

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K09863

研究課題名(和文) 機能性RNAを起点とした治療抵抗性頭頸部扁平上皮癌のドラッグリポジジョン戦略

研究課題名(英文) Drug repositioning strategy of head and neck squamous cell carcinoma after treatment failure based on microRNA analysis

研究代表者

吉川 直子(Kikkawa, Naoko)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：50400924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：治療抵抗性を獲得した頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)の臨床検体から、マイクロRNA発現プロファイルを作成した。プロファイルに基づき、癌組織で発現が抑制されているmiR-199-familyに着目した。マイクロRNAの機能解析から、これらマイクロRNAは、癌抑制型マイクロRNAである事を明らかにした。これらマイクロRNAが制御する遺伝子としてPaxillin(PXN)を見出した。PXNは、HNSCC臨床検体で高発現している事を確認した。TCGAデータベース解析から、その発現は患者の予後に影響を与えている事を明らかにした。更に、PXNの発現異常は、癌細胞の遊走能や浸潤能を促進す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(HNSCC)の初回治療後の、再発症例・遠隔転移症例の予後は極めて不良であり、平均生存期間は、数ヶ月とされている。HNSCC細胞が治療過程に獲得した再発・遠隔転移(治療抵抗性)に関わる分子経路の解明や新規治療法の開発が急務である。今回、治療抵抗性HNSCCの臨床検体におけるマイクロRNA発現プロファイルを起点とした解析により、癌抑制型マイクロRNAと標的癌促進型遺伝子を含む、新規分子経路を明らかにすることができた。新規治療法の開発に向けて有用な情報を得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA expression profile was created using clinical specimens of Head and neck squamous cell carcinoma(HNSCC) treatment failure. Analysis of the profile revealed that member of miR-199-family were downregulated in HNSCC tissues. Ectopic expression assays showed that these miRNAs significantly inhibited cancer cell aggressiveness. Our in silico analysis and luciferase reporter assay identified paxillin (PXN) as a direct target of miR-199-family in HNSCC cells. Overexpression of PXN was detected in HNSCC clinical specimens by immunostaining. Analysis of the cancer genome atlas (TCGA) database showed that expression of PXN significantly predicted a worse prognosis (5-year overall survival rate;  $p = 0.0283$ ). Furthermore, functional assays in HNSCC cells showed that knockdown of PXN expression attenuated cancer cell migration and invasion, suggesting that aberrant expression of PXN contributed to HNSCC cell aggressiveness.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 マイクロRNA miR-199

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトの成果で、蛋白をコードしないものの、転写されて機能する RNA 分子 (機能性 RNA) が判明した。マイクロ RNA は、機能性 RNA の 1 種であり、19~23 塩基程度の 1 本鎖 RNA 分子である。マイクロ RNA の特徴は、1 種類のマイクロ RNA が、極めて多くの蛋白コード遺伝子の発現を制御している事である。そのため、マイクロ RNA の発現異常が、細胞内の RNA ネットワークの破綻を惹起する事は容易に想像できる。癌細胞においては、様々な癌種において、マイクロ RNA の発現異常が報告されている。頭頸部癌扁平上皮癌 (HNSCC) においても、癌の増殖や転移、薬剤耐性に関与するマイクロ RNA が同定されてきており、癌細胞で発現異常を示すマイクロ RNA の機能解析と、マイクロ RNA が制御する分子ネットワークの探索が精力的に行われている。

### 2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 初回治療後の、再発および遠隔転移症例の予後は極めて不良であり、その治療抵抗性に関わる分子経路の解明・新規治療法の開発が急務である。本研究では、治療抵抗性 HNSCC・マイクロ RNA 発現プロファイルに基づき、癌抑制型マイクロ RNA とマイクロ RNA が制御する癌促進型遺伝子を探索し、診断や治療の新規標的分子を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 治療抵抗性頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)・マイクロ RNA 発現プロファイルより癌抑制型マイクロ RNA を探索

