

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861952

研究課題名(和文) OncomiR を標的とした新規口腔癌治療の開発

研究課題名(英文) Targeting oncomiR in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

田中 宏史 (Tanaka, Hiroshi)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80647371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：LNA を Gapmer でかつ 21 塩基にデザインした miR-361-3p に対する ASO を用いて動物実験を行ったが、対照群と比べて有意な差を認めなかった。しかしながら、マウスの体重減少や食欲低下などの副作用も認めなかった。初代培養細胞に miR-361-3p, miR-133ab に対する ASO を 10nM で導入したところ口腔癌細胞と同様に著明な細胞増殖抑制効果を認めた。

標的遺伝子の探索については、miR-361-3p の標的遺伝子候補として OSR2 を、miR-133ab の標的遺伝子候補として CEBPA を抽出した。

研究成果の概要(英文)：We assessed the growth inhibitory effect of LNA ASO for miR-361-3p in vivo using a mouse model. But there was no significant difference compared to the control group. It did not also observed side effects such as weight loss and loss of appetite in mice. LNA ASO was transfected into primary cultured cells at the concentration of 10 nM. As in the case of OSCC cell lines, knockdown of miR-361-3p induced the growth inhibition of OSCC primary cultured cells. Furthermore, bioinformatic and microarray analyses indicated that miR-361-3p and miR-133ab could target OSR2 mRNA and CEBPA mRNA.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 microRNA

1. 研究開始当初の背景

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タンパク質への翻訳を阻害する(図 1)。現在までに 1,921 種類のヒト miRNA がデータベース (miRBase Ver.19.0) に登録されており、これら miRNA の発現あるいは機能異常が種々の疾患に関与していることが明らかにされている。特に、癌領域では miRNA マイクロアレイを用いた網羅的発現解析により発現亢進及び発現低下している miRNA が多数同定されている。われわれはヒト miRNA knockdown library (miRBase Ver.12 対応) を用いた miRNA の網羅的機能阻害解析により、ヒト口腔癌細胞における OncomiR の同定を試みた。ヒト 918 種類の miRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を用いた miRNA の網羅的機能阻害解析では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞および唾液腺癌細胞において 14 種類の OncomiR を同定した。その中でも、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-133a/b に対する機能阻害核酸すなわち ASO は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞および唾液腺癌細胞に対して著明な増殖抑制効果を示した。

2. 研究の目的

近年、種々の癌においてその悪性形質に関与する microRNA (miRNA) が発見され、特に癌遺伝子的な性質を有する Oncogenic miRNA (OncomiR)、逆に癌抑制遺伝子様の機能を発揮する Tumor suppressive miRNA (TS-miR) が存在することが知られている。これまでに、申請者はヒト miRNA の機能阻害ライブラリーを用いた網羅的機能解析によりヒト口腔癌細胞の増殖に関与する OncomiR を 14 種類同定した。本研究では、これら miRNA の機能をヒト口腔癌細胞ヌードマウス背部皮下腫瘍を用いて評価するとともに正常組織に及ぼす影響も合わせて検討することで、OncomiR を標的とした口腔癌に対する新規核酸医薬品の開発を目的とした。

3. 研究の方法

1) 生体投与に向けた核酸の修飾

miRNA を機能阻害する ASO には LNA/DNA ASO を用いる。この LNA を ASO の中に組み込み、ASO の LNA の挿入部位、塩基数、ホスホロチオエート (S 化) 骨格に関して、最も優れた miRNA 機能阻害、細胞増殖抑制効果を示す条件について検討を行った。

2) 生体における LNA/DNA ASO の抗腫瘍効果と安全性の評価

培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (GFP-SAS) 2×10^6 個をヌードマウス背部皮下に移植し、7 日後に腫瘍形成を確認したのちわれわれがこれまでの研究で同定した OncomiR に対する ASO 10-50 mg/kg を尾静脈内に 3 日間隔

にて 7 回投与する。腫瘍径を 3 日間隔にて経時的に計測し、腫瘍体積を算出した。

3) 初代培養細胞に対する ASO の細胞増殖抑制効果の評価

口腔癌手術材料の一部を用いて腫瘍細胞を分離した。方法論としては *in vitro* 抗癌薬感受性試験 Collagen Gel Droplet Embedded Culture Drug Sensitivity Test (CD-DST)(小林ら、癌と化学療法 22 (13): 1933-1939, 1995) に準じた。分離培養した初代培養細胞に ASO を 10nM の濃度でトランスフェクションし 3 日後の細胞増殖抑制効果を WST-8 assay にて評価した。

