

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09338

研究課題名(和文) 機能性RNA解析に基づく頭頸部扁平上皮癌治療抵抗性獲得機序の探索

研究課題名(英文) Molecular signature of head and neck squamous cell carcinoma after treatment failure based on functional RNA analysis

研究代表者

関 直彦 (SEKI, NAHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50345013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌・マイクロRNA発現プロファイルから、癌組織で発現が抑制されている、miR-99a-5pおよびmiR-99a-3pに着目した。癌細胞株へこれらマイクロRNAを核酸導入すると、癌細胞の悪性が抑制された。次に、miR-99a-3pが制御する癌促進型遺伝子の探索を行い、10種類の遺伝子が患者の生命予後に関与している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮癌は、全ての癌種において6番目に多い癌であり、毎年65万人が新たに診断され、40万人以上が本疾患により亡くなる。最初の診断時において、既に、遠隔転移を有する症例にしばしば遭遇する。進行癌患者に対する治療法は限定的であり、生命予後は極めて厳しい。頭頸部扁平上皮癌患者に対する新規診断法、新規治療法の開発は急務である。

研究成果の概要(英文)：Based on our miRNA profile by RNA-sequencing in HNSCC, both strands of the miR-99a-duplex (miR-99a-5p: the guide strand, and miR-99a-3p: the passenger strand) are downregulated in cancer tissues. Ectopic expression assays showed that both miRNAs significantly inhibited cancer cell aggressiveness. Next, we screened miR-99a-3p regulated oncogenes involved in HNSCC pathogenesis. A total of 114 genes were identified as miR-99a-3p-regulated genes, and 10 genes (STAMPB, TIMP4, TMEM14C, CANX, SUV420H1, HSP90B1, PDIA3, MTHFD2, BCAT1, and SLC22A15) significantly predicted 5-year overall survival of the patients.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：マイクロRNA 頭頸部扁平上皮癌 miR-99a-5p miR-99a-3p マイクロRNA発現プロファイル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析研究の成果として、当初の予想を覆して、ヒトゲノムには、蛋白をコードしない蛋白非コード遺伝子 (non-coding RNA) が極めて多く転写されている事が判明した。マイクロ RNA は、small non-coding 遺伝子に分類される、1 本鎖 RNA 分子であり、僅か 19~22 塩基の RNA 分子として機能する。細胞内のマイクロ RNA の機能としては、配列依存的に標的遺伝子の 3'-UTR 領域に結合し、その標的遺伝子の翻訳を抑制する事や、分解を促進する事で、標的遺伝子の発現を負に制御する事である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロ RNA を起点とした解析から、頭頸部扁平上皮癌における癌分子ネットワークの探索を行い、診断や治療の標的分子を探索する事である。そのために以下の小目的を設定した。

- (1) RNA-シーケンスにより作成した、頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルから、癌抑制型マイクロ RNA を探索する事。
- (2) 癌抑制型マイクロ RNA が制御する分子を探索する事。
- (3) 癌抑制型マイクロ RNA が制御する分子の中から、頭頸部扁平上皮癌患者の分子病理に關与する分子を明らかにする事。
- (4) マイクロ RNA が制御する頭頸部癌新規癌促進遺伝子の機能解析

3. 研究の方法

- (1) 頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルに基づく、癌抑制型マイクロ RNA を探索

頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルから、癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA について、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いて、頭頸部扁平上皮癌患者について、マイクロ RNA の発現と予後について調べる。

頭頸部扁平上皮癌・癌細胞株 (FaDu および SAS) に、成熟型マイクロ RNA を核酸導入し、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を検討する。