治療抵抗性 HNSCC・臨床検体 (初回治療後の再発症例) から RNA シークエンスにより作成したマイクロ RNA 発現プロファイルに基づき、癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA の中から、癌抑制型マイクロ RNA の候補を抽出する。

(2) 癌抑制型マイクロ RNA 候補の機能解析

癌抑制型の候補マイクロ RNA につき、HNSCC 患者における発現について、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いて調べる。

HNSCC・癌細胞株に、候補マイクロ RNA を核酸導入し、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を検討し、癌抑制機能を検討する。

(3) 癌抑制型マイクロ RNA が制御する遺伝子の探索

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) を用いて探索し、マイクロ RNA が制御する候補遺伝子とする。TCGA データベースを用いて、HNSCC 患者について、遺伝子の発現と予後について調べる。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し、候補遺伝子を絞り込む。

(4) (癌抑制型マイクロ RNA が制御する) HNSCC 新規癌促進型遺伝子の機能解析

HNSCC・癌細胞株に、small interfering RNA (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) 治療抵抗性頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)・マイクロ RNA 発現プロファイルの作成

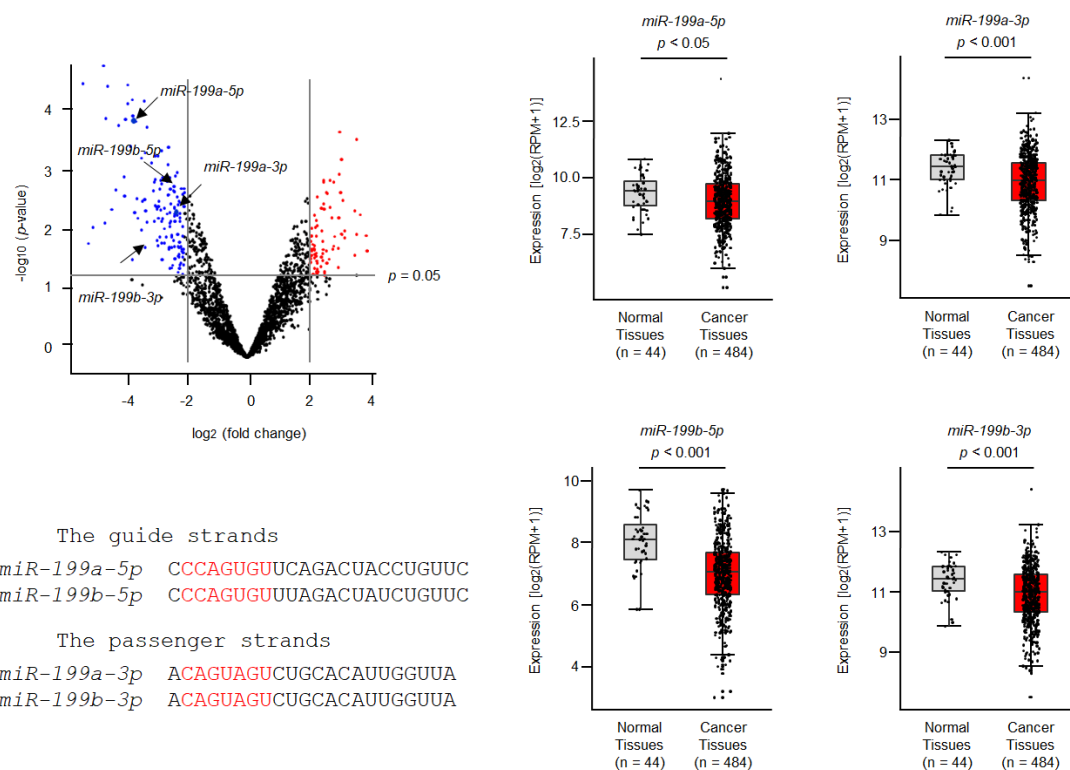
治療抵抗性 HNSCC 臨床検体から、RNA シークエンスにより、マイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。プロファイルの解析から、112 種類のマイクロ RNA が癌組織で有意に発現抑制されてい

