

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670844

研究課題名(和文) 口腔がんにおけるlet-7 microRNAの機能解析と臨床応用

研究課題名(英文) Functional analysis and clinical application of let-7 microRNA in oral cancer

研究代表者

武川 寛樹 (BUKAWA, HIROKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80173558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、口腔がん組織においてlet-7c microRNAとlet-7g microRNAの発現が正常組織と比較しての有意に低下していることを明らかにした。またヒト口腔がん由来細胞株(HSC3)においてlet-7c microRNAとlet-7g microRNAの発現がヒトの皮膚由来正常細胞株と比較しての有意に低下していることも明らかにした。さらに、この2つのmicroRNAの発現量が口腔がんの頸部リンパ節転移と相関があることを明らかにした。そこでHSC3に発現が低下しているlet-7cおよびlet-7gのアゴニストを加えたところ、がん細胞の増殖能力を抑制する可能性がわかってきた。

研究成果の概要(英文)：We revealed that let-7c microRNA and the let-7g microRNA expression is significantly reduced as compared to normal tissue in the oral cancer tissue. Furthermore we also revealed that the expression of let-7c and let-7g is significantly reduced as compared to normal skin cell lines in cell line (HSC3) derived human oral carcinoma. In addition, we made it clear that the expression level of these two microRNA is correlated with cervical lymph node metastasis of oral cancer. Finally we have found that the addition of an agonist of the let-7c and let-7g to HSC3 may inhibit cancer cell growth ability.

研究分野：口腔がんにおけるmicroRNAを対象とした腫瘍生物学

キーワード：microRNA let-7 口腔がん 腫瘍生物学

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ノンコーディング RNA が、以前考えられたよりもはるかに重要な役割を有すると考えられるようになった。

ノンコーディング RNA は、翻訳過程で機能する転移 RNA (tRNA) とリボソーム RNA (rRNA)、1980 年代初期に発見された低分子量核内 RNA、1990 年代後期に発見された microRNA などがあった。

これらノンコーディング RNA は、基本的な代謝から個体発生や細胞分化までの実に様々な生命現象に関与することが徐々に明らかになってきていた。

(2) microRNA の機能の異常がヒトの疾患、特に癌の発生にかかわることが明らかになってきていた。

microRNA は約 22 ヌクレオチドの RNA で標的遺伝子の mRNA に対する相補的配列を有し、その遺伝子の発現を抑制する機能を持つ。

癌化にかかわる microRNA は過剰発現して癌遺伝子として働く microRNA と、欠失することが癌化の要因となる癌抑制遺伝子として働く microRNA に分類される。

過剰発現した microRNA ではその発現を抑え、不足している micro RNA は補うことで癌治療が可能となることが予想された。

microRNA インヒビターとしてアンチセンスオリゴヌクレオチドが、あるいは microRNA アゴニストとしては microRNA mimics が有望であった。

### 2. 研究の目的

(1) let-7 microRNA の発現量と臨床指標との関連性を検討する。

(2) let-7 microRNA アゴニストによる口腔がん細胞の形質転換を行い悪性度の評価を行う。

(3) Lin28/let7 の機能解析を行い、将来の治療法の開発につなげる。

我々は let-7 microRNA の発現が正常組織に比べて、口腔がん細胞株と口腔がん臨床検体で減弱していることを以前の研究で明らかにした。

Lin28 は let-7 発現の調節因子と考えていた。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔がん組織、口腔がん由来細胞株、および口腔がん患者の血液と唾液より microRNA を抽出し、microRNA Array にて let-7 をはじめとした口腔がん関連 microRNA を確認した。

口腔がん組織、口腔正常粘膜、血液、

唾液、口腔がん由来細胞株から total RNA を抽出した。

抽出した total RNA から microRNA が含まれる 21 ~ 23 塩基程度の大きさの small RNA を、QIAGEN 社の miRNeasy ならびに QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて抽出した。

現在報告されている既知 microRNA が収載されている QIAGEN 社の miScript SYBR Green PCR Kit と miScript miRNA PCR Array を用いて、各検体の microRNA の発現状態を網羅的に解析した。

