

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670867

研究課題名(和文) 口腔癌の再発・転移に対するバイオマーカーとしてのマイクロRNA探索

研究課題名(英文) Investigation of microRNA as a biomarker in recurrence and metastasis of oral cancer

研究代表者

浦出 雅裕 (Urade, Masahiro)

兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授

研究者番号：70104883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、口腔癌組織や血清中に存在し、癌遺伝子や癌抑制遺伝子発現を制御するノンコーディングRNAであるマイクロRNA(miRNA)の発現を検索するとともに口腔癌バイオマーカーとなりうるか否かを検討することを目的とする。

同一舌癌患者から得た原発巣、リンパ節転移巣、転移巣に由来する培養癌細胞(OSCC)、初診時血清に対してマイクロアレイを用いてmiRNA発現を検索した結果、対照の口腔ケラチノサイトに比べ、いずれの試料においても低発現していたmiR-365-5pおよびmiR-4756-5pは、OSCCの増殖、浸潤能に強く関与していたことから、口腔癌のバイオマーカーとして有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to examine the expression of microRNA (miRNA) that exists in oral cancer tissues and serum, and is non-coding RNA regulating expression of oncogenes and tumor suppressor genes, and to investigate the possibility to become a biomarker of oral cancer.

The microRNA expression was examined using microarray for primary tumor, metastatic tumor, cultured tumor cells (OSCC) derived from lymph node metastasis, and serum of the first visit of the same tongue cancer patient. Consequently, it was found that miR-365a-5p and miR-4756-5p were down-regulated in all samples as compared to oral keratinocyte as control, and strongly involved in growth and invasiveness of OSCC. These results indicated that these two miRs are potent biomarker of oral cancer.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 マイクロRNA 原発巣 転移巣 培養癌細胞 患者血清 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療において、超選択的動注化学療法をはじめとした各種の集学的治療により、局所制御率は飛躍的に向上したものの、5年生存率はわずかしき改善していない。その主たる要因は、従来の抗癌治療によっても残存し、治療抵抗性を示す悪性度の高い癌細胞による再発や転移の制御不能によると考えられる。したがって、悪性度の高い癌細胞の性状解析を行うとともに、再発や転移の有無を早期に検出できるバイオマーカーの開発は不可欠である。しかし、現在のところ、口腔癌に対する有用な腫瘍マーカーはない。最近、癌細胞中に癌遺伝子や癌抑制遺伝子発現を制御するノンコーディング RNA であるマイクロ RNA (miRNA) が発見された。この miRNA は約 22 ヌクレオチドの長さを持つ単鎖 RNA 分子で、転写後レベルで遺伝子発現を制御する。癌組織特異的な発現パターンを示すだけでなく、血清中にも存在することが確認されたことから[引用文献 1, 2]、癌のバイオマーカーとして注目されている。頭頸部癌においては、let-7d や miR-205 が予後と関連することが報告された[引用文献 3 - 7]。したがって、口腔癌の診断や予後判定に miRNA は重要な意義を有すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、口腔癌組織や血清中におけるマイクロ RNA (miRNA) の発現を検索し、口腔癌特異的な miRNA を同定する。さらに、これらの miRNA が再発や転移に対する口腔癌バイオマーカーとなりうるか否かを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 患者(69歳女性, T4N2cM0, Stage IV, 高～中分化型扁平上皮癌)の同意が得られた舌癌の原発巣、リンパ節転移巣、転移巣に由来する培養癌細胞(OSCC) および初診時血清より抽出した small RNA についてヒト miRNA 用マイクロアレイ (3D-Gene^R, 東レ株式会社)を用いて miRNA 検索を行った。対照には口腔ケラチノサイト(HKT)を用いた。

(2) 対照の HKT に比べ、3倍以上の高発現あるいは1/3以下の低発現 miRNA を抽出した。

(3) 原発巣、転移巣、OSCC、初診時血清のすべてにおいて高発現あるいは低発現する miRNA の中から、代表的な miRNA を選び、高発現 miRNA に対しては inhibitor (抑制 miRNA) を、低発現 miRNA に対しては mimic (類似 miRNA) (株式会社キアゲン) を作成した。

(4) inhibitor あるいは mimic をそれぞれ 50 μ M, 20 μ M の濃度で、HiPerFect Transfection Reagent(キアゲン)を用いて、

