

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670861

研究課題名(和文) 口腔癌先制医療への唾液 microRNA の応用

研究課題名(英文) Clinical application of salivary microRNA to preemptive medicine for oral cancer

## 研究代表者

浜川 裕之 (Hamakawa, Hiroyuki)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20127905

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)：近年、microRNA (miRNA) が体液中に安定な状態で存在し、その検出が可能であることから種々の悪性腫瘍において有用なバイオマーカーとなることが報告されている。本研究では、口腔癌患者の唾液あるいは血清において特異的に存在量が変動する miRNA を探索した。その結果、miR-26a、miR-191 など 10 種類の miRNA の存在量が口腔癌患者の血清において有意に低下していた。さらに、その中の miR-26a はヒト口腔癌細胞に対して増殖抑制効果を示した。以上の結果より、口腔癌において特定の miRNA がバイオマーカーや先制医療のツールとして有用となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, it is known that miRNAs exist and circulate in many types of body fluids. These reports suggest the possibility that circulating miRNA in body fluid becomes a novel biomarker for cancer patients. In this study, we have attempted to identify novel miRNA markers in saliva and serum for oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients. We extracted and purified circulating miRNA in saliva and serum of OSCC patients and healthy volunteers, and then carried out miRNA microarray analysis and quantitative RT-PCR. Ten miRNAs, let-7b/c, miR-17, miR-23a/b, miR-24, miR-25, miR-26a, miR-122a, miR-191 were significantly reduced in the serum of the OSCC patients. Furthermore, miR-26a significantly inhibited the growth of human OSCC cells. These results suggest that several miRNAs may be novel biomarkers for OSCC patients, and useful as a tool for preemptive medicine in OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 microRNA 先制医療

## 1. 研究開始当初の背景

近年、口腔癌を含む頭頸部癌のエクソームシーケンシングの結果が報告されたが、既存の抗癌薬の治療標的分子に変異はほとんど認められず、治療成績を向上させるためには予防や早期発見が重要であることが示された (Agrawal N, et al. Science 333:1154-1157, 2011)。

また、先制医療とは発症前に高い精度で発症予測あるいは正確な発症前診断を行い、病気の症状や重大な組織障害が起こる前の適切な時期に治療的介入を実施して発症を防止するか遅らせるという新しい医療のパラダイムである。今後、わが国が健康長寿社会を実現するためには重要な方向性である。口腔は、摂食、嚥下や構音など日常生活を営む上で極めて重要な機能を担っているため、先制医療の対象疾患として口腔癌はふさわしいと考えられる。

一方、microRNA (miRNA) は 18~25 塩基からなる小分子 RNA で、標的 mRNA に結合することで、その蛋白質への翻訳を阻害する。これら miRNA の発現あるいは機能異常が癌を含め種々の疾患に関与していることが明らかにされている。最近では、ヒト体液 (血液、唾液、尿など) 中に miRNA の存在が明らかにされ、有用なバイオマーカーとなり得ることが示されている (Kosaka N, et al. Cancer Sci 101:2087-2092, 2010)。また、体液中を循環する miRNA は他の細胞に取り込まれ、そこで機能することも明らかにされている。したがって、唾液や血液中の miRNA が口腔癌の発症に関与している可能性も十分に考えられる。

## 2. 研究の目的

健常者および口腔癌患者の唾液および血液より miRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて唾液および血液中の全ての miRNA の定量解析を行い、口腔粘膜の悪性化に伴い唾液あるいは血液中の存在量の変動する miRNA を抽出し、その中よりヒト口腔癌細胞の増殖に影響を及ぼす miRNA を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔粘膜の悪性化に伴い唾液あるいは血液中の存在量の変動する miRNA の網羅的探索

最初に、口腔扁平上皮癌患者 (11 名) および健常者 (8 名) の唾液あるいは血清 0.2 ml より miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) を用いて miRNA を抽出した。抽出された miRNA をビオチン化したのちマイクロアレイ (Affymetrix) による網羅的発現解析を行った。つづいて、Expression Console (Affymetrix) および GeneSpring GX 12.1 (Agilent Technologies) ソフトウェアを用いて癌患者と健常者で 5 倍以上の存在量の変動を示す miRNA を同定した。