すでにこれまでの我々の研究から let-7a、let-7e 等をはじめとしたいくつかの microRNA の発現減弱がわかってきていた。そこで症例数を増やしてより詳細に検討を加えた。一方、腫瘍で発現増強する microRNA は、現在までのデータでは各腫瘍により差があり不安定だが、症例を増加させ確認した。口腔がん患者の血液・唾液でも、microRNA の発現状態を網羅的に解析した。

(2) (1)で選別された microRNA (let-7c および let-7g) の発現状態を RT-PCR で確認し、臨床指標と比較し正負の相関を検索した。

口腔がん関連 micro RNA (let-7c、let-7g) の発現程度と、それぞれの臨床指標 (分化度・進行度・リンパ節転移・予後) を比較した

microRNA 発現との間に正あるいは負の相関関係が認められる臨床的特徴を検索し、口腔がんの病態に関わる口腔がん関連 microRNA の検索を行った。

(3) let-7c および let-7g の発現が減弱した

ヒト口腔がん細胞株 (HSC3) に mimic および inhibitor を導入して形質転換を行い、細胞株の増殖能の変化を検証した。

6well dish の底面に 7 割程度まで HSC3 を増殖させ、そのうちの 1well の細胞数をカウントした。

のヒト口腔がん由来細胞株 (HSC3) に let-7c, let-7g のアゴニスト (let-7c microRNA mimic, let-7g microRNA mimic) およびアンタゴニスト (let-7c microRNA inhibitor, let-7g microRNA inhibitor) を Lipofectamine RNAiMAX を用いて遺伝子導入を行い、let-7 の発現を亢進させるまたは、抑制した。

ここで遺伝子導入を行わない対照群を negative control 群とした。

遺伝子導入時を基準として 24 時間後にそれぞれの well から細胞を回収し、細胞数をカウントして、遺伝子導入時からの細胞数の増加から増殖曲線を作成し、増殖能の変化を調べた。

- (4) let-7c および let-7g の発現が减弱したヒト口腔がん細胞株 (HSC3) に mimic および inhibitor を導入して形質転換を行い、細胞株の浸潤能の変化を調べた。(wound healing assay)

6well dish の底面に 7 割程度まで HSC3 を増殖させた。

状態で非血清含有の培地に交換し 24 時間 Starvation を行った。

Starvation 終了後に 200  $\mu$  ピペット用チップの先で軽く擦るようにして各々の well の底に直線状の細胞を排除した領域を作製した。直後に血清含有培地に交換し、let-7c, let-7g のアゴニスト (let-7c microRNA mimic, let-7g

microRNA mimic) およびアンタゴニスト (let-7c microRNA inhibitor, let-7g microRNA inhibitor) を Lipofectamine RNAiMAX を用いて遺伝子導入を行い、let-7 の発現を亢進させるまたは、抑制した。

ここで遺伝子導入を行わない対照群を negative control 群とした。

で遺伝子導入した時点を基準として 0 時間、6 時間、12 時間、18 時間、24 時間まで定点観測を行い細胞の浸潤面積を測定して細胞の浸潤能の変化を分析した。

- (5) let-7c および let-7g の発現が减弱したヒト口腔がん細胞株 (HSC3) に mimic および inhibitor を導入して形質転換を行い、癌の浸潤・転移に関係するとされている上皮間葉転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) 関連のメッセンジャー RNA (mRNA) の発現 (Snail1, N-cadherin, Vimentin, E-cadherin) の変化を調べた。

上記 (3) の までは同じ手順で行った。

で遺伝子導入した時点を基準として 24 時間後に遺伝子導入群と対照群の細胞を各々の well から回収した。

各々の群の細胞から miRNeasy Kit (Qiagen 社製) を用いて mRNA を含めた total RNA を抽出した後、逆転写、RT-PCR を行い mRNA の発現状態を調べた。