- (2) 癌抑制型マイクロ RNA が制御する分子の探索

マイクロ RNA が結合する可能性のある遺伝子について、TargetScan database (release 7.2) を用いて探索する。

マイクロ RNA を癌細胞株に核酸導入後、RNA を抽出し、網羅的遺伝子解析を行い、マイクロ RNA により発現が抑制される遺伝子を探索する。

以上のデータを融合させ、マイクロ RNA が制御する可能性のある遺伝子についてリストを作成する。

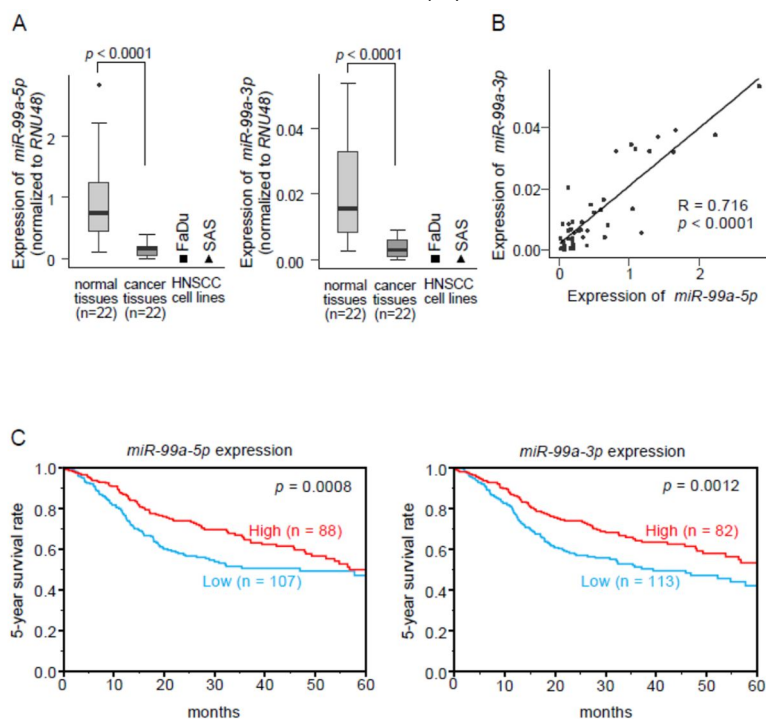
(3) マイクロ RNA が制御する遺伝子について、TCGA データベースを用いて、頭頸部扁平上皮癌患者について、遺伝子の発現と予後について調べる。

(4) マイクロ RNA が制御する頭頸部癌新規癌促進遺伝子の機能解析
頭頸部扁平上皮癌・癌細胞株 (FaDu および SAS) に、siRNA を核酸投入し、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を検討する。

4. 研究成果

(1) 頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルに基づく、癌抑制型マイクロ RNA を探索

頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルから、癌組織で発現が抑制されている miR-99a-5p および miR-99a-3p に着目した。TCGA 解析から、miR-99a-5p および miR-99a-3p の発現は、頭頸部扁平上皮癌検体において顕著に抑制されていた(A)。miR-99a-5p および miR-99a-3p の発現には正の相関がみとめられた(B)。また、miR-99a-5p および miR-99a-3p の発現を 2 群に分けて解析すると、これらマイクロ RNA の発現低下患者群は有意に予後不良 (5 年生存率) であった(C)。

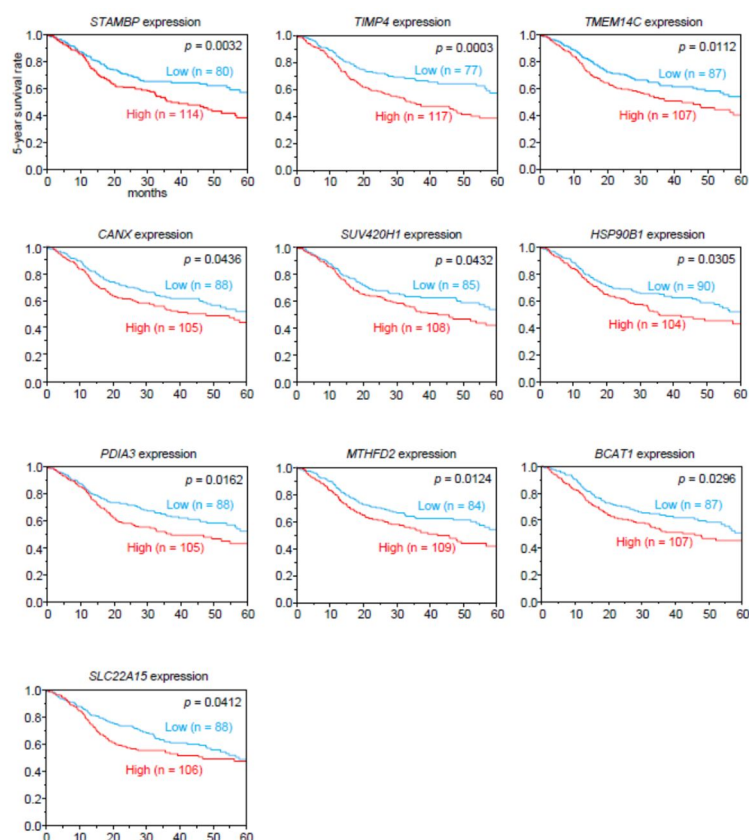


次に、miR-99a-5p および miR-99a-3p を、癌細胞株 (FaDu および SAS) に、核酸導入し、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能について検討を行った。miR-99a-5p および miR-99a-3p の核酸導入により、癌細胞の遊走能と浸潤能は著しく抑制された。以上の結果から、miR-99a-5p および miR-99a-3p は、頭頸部扁平上皮癌における癌抑制型マイクロ RNA である事を明らかにした。