次に、新たに口腔扁平上皮癌患者 (30 名)、

同年代同性別の健常者 (10 名) の唾液および血清 0.2 ml より miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) を用いて miRNA を抽出した。抽出前の唾液および血液に外来性内部標準として合成センチュウ miR-39 (cel-miR-39, Qiagen) を添加した。マイクロアレイ解析にて同定した miRNA の存在量をリアルタイム定量 RT-PCR (qRT-PCR) 法にて定量した。最終的に、qRT-PCR にも口腔粘膜の悪性変化に伴い唾液あるいは血清中の存在量が有意に変動する miRNA を同定した。

### (2) ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖を制御する唾液 miRNA の同定

マイクロアレイおよび qRT-PCR にて同定した口腔粘膜の悪性変化に伴い唾液あるいは血清中の存在量が顕著に変動する miRNA の模倣型合成 miRNA をそれぞれ 20 nM の濃度で Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用いてヒト口腔扁平上皮癌細胞にリバーストランスフェクションした。合成 miRNA 導入後 72 時間培養した後に WST-8 (Dojindo) にて細胞数を定量することにより細胞増殖への影響を評価し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (GFP-SA) の増殖を制御する miRNA を同定した。

## 4. 研究成果

唾液や血液などの体液中には高濃度のヌクレアーゼが存在しており、naked な miRNA の半減期は数分であるが、唾液および血液から miRNA を抽出、検出することが可能であった。これは、体液中の miRNA が exosome や high-density lipoprotein に封入されていたり、Ago-2 や他の蛋白質と複合体を形成しているためと報告されている。本研究で用いた miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) は、そのような存在状態に関係なく唾液および血清中に存在する全ての miRNA を抽出することができた。

マイクロアレイ解析の結果、健常者と比較して口腔扁平上皮癌患者の唾液では、20 種類の miRNA の存在量が低下していた。一方、血清では 2 種類の存在量が上昇し、12 種類の存在量が低下していた。さらに、qRT-PCR 法では血清中の let-7b/c、miR-17、miR-23a/b、miR-24、miR-25、miR-26a、miR-122a、miR-191 の存在量が口腔扁平上皮癌患者において有意に低下していた。その中において、miR-26a はヒト口腔扁平上皮癌細胞に対して有意な増殖抑制効果を有していた (図 1、2)。