#### 4. 研究成果

- (1) 口腔がん由来細胞株、および口腔がん患者の血液と唾液より microRNA を抽出し、microRNA Array にて let-7 をはじめとした口腔がん関連 microRNA の検索結果、let-7a, let-7c, let-7e, let-7g,

miR-203, miR205, miR-218 等で発現減弱し, miR-34c-5p, miR-135b, miR-146b-5p, miR-155-5p 等で発現増強していることが明らかとなった.(図1~3)

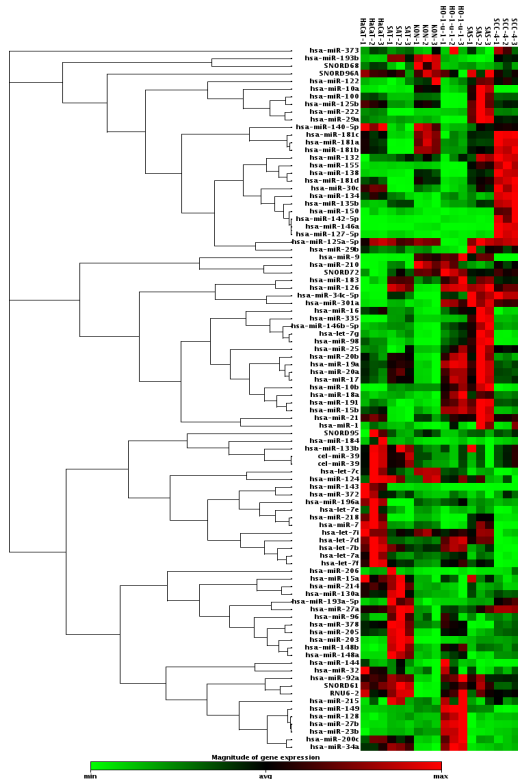


図 1: ヒト口腔がん細胞由来株における microRNA 発現の網羅的解析

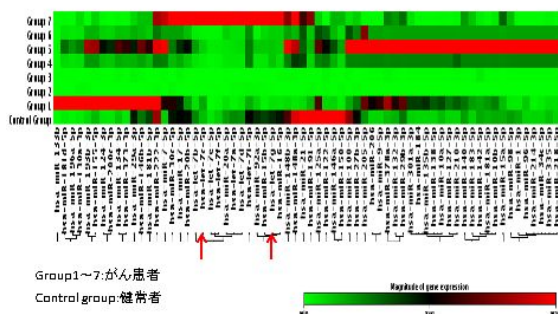


図 2: 口腔がん患者の血液中の遊離 microRNA の網羅的解析

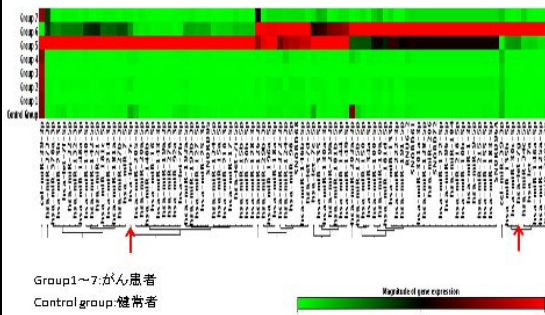


図 3: 口腔がん患者の唾液中の遊離 microRNA の網羅的解析

(2) (1)で抽出した口腔がん関連 microRNA のうち、let-7family に注目して、口腔がん組織、口腔正常粘膜、血液、唾液、口腔がん由来細胞株における発現状態を分析した結果、口腔がん組織では正常口腔粘膜組織と比較して let-7c および let-7g の発現量が劇的に低下していた。また、口腔がん組織で頸部リンパ節転移症例と非転移症例を比較すると、非転移症例で let-7c および let-7g 発現量が有意に低下していた。(図4)

一方で let-7c および let-7g の発現量と臨床指標(分化度、進行度、予後)には、相関は確認できなかった。

また、口腔がん由来細胞株(HSC3)における let-7family の発現量を測定し、正常皮膚細胞由来株(HaCaT)における let-7c および let-7g の発現量と比較分析した結果、HSC3において有意に発現量が低下していることが明らかとなった。(図5)