(2) 癌抑制型マイクロ RNA が制御する分子の探索

(1) の解析から、miR-99a-5p および miR-99a-3p の癌抑制機能が明らかとなった。パッセンジャー鎖マイクロ RNA である miR-99a-3p についての報告は殆ど無いため、miR-99a-3p について、頭頸部扁平上皮癌における標的分子の探索を行った。miR-99a-3p の結合配列を有する遺伝子と、FaDu に、miR-99a-3p を核酸導入して発現が低下した遺伝子を融合させる事により、114 種類の遺伝子が miR-99a-3p 標的遺伝子候補となった。

(3) 頭頸部扁平上皮癌患者の分子病理に関与する miR-99a-3p 標的遺伝子の探索
癌抑制型 miR-99a-3p 標的遺伝子候補、114 種類について TCGA データベースを用いて、頭頸部扁平上皮癌患者の 5 年生存率を解析した。その結果、10 種類の遺伝子 (STAMBП、TIMP4、TMEM14C、CANX、SUV420H1、HSP90B1、PDIA3、MTHFD2、BCAT1、SLC22A15) の高発現が、患者の予後に影響を与えている事が明らかとなった。



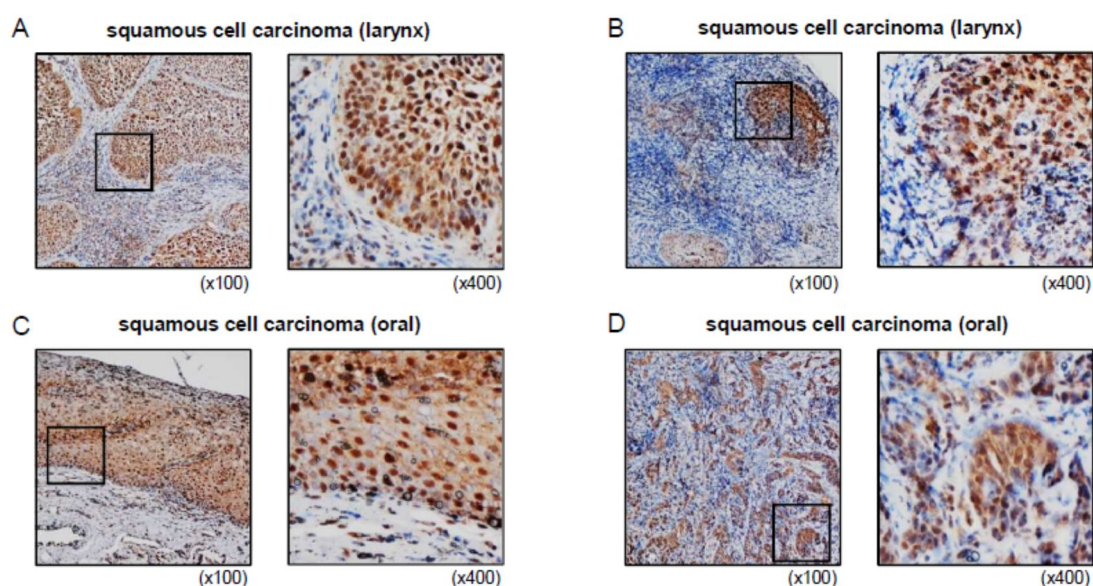
更に、多変量解析の結果、5 種類の遺伝子 (STAMBП、TIMP4、TMEM14C、CANX、SUV420H1) の発現は、独立した予後予測因子であった。

(4) 頭頸部扁平上皮癌における STAM binding protein (STAMBП) の機能解析
miR-99a-3p 核酸導入により、癌細胞の STAMBП の発現 (mRNA および蛋白) が、顕著に抑制された (A、B)。次に、STAMBП の発現が、miR-99a-3p により直接制御されているか、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイにより検証した。miR-99a-3p 結合配列を有したベク