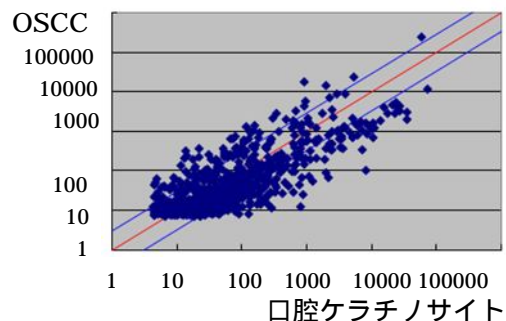
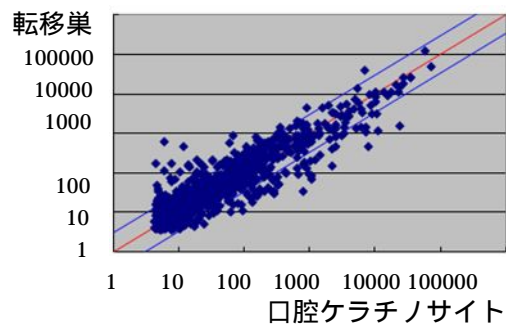
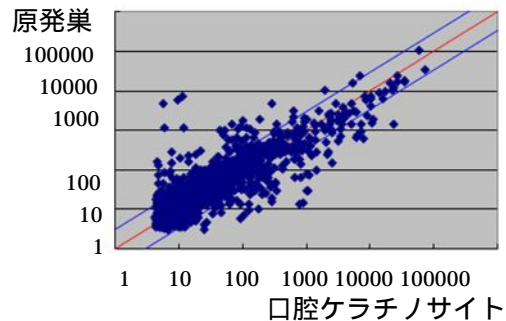
OSCC にトランスフェクションすることにより、増殖能、浸潤能に及ぼす影響を検討した。miRNA の対照としては negative control siRNA を用いた。

(5) OSCC の増殖能は、トランスフェクション後 3 - 5 日目に生細胞数を算定することにより求めた。

(6) OSCC の浸潤能は、トランスフェクション後 3 日目の細胞を Matrigel^R Invasion Chamber (CORNING, Bio Coat) に播き、24 時間後に固定、染色し、浸潤細胞数を算定した。

4. 研究成果

(1) 検索した 1,709 miRNA のうち、原発巣、転移巣、OSCC において、HTK に比べ 3 倍以上高発現あるいは 1/3 以下に低発現した miRNA は 643 あり、302 は高発現、341 は低発現を示した。高発現した 302 miRNA のうち、130 は原発巣、80 は転移巣、92 は OSCC であった。低発現を示した 341 miRNA のうち、90 は原発巣、62 は転移巣、189 は OSCC であった(図 1)。



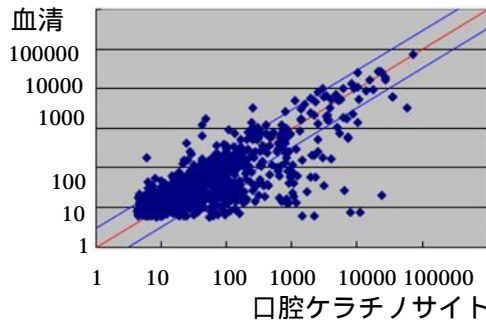


図1 . miRNA 発現の比較分析のためのスキャッター・プロット
赤線は 1:1 発現、青線は 3:1 または 1:3 発現を示す。

(2) 原発巣、転移巣、OSCC 全てにおいて、31 miRNA は高発現、36 miRNA は低発現していた(図2)。これらいずれにも高発現している miRNA は発がん(oncogenic)miRNA、低発現している miRNA は腫瘍抑制性(tumor suppressive)miRNA と考えられる。

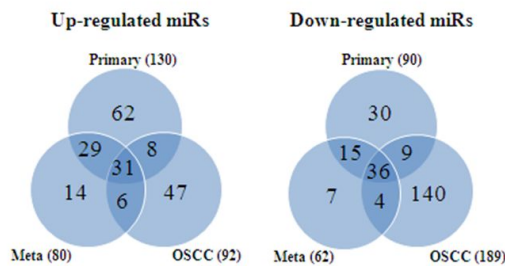


図2 . 原発巣(Primary)、転移巣(Meta)、OSCC において高発現(Up-regulate)あるいは低発現(Down-regulate)した miRNA 数字は対照の口腔ケラチノサイトに比べて 3 倍以上発現あるいは 1/3 以下に発現した miRNA の数を表す。