た ( $\log_2$  fold change  $< 2.0$  and  $p$ -value  $< 0.05$ )。興味ある事に、9種類のマイクロRNAは、ガイド鎖とパッセンジャー鎖の両方が共に発現抑制されていた(miR-1、miR-30a、miR-483、miR-99a、miR-139、miR-190a、miR-199b、miR-204、miR-378a)。一般的に、マイクロRNAのパッセンジャー鎖は、細胞質で分解されて機能を有しないとされていたが、これまでの我々の解析では、miR-99a-3pやmiR-139-3pなどのパッセンジャー鎖は、癌抑制型マイクロRNAとして機能している事を明らかにしている。

## (2) 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の探索

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-199-familyに着目した。TCGAデータベース解析から、miR-199-family(miR-199a-5p/miR-199a-3p/miR-199b-5p/miR-199b-3p)の発現は、HNSCC臨床検体(正常組織44検体、癌組織484検体)において、癌組織で有意に抑制されている事を確認した。

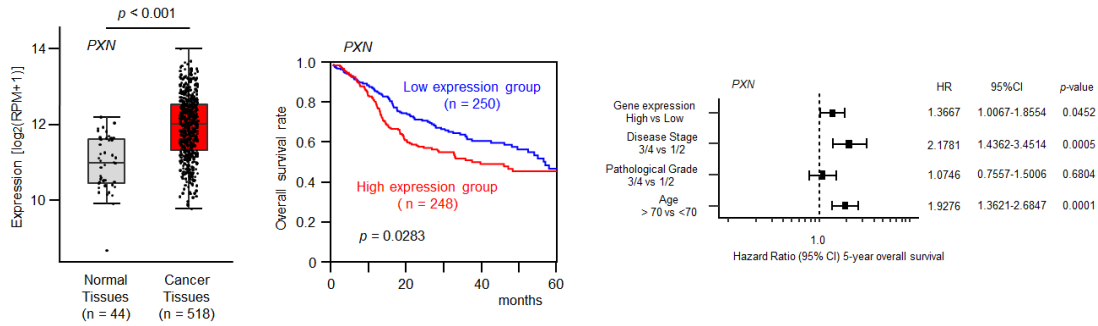
次に、miR-199a/b-5pおよびmiR-199a/b-3pを、癌細胞株(Sa3およびSAS)に、核酸導入し、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能について検討を行った。miR-199a/b-5pおよびmiR-199a/b-3pの核酸導入により、癌細胞の遊走能と浸潤能は著しく抑制された。以上の結果から、miR-199-familyは、HNSCCにおける癌抑制型マイクロRNAである事を明らかにした。



## (3) 癌抑制型マイクロRNA(miR-199-family)が制御する癌促進型遺伝子の探索

miR-199-familyが共通して制御する癌促進型遺伝子の探索を行った。

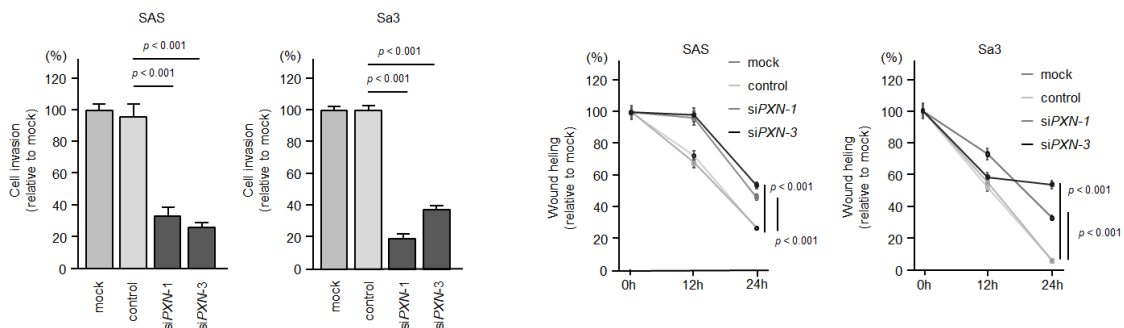
TargetScanデータベース検索から、miR-199a/b-5pが結合する配列を有する遺伝子として、634種の遺伝子を、miR-199a/b-3pが結合する配列を有する遺伝子として、474種の遺伝子を見出した。この中で、miR-199a/b-5pおよびmiR-199a/b-3pの両方マイクロRNAの結合配列を有する遺伝子は68種類であった。