4) OncomiR の標的遺伝子の探索と分子機構の解明

ヒト口腔癌細胞に ASO をそれぞれ 10 nM で導入し、24 時間後に total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析、(Ingenuity Pathway Analysis) IPA を用いて発現変動遺伝子 mRNA の 3'-非翻訳領域 (UTR) に OncomiR の結合配列を有する遺伝子を抽出し、標的遺伝子候補とした。次に、ルシフェラーゼおよび Cytotoxic Sensor 遺伝子の 3' 側に各標的 mRNA の 3'-UTR をクローニングしたベクターと OncomiR を同時に導入し、ルシフェラーゼ活性の低下が確認できれば、それぞれの miRNA の標的遺伝子として同定した。

4. 研究成果

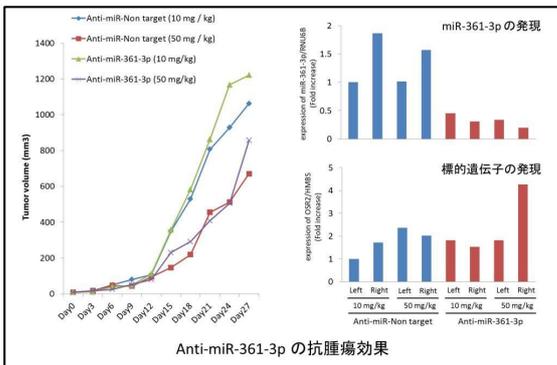
1) 生体投与に向けた核酸の修飾

生体投与に向けた核酸の修飾については LNA の配列を Gapmer と Mixmer にし、両者で比較すると Gapmer 配列の能が低濃度での細胞増殖抑制効果に優れていることがわかった。また、miR-361-3p のシード配列に対する相補鎖を完全に含めた 15-21 塩基の ASO の機能阻害効果が顕著であることがわかった。miR-361-3p に対する完全相補鎖である ASO の阻害効果はほぼ消失していた。さらに ASO に S 化修飾を加え 10nM 以上で導入すると非特異的細胞増殖抑制を認め、ASO の機能阻害効果を減弱させることがわかった。以上の結果から生体投与に向けた核酸の修飾は、LNA の配列を Gapmer にし、塩基数を 21 塩基にデザインした ASO が望ましいと考えられた。

2) 生体における LNA/DNA ASO の抗腫瘍効果と安全性の評価

マウス背部皮下腫瘍モデルを用いて動物実験を行った。LNA を Gapmer でかつ 21 塩基にデザインした ASO を用いた。マトリゲルと混合させた口腔癌細胞株である GFP-SAS 2×10^6 個をヌードマウス背部皮下に移植し、腫瘍形成後に miR-361-3p に対する ASO を 10mg/kg で尾静脈から 7 日に 1 度の頻度で全身投与した。投与後 28 日まで経過観察したが対照群と比べて有意な差を認めなかった。さらに投与量を 50mg/kg へ増量し同様の実験を行った。しかしながら、10mg/kg の際と同じように、有意な抗腫瘍効

果を得ることができなかったが、マウスの体重減少や食欲低下などの副作用も認めなかった。

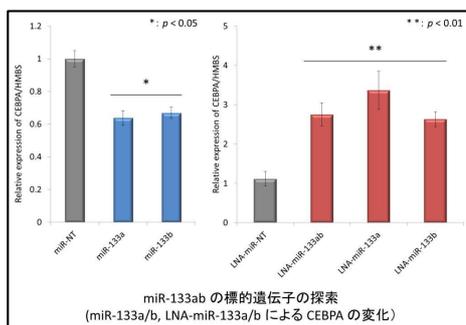
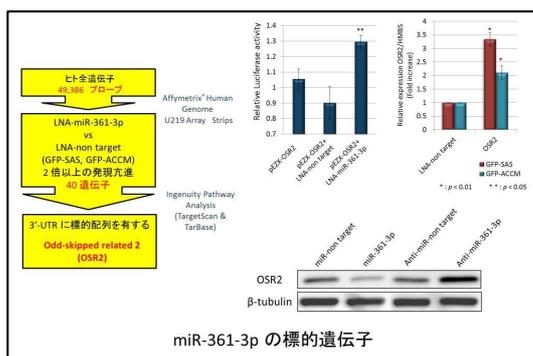