ターと miR-99a-3p を癌細胞に導入すると、ルシフェラーゼ活性の顕著な抑制を認めた。しかしながら、miR-99a-3p 結合配列を有しないベクターと miR-99a-3p を癌細胞に導入した場合は、ルシフェラーゼ活性の抑制を認めなかった。このことから、STAMPB の発現は、miR-99a-3p により直接制御されている事が明らかとなった。

次に、STAMPB の機能を明らかにするために、siRNA を用いた解析を行った。si STAMPB を癌細胞株に核酸導入したところ、癌細胞の遊走能と浸潤能が著しく抑制された。

STAMPB の発現を頭頸部扁平上皮癌臨床検体で調べるため、免疫染色を施行した。その結果、STAMPB の発現は、頭頸部扁平上皮癌細胞の核に強く発現している事が明らかとなった(A-D)。以上の結果から、STAMPB は、頭頸部扁平上皮癌において、癌促進機能を有している事が明らかとなった。



(5) 研究のまとめ

頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルから、癌抑制型マイクロ RNA として、miR-99a-5p および miR-99a-3p を同定した。Pre-miR-99a から派生する miR-99a-5p (guide 鎖) および miR-99a-3p (passenger 鎖) の両方が癌抑制機能を有する事は新しい知見である。更に、癌抑制型マイクロ RNA である miR-99a-3p が制御する遺伝子を探索し、10 種類の遺伝子 (STAMPB、TIMP4、TMEM14C、CANX、SUV420H1、HSP90B1、PDIA3、MTHFD2、BCAT1、SLC22A15) の高発現が、患者の予後に影響を与えている事を明らかにした。これら遺伝子は、頭頸部扁平上皮癌の新規診断マーカー候補であり、治療標的分子である。癌細胞で異常な発現を呈するマイクロ RNA を起点とした、癌分子ネットワークの探索は、癌研究の新しい展開である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 15件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Okada Reona, Koshizuka Keiichi, Yamada Yasutaka, Moriya Shogo, Kikkawa Naoko, Kinoshita Takashi, Hanazawa Toyoyuki, Seki Naohiko | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Regulation of Oncogenic Targets by miR-99a-3p (Passenger Strand of miR-99a-Duplex) in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 1535 ~ 1535 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8121535 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Uchida Akifumi, Seki Naohiko, Mizuno Keiko, Yamada Yasutaka, Misono Shunsuke, Sanada Hiroki, Kikkawa Naoko, Kumamoto Tomohiro, Suetsugu Takayuki, Inoue Hiromasa | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Regulation of KIF2A by Antitumor miR-451a Inhibits Cancer Cell Aggressiveness Features in Lung Squamous Cell Carcinoma | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 258 ~ 258 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11020258 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Shimonosono Masataka, Idichi Tetsuya, Seki Naohiko, Yamada Yasutaka, Arai Takayuki, Arigami Takaaki, Sasaki Ken, Omoto Itaru, Uchikado Yasuto, Kita Yoshiaki, Kurahara Hiroshi, Maemura Kosei, Natsugoe Shoji | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 Molecular pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma: Identification of the antitumor effects of miR-145?3p on gene regulation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Oncology | 6. 最初と最後の頁 637 ~ 688 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4657 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Uchida Akifumi, Seki Naohiko, Mizuno Keiko, Misono Shunsuke, Yamada Yasutaka, Kikkawa Naoko, Sanada Hiroki, Kumamoto Tomohiro, Suetsugu Takayuki, Inoue Hiromasa | 4. 巻 110 |
| 2. 論文標題 Involvement of dual-strand of the miR-144 duplex and their targets in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 420 ~ 432 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13853 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Misono Shunsuke, Seki Naohiko, Mizuno Keiko, Yamada Yasutaka, Uchida Akifumi, Sanada Hiroki, Moriya Shogo, Kikkawa Naoko, Kumamoto Tomohiro, Suetsugu Takayuki, Inoue Hiromasa | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Molecular Pathogenesis of Gene Regulation by the miR-150 Duplex: miR-150-3p Regulates TNS4 in Lung Adenocarcinoma | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 601 ~ 601 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11050601 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Koshizuka Keiichi, Hanazawa Toyoyuki, Kikkawa Naoko, Katada Koji, Okato Atsushi, Arai Takayuki, Idichi Tetsuya, Osako Yusaku, Okamoto Yoshitaka, Seki Naohiko | 4. 巻 45 |
| 2. 論文標題 Antitumor miR-150-5p and miR-150-3p inhibit cancer cell aggressiveness by targeting SPOCK1 in head and neck squamous cell carcinoma | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx | 6. 最初と最後の頁 854 ~ 865 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2017.11.019 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Suetsugu Takayuki, Koshizuka Keiichi, Seki Naohiko, Mizuno Keiko, Okato Atsushi, Arai Takayuki, Misono Shunsuke, Uchida Akifumi, Kumamoto Tomohiro, Inoue Hiromasa | 4. 巻 52 |