口腔がん患者と非口腔がん患者の血液および唾液中の遊離 let-7family の発現量を比較したが、現時点では両者に有意な差を認めることはできなかった。

口腔がん組織における let-7c および let-7g の発現量と口腔がん頸部リンパ節転移には相関を認めたことから、がん組織内における let-7c および let-7g の発現量測定が頸部リ

リンパ節転移判定の指標となりうることが示唆された。

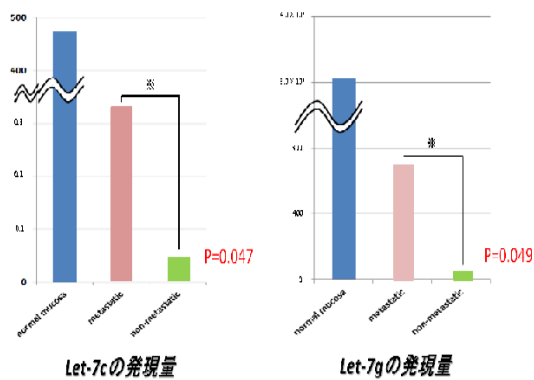


図 4: 口腔がん組織と正常歯肉組織における let-7c と let-7g の発現量  
 青：正常口腔粘膜組織、  
 赤：口腔がん組織（転移性症例）  
 緑：口腔がん組織（非転移性症例）

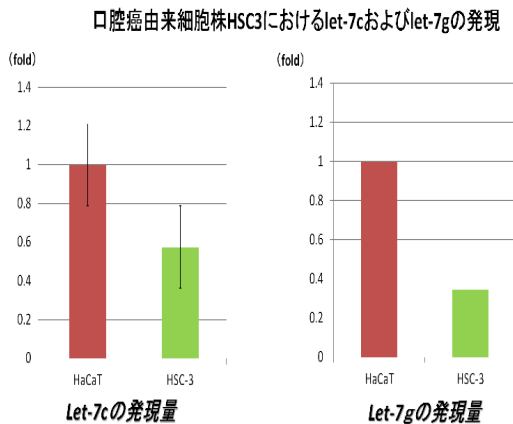


図 5: ヒト口腔がん由来細胞株 HSC3 における let-7c および let-7g の発現

(3) ヒト口腔がん細胞株 (HSC3) に let-7c および let-7g のアゴニスト (let-7c microRNA mimic, let-7g microRNA mimic) を導入して形質転換を行うことにより、いずれの場合もコントロール群に比べて増殖能が抑制されていた。(図 6)  
 このことから let-7c および let-7g は癌細胞の増殖能に関係していることが示唆され、がん治療薬としての応用の可能性があることがわかった。

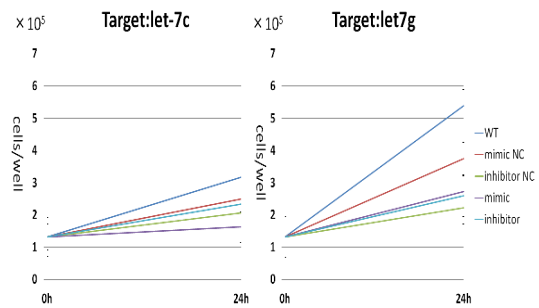


図 6: ヒト口腔がん由来細胞株 (HSC3) の let-7c, let-7g の mimic, inhibitor 導入後の増殖曲線

(4) ヒト口腔がん細胞株 (HSC3) に let-7c および let-7g のアゴニスト (let-7c microRNA mimic, let-7g microRNA mimic) を導入して形質転換を行ったが、wound healing assay においては両者の浸潤能に有意差は認めなかった。結果は let-7c の mimic 導入細胞群と Negative control 群を比較したものを載せた。(図 7)  
 let-7g についても同様の動態を示した。