3) 初代培養細胞に対する ASO の細胞増殖抑制効果の評価

初代培養細胞に対する ASO の細胞増殖抑制効果の評価については、手術検体より得られた組織から樹立し安定した増殖を示す初代培養細胞を用いた。初代培養細胞に miR-361-3p, miR-133ab に対する ASO を 10nM で導入したところ口腔癌細胞と同様に著明な細胞増殖抑制効果を認めた。

4) OncomiR の標的遺伝子の探索と分子機構の解明

OncomiR の標的遺伝子の探索についてはマイクロアレイ解析、IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いて発現変動遺伝子 mRNA の 3' 非翻訳領域に oncomiR の結合配列を有する遺伝子を抽出し標的遺伝子候補を探索した。miR-361-3p の標的遺伝子候補として OSR2 を、miR-133ab の標的遺伝子候補として CEBPA を抽出した。口腔癌細胞である GFP-SAS に miR-361-3p を導入すると OSR2 が、miR-133ab を導入すると CEBPA の発現量が有意に低下することが明らかとなった。



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 2 件)

Iwamoto K, Nakashiro K, Tanaka H, Tokuzen N, Hamakawa H

Ribonucleotide reductase M2 is a promising molecular target for the treatment of squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 46 (2015) 1971-77. 査読有

田中宏史、中城公一、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に關与する microRNA の同定

日本口腔組織培養学会雑誌 24 卷 (2015) 39-40. 査読無

(学会発表)(計 8 件)

田中宏史、中城公一、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に關与する microRNA の同定

第 51 回日本口腔組織培養学会 九州歯科大学講堂(福岡県小倉市) 2014 年 11 月 15 日

Hiroshi Tanaka, Koh-ichi Nakashiro, Kazuki Iwamoto, Norihiko Tokuzen, Satoshi Hino, Hiroyuki Hamakawa

Mutations analysis of cancer-related genes in primary cultured metastatic oral squamous cell carcinoma cells

73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 横浜 2014 年 9 月 25-27 日

田中宏史、中城公一、岩本和樹、徳善紀彦、日野聡史、浜川裕之

初代培養細胞を用いた口腔扁平上皮癌の転移を支持する microRNA の同定

第 6 回日本 RNAi 研究会 グランドプリンスホテル広島(広島県広島市) 2014 年 8 月 28-30 日

田中宏史、中城公一、日野聡史、浜川裕之

口腔扁平上皮癌初代培養細胞を用いた転移関連分子の網羅的探索

第 18 回日本がん分子標的治療学会 仙台市情報・産業プラザ、ホテルメトロポリタン仙台、TKP ガーデンシティ仙台(宮城県仙台市) 2014 年 6 月 25-27 日

田中宏史、田野智之、日野聡史、中城公一、浜川裕之

セツキシマブによる重篤な infusion reaction を認めた再発舌癌の 1 例

第 43 回日本口腔外科学会中四国支部学術集会 ホテルグランドパレス徳島、徳島大学長井記念ホール(徳島県徳島市) 2014 年 4 月 26 日

田中宏史、中城公一、岩本和樹、徳善紀彦

彦、浜川裕之
ヒト口腔癌細胞における
microRNA-133a/b の細胞増殖に与える影
響

第5回日本RNAi研究会 グランドプリン
スホテル広島(広島県広島市) 2013年
8月29-31日

田中宏史、中城公一、岩本和樹、徳善紀
彦、浜川裕之

MicroRNA-133a/b のヒト口腔癌細胞の増
殖における役割

第67回日本口腔科学会学術集会 栃木
県総合文化センター(栃木県宇都宮市)
2013年5月22-24日

Hiroshi Tanaka, Koh-ichi Nakashiro,

Kazuki Iwamoto, Norihiko Tokuzen,

Yohei Fujita, Rikimaru Shirakawa,

Ryota Oka, Hiroyuki Goda, Hiroyuki

Hamakawa

Aurora kinase A as a novel therapeutic
target in oral squamous cell
carcinoma.

104th AACR Annual Meeting Washington
DC 2013.4. 6-10

〔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

田中 宏史(Tanaka, Hiroshi)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 80647371

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: