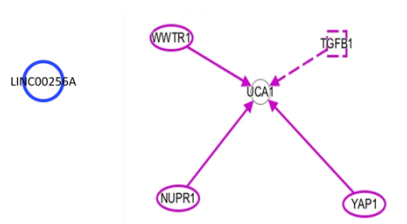
選定した UCA1, LINC00256A の siRNA および shRNA 導入細胞の遺伝子的機能解析の結果、転移・浸潤機能に関与することが判明した。転移・浸潤機構のターゲット遺伝子を検索・同定するため、shRNA 導入細胞と HNOKs の total RNA を抽出し Agilent®社製 SurePrint G3® Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray にて発現解析を行った。その結果をトミーデジタルバイオロジー社の IPA ソフトを用いてターゲット遺伝子の検索を行った。その結果、図 13 に示すように、群間比較で統計学的に有意差のあった遺伝子数はそれぞれ、約 1000 遺伝子あった。shRNA 導入細胞株各々において、発現亢進および減弱を認める遺伝子が複数存在した。

抽出方法	比較条件	Group	条件	プローブ数
Ratio > 2 And Ratio < 0.5 And Zscore > 2	Sa3 : sh256A vs shControl	1	比較群 / 対照群で up-regulated	665
		2	比較群 / 対照群で down-regulated	498
	HSC4 : sh256A vs shControl	3	比較群 / 対照群で up-regulated	513
		4	比較群 / 対照群で down-regulated	598
	Sa3 : shUCA1 vs shControl	5	比較群 / 対照群で up-regulated	363
		6	比較群 / 対照群で down-regulated	769
	HSC4 : shUCA1 vs shControl	7	比較群 / 対照群で up-regulated	354
		8	比較群 / 対照群で down-regulated	701

(図 13 統計学的に有意差のあった遺伝子)

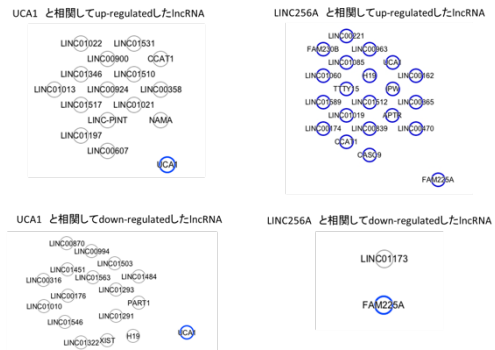
さらに Pathway 解析を行ったところ、図 14 に示すように LINC00256A は過去に報告の無い lncRNA であることが判明した。

Ingenuity Pathway Analysis



(図 14 Pathway 解析)

また、lncRNA-lncRNA 間での相関関係および Pathway 解析を行った。その結果、UCA1 および LINC00256A の発現減弱と相関して発現が亢進および減弱する lncRNA を複数同定し、それらの関係性については過去に報告が無いことを明らかにした (図 15)。



(図 15 lncRNA 間の Pathway 解析)

[まとめ]

口腔癌における lncRNA の役割を検討するため、細胞株による microarray 解析 (Agilent) による網羅的遺伝子発現解析を行った。抽出された多数の lncRNA 中から、口腔癌由来細胞株 9 種を用いた発現解析と臨床的機能解析を行い、2 つ (UCA1 と LINC00256A) の lncRNA 遺伝子を選定した。2 つの lncRNA 遺伝子のカスタム shRNA を作製・導入し機能解析を行ったところ遊走能および浸潤能が有意に低下した。さらに導入した細胞株のマイクロアレイ解析を行いターゲットとなる遺伝子の候補を同定し、また報告のない複数の遺伝子群を明らかにした。以上の結果より、lncRNA の機能を明らかにする貴重なデータであり、さらに実験を進めれば口腔癌転移に対する抑制治療の糸口になる有益なデータと考えられる。

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 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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎葉 正史 (SHIIBA MASASHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 20301096

(2)研究分担者

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

笠松 厚志 (KASAMATSU ATSUSHI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60375730