以上の結果より、口腔扁平上皮癌患者において血清中の特定の miRNA がバイオマーカーおよび先制医療のツールとして有用となる可能性が示唆された。

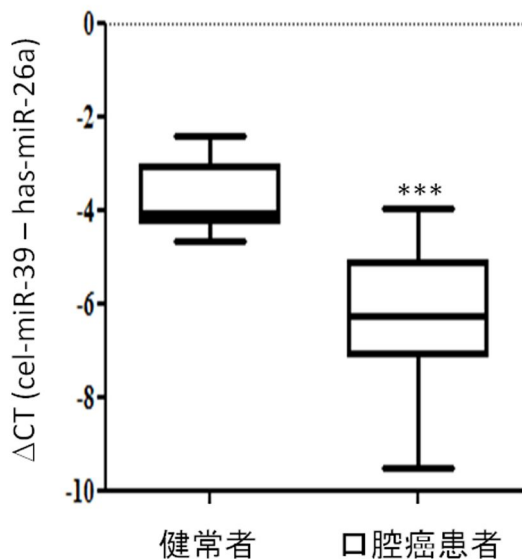


図 1. 口腔扁平上皮癌患者血清における miR-26 a の低下

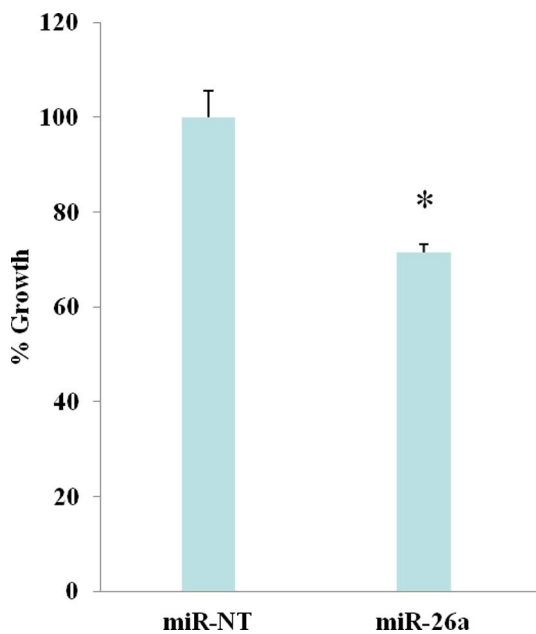


図 2. ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する miR-26 a の増殖抑制効果

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

Goda H, Nakashiro K, Ogawa I, Takata T, Hamakawa H. Peripheral ameloblastoma with histologically low-grade malignant features of the buccal mucosa: a case report with immunohistochemical study and genetic analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 8:2085-9,2015. 査読有  
<http://www.ijcep.com/ISSN:1936-2625/>

JCEP0004342

Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T, Nakashiro K, Sugita A, Fujita T, Koido S, Homma S, Kawakami Y, Hamakawa H. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 9:e110378,2014.

査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0110378.

Tano T, Okamoto M, Kan S, Bando T, Goda H, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Fujita T, Sato M, Yamashita N, Hamakawa H, Kawakami Y.

Immunochemoradiotherapy for patients with oral squamous cell carcinoma: augmentation of OK-432-induced helper T cell 1 response by 5-FU and X-ray irradiation. *Neoplasia* 15:805-14,2013.

査読有

DOI:10.1593/neo.13488

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* 49:551-9,2013. 査読有

DOI:10.1016/j.oraloncology.2013.02.002.

DOI:10.1016/j.oraloncology.2013.02.002.

### 〔学会発表〕(計 4 件)

岩本和樹、中城公二、徳善紀彦、田中宏史、浜川裕之、口腔扁平上皮癌における新規バイオマーカーとしての microRNA の探索、第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2014 年 10 月 18 日、幕張メッセ国際会議場・国際展示場(千葉県千葉市)

Iwamoto K, Nakashiro K, Tokuzen N, Tanaka H, Hamakawa H. MicroRNA in saliva and serum is a novel biomarker for oral squamous cell carcinoma patients. 96<sup>th</sup> American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Annual Meeting. Sep. 11, 2014. Honolulu, USA

中城公二、田中宏史、岩本和樹、徳善紀彦、浜川裕之、口腔癌診断・治療への microRNA の応用、シンポジウム「口腔癌研究のシーズを探す」、第 68 回日本口腔科学会学術集会、2014 年 5 月 9 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

中城公二、田中宏史、岩本和樹、徳善紀彦、日野聡史、浜川裕之、口腔扁平上皮癌の転移を支持する分子基盤の解明、シンポジウム「組織培養を用いた口腔癌研究の最前線 -発癌から医療への応用まで-」、第 50 回日本口腔組織培養学会学術大会、2013 年 11 月 24 日、日本歯科大学

命歯学部（東京都千代田区）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 3 件）

名称：Composition containing antisense oligonucleotide to microRNA

発明者：Nakashiro K, Hamakawa H, Tanaka H

権利者：National University Corporation Ehime University

種類：Patent

番号：US 8,889,649 B2

出願年月日：Nov. 12, 2010

取得年月日：Nov. 18, 2014

国内外の別： 国外

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：愛媛大学

種類：特許

番号：5419195

出願年月日：2007年8月3日

取得年月日：2013年11月29日

国内外の別： 国内

名称：Akt 遺伝子に特異的な siRNA

発明者：中城公一、浜川裕之

権利者：愛媛大学

種類：特許

番号：5232990

出願年月日：2006年11月8日

取得年月日：2013年4月5日

国内外の別： 国内

## 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