(3) 31 高発現 miRNA のなかで、miR-140-3p, miR-223-3p, miR-125a-3p, miR-4306, miR-887, miR-185 の 6 個の miRNA は血清中においても高発現を示し、また 36 低発現 miRNA のなかで、miR-365a-5p, miR-1973, miR-4284, miR-3687, miR-4756-5p を含む 27 個の miRNA は血清中においても低発現を示した。let-7i, miR-30b, miR-155 は原発巣と OSCC において高発現したが、血清中では低発現であった。

(4) これらの高発現 miRNA の中から特に発現の高かった miR-140-3p, miR-4306, miR-223-3p, miR-4324 に対して作成された inhibitor、また特に発現の低かった miR-365a-5p, miR-4756-5p, miR-4284 に対

して作成された mimic のトランスフェクションにより、OSCC の増殖能は対照に比べ 7-50%抑制された。特に miR-365-5p および miR-4756-5p の mimic 処理により強い抑制が見られた(図3)。

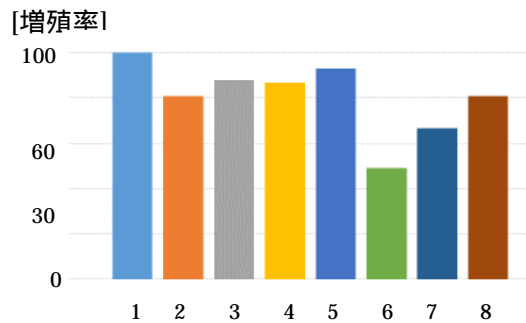


図3 . miRNA に対する inhibitor または mimic 処理による OSCC の増殖に及ぼす影響

1. 対照, 2. 抗 miR-140-3p, 3. 抗 miR-4306, 4. 抗 miR-223-3p, 5. 抗 miR-4324, 6. 合成 miR-365a-5p, 7. 合成 miR-4756-5p, 8. 合成 miR-4284.

(5) いくつかの inhibitor と mimic を組み合わせてトランスフェクションしたが明らかな併用効果はみられなかった。

(6) Matrigel Invasion Chamber を用いた OSCC の浸潤能において、いずれの miRNA に対する inhibitor または mimic 処理においても対照に比べ、20-84% の抑制効果が認められ、とくに mimic の 3 個 miR-365a-5p, miR-4756-5p, miR-4284 は強い抑制を示した(図4)。

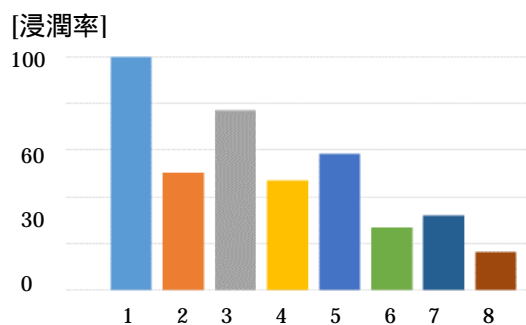


図4 . miRNA に対する inhibitor または mimic 処理による OSCC の浸潤に及ぼす影響

1. 対照, 2. 抗 miR-140-3p, 3. 抗 miR-4306, 4. 抗 miR-223-3p, 5. 抗 miR-4324, 6. 合成 miR-365a-5p, 7. 合成 miR-4756-5p, 8. 合成 miR-4284.

これらの結果から、miR-365a-3p および miR-4756-5p は口腔癌のバイオマーカーとして有望であると考えられる。

<引用文献>

- Mitchell PS, et al. Circulating microRNA as a stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci USA. 105, 2008, 10513-10518
- Liu C-J, et al. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. Oral Dis. 16, 2010, 360-364
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signature in human cancers. Nature Rev. Cancer. 6, 2006, 857-866
- Chang SS, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 123, 2008, 2791-2797
- T-S Wong, et al. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. Clin Cancer Res. 14, 2008, 2588-2592
- Hui ABY, et al. Comprehensive microRNA profiling for head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 16, 2010, 1129-1139
- Chang K-W, et al. Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma. J Dent Res. 87, 2008, 1063-1068

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 1件)

浦出雅裕、野口一馬、頭司雄介、清 仁美、岸本裕充：口腔癌患者の原発巣、転移巣、培養癌細胞、血清におけるマイクロRNA 発現プロファイリング(第 22 回欧州頭蓋顎顔面外科学会議、2014.9.23-26, プラハ、チェコスロバキア)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浦出 雅裕 (URADE, Masahiro)
兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授
研究者番号：70104883

(2)研究分担者

野口 一馬 (NOGUCHI, Kazuma)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50309473

頭司 雄介 (ZUSHI, Yusuke)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：80581206