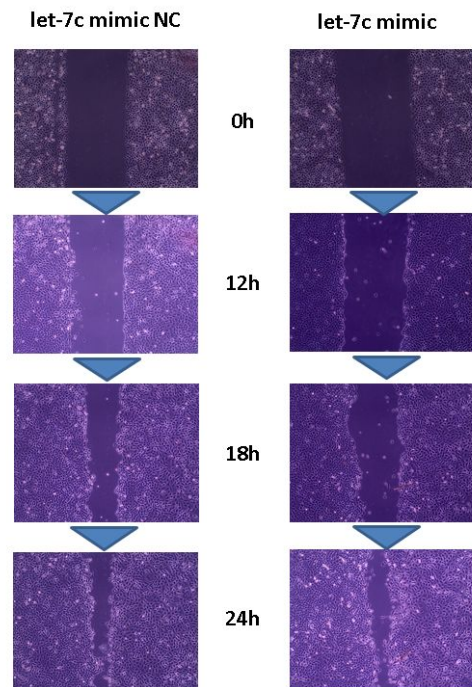


図 7: wound healing assay 結果  
 左: Negative control 群, 右: mimic 導

(5) ヒト口腔がん細胞株 (HSC3) に let-7c アゴニスト (let-7c microRNA mimic) を導入して形質転換を行った結果、mimic 導入時に Snail1 の発現が上昇することが確認された。これは想定された結果と逆の動態を示していた。(図 8)

let-7familyとSnail1の間に間接的な相関関係があるとする報告はあるが、いずれもmimic導入によりSnail1の発現を抑制する作用とされている。今回の研究の結果に関しては、更なる検証実験が必要である。

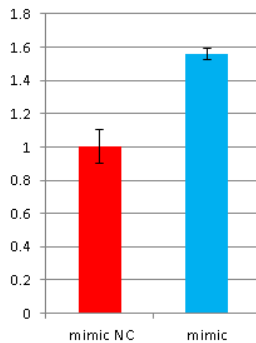


図 8:HSC3 に let-7c mimic 導入時の mRNA(Snail1)の動態

<引用文献>

- ・ N.Sethi et al./European Journal of Cancer50、(2014) 2619-2635
- ・ Chang CJ et al /Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancerOncology Report. 2011 Oct;26(4):1003-10

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計7件)

- 長井宏樹、  
口腔がんにおける microRNA let-7family 発現の意義、  
第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、  
2015 年 1 月 29 日～2015 年 1 月 30 日、  
奈良
- 長谷川正午、  
口腔癌の頸部リンパ節転移における miR-205 と Interferon Regulatory Factor 1 の関係、  
第 59 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会、  
2014 年 10 月 17 日～2014 年 10 月 19 日、  
千葉
- 内田文彦、  
口腔癌の頸部リンパ節転移における miR-155-5p と zinc finger protein 703 の関係、  
第 59 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会、  
2014 年 10 月 17 日～2014 年 10 月 19 日、

千葉  
馬場脩、  
口腔癌における miR-203 の機能解析と臨床応用、  
第 59 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会、  
2014 年 10 月 17 日～2014 年 10 月 19 日、  
千葉

Shougo Hasegawa,  
miR-205-5p Target Interferon Regulatory Factor 1 and Suppresses Metastasis in Oral Cancer Cells,  
2014 AAOMS Annual Meeting-American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons,  
2014 年 9 月 8 日～2014 年 9 月 13 日、  
ホノルル(USA)

Fumihiko Uchida,  
miR-155-5p Target ZNF703 and Suppresses Metastasis in Oral Cancer Cells,  
2014 AAOMS Annual Meeting-American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons,  
2014 年 9 月 8 日～2014 年 9 月 13 日、  
ホノルル(USA)

Osamu Baba,  
Utility of Saliva in the Evaluation of microRNA function as a Tumor Suppressor in Oral Squamous Cell Carcinoma,  
2014 AAOMS Annual Meeting-American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons,  
2014 年 9 月 8 日～2014 年 9 月 13 日、  
ホノルル(USA)

内田文彦、  
血液・唾液をサンプルとした口腔がん関連遊離 microRNA の網羅的発現解析、  
第 66 回日本口腔科学会学術会、  
2013 年 5 月 23 日、  
栃木

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武川 寛樹 (BUKAWA HIROKI )  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：80173558

(2)研究分担者

(3)連携研究者