| 2. 論文標題 Downregulation of matrix metalloproteinase 14 by the antitumor miRNA, miR-150-5p, inhibits the aggressiveness of lung squamous cell carcinoma cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Oncology | 6. 最初と最後の頁 913 ~ 924 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2017.4232 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamada Yasutaka, Koshizuka Keiichi, Hanazawa Toyoyuki, Kikkawa Naoko, Okato Atsushi, Idichi Tetsuya, Arai Takayuki, Sugawara Sho, Katada Koji, Okamoto Yoshitaka, Seki Naohiko | 4. 巻 52 |
| 2. 論文標題 Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MYO1B in head and neck squamous cell carcinoma | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Oncology | 6. 最初と最後の頁 166 ~ 178 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2017.4190 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Tanaka Takako, Okada Reona, Hozaka Yuto, Wada Masumi, Moriya Shogo, Satake Souichi, Idichi Tetsuya, Kurahara Hiroshi, Ohtsuka Takao, Seki Naohiko | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Molecular Pathogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Impact of miR-30c-5p and miR-30c-2-3p Regulation on Oncogenic Genes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 2731 ~ 2731 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102731 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Mizuno Keiko, Tanigawa Kengo, Nohata Nijiro, Misono Shunsuke, Okada Reona, Asai Shunichi, Moriya Shogo, Suetsugu Takayuki, Inoue Hiromasa, Seki Naohiko | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 FAM64A: A Novel Oncogenic Target of Lung Adenocarcinoma Regulated by Both Strands of miR-99a (miR-99a-5p and miR-99a-3p) | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 2083 ~ 2083 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9092083 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Shimomura Hiroki, Okada Reona, Tanaka Takako, Hozaka Yuto, Wada Masumi, Moriya Shogo, Idichi Tetsuya, Kita Yoshiaki, Kurahara Hiroshi, Ohtsuka Takao, Seki Naohiko | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Role of miR-30a-3p Regulation of Oncogenic Targets in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Pathogenesis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 6459 ~ 6459 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186459 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Wada Masumi, Goto Yusuke, Tanaka Takako, Okada Reona, Moriya Shogo, Idichi Tetsuya, Noda Masahiro, Sasaki Ken, Kita Yoshiaki, Kurahara Hiroshi, Maemura Kosei, Natsugoe Shoji, Seki Naohiko | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 RNA sequencing-based microRNA expression signature in esophageal squamous cell carcinoma: oncogenic targets by antitumor miR-143-5p and miR-143-3p regulation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Human Genetics | 6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1034 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0795-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kawagoe Kosuke, Wada Masumi, Idichi Tetsuya, Okada Reona, Yamada Yasutaka, Moriya Shogo, Okubo Keishi, Matsushita Daisuke, Arigami Takaaki, Kurahara Hiroshi, Maemura Kosei, Natsugoe Shoji, Seki Naohiko | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Regulation of aberrantly expressed SERPINH1 by antitumor miR-148a-5p inhibits cancer cell aggressiveness in gastric cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Human Genetics | 6. 最初と最後の頁 647 ~ 656 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0746-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamada Yasutaka, Nohata Nijiro, Uchida Akifumi, Kato Mayuko, Arai Takayuki, Moriya Shogo, Mizuno Keiko, Kojima Satoko, Yamazaki Kazuto, Naya Yukio, Ichikawa Tomohiko, Seki Naohiko | 4. 巻 111 |
| 2. 論文標題 Replisome genes regulation by antitumor miR 101 5p in clear cell renal cell carcinoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 1392 ~ 1406 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14327 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Toda Hiroko, Seki Naohiko, Kurozumi Sasagu, Shinden Yoshiaki, Yamada Yasutaka, Nohata Nijiro, Moriya Shogo, Idichi Tetsuya, Maemura Kosei, Fujii Takaaki, Horiguchi Jun, Kijima Yuko, Natsugoe Shoji | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 RNA sequence based microRNA expression signature in breast cancer: tumor suppressive miR 101 5p regulates molecular pathogenesis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Oncology | 6. 最初と最後の頁 426 ~ 446 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12602 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|