これらのうち、TCGA データベース解析から、12 種類の遺伝子は、HNSCC 癌組織で正常組織に比べ、有意に発現が上昇していた。更に、遺伝子の発現と HNSCC 患者の予後を調べた結果、PXN (Paxillin) の発現は、患者の予後 (5 年生存率) に影響を与えていた。また、多変量解析において、独立した予後予測因子であった。

#### ( 4 ) HNSCC 癌細胞株における PXN の機能解析

siRNA を HNSCC 細胞株に核酸導入し、PXN の発現をノックダウンし、癌細胞の増殖能、浸潤能、遊走能について解析を行った。その結果、PXN をノックダウンする事で、癌細胞の遊走能と浸潤能が顕著に抑制された。この事から、PXN の発現異常は、HNSCC の悪性化に関与している事が明らかとなった。



#### ( 5 ) 研究のまとめ

頭頸部扁平上皮癌のマイクロ RNA 発現プロファイルから、miR-199-family が、癌組織で有意に発現抑制されている事を認めた。miR-199-family の癌抑制機能と、これらマイクロ RNA が制御する癌遺伝子の探索を行った。

TCGA 解析の結果、miR-199-family は、HNSCC 臨床検体で有意に発現抑制されている事を確認した。マイクロ RNA を核酸導入する機能解析の結果、miR-199a/b-5p および miR-199a/b-3p は、癌細胞の遊走能・浸潤能を制御する癌抑制型マイクロ RNA である事が判明した。これらマイクロ RNA が制御する遺伝子として、68 種類の候補遺伝子を見出した。これら遺伝子の中で、PXN は臨床検体で高発現しており、更にその発現は、HNSCC 患者の予後に影響を与えていた (5-year OS, p=0.0283)。PXN をノックダウンする事により、癌細胞の遊走能・浸潤能が顕著に抑制された。現在、PXN の発現を阻害する低分子化合物の探索 (ドラッグ・リポジション) を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6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 Oshima Sachi, Asai Shunichi, Seki Naohiko, Minemura Chikashi, Kinoshita Takashi, Goto Yusuke, Kikkawa Naoko, Moriya Shogo, Kasamatsu Atsushi, Hanazawa Toyoyuki, Uzawa Katsuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of Tumor Suppressive Genes Regulated by miR-31-5p and miR-31-3p in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6199 ~ 6199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22126199	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 Koma Ayaka, Asai Shunichi, Minemura Chikashi, Oshima Sachi, Kinoshita Takashi, Kikkawa Naoko, Koshizuka Keiichi, Moriya Shogo, Kasamatsu Atsushi, Hanazawa Toyoyuki, Uzawa Katsuhiro, Seki Naohiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Impact of Oncogenic Targets by Tumor-Suppressive miR-139-5p and miR-139-3p Regulation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9947 ~ 9947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22189947	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 Nozomi, Minemura Chikashi, Asai Shunichi, Kikkawa Naoko, Kinoshita Takashi, Oshima Sachi, Koma Ayaka, Kasamatsu Atsushi, Hanazawa Toyoyuki, Uzawa Katsuhiro, Seki Naohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of miR-199-5p and miR-199-3p Target Genes: Paxillin Facilitates Cancer Cell Aggressiveness in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1910 ~ 1910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12121910	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 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
研究 分 担 者	関 直彦  (Seki Naohiko)  (50345013)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授   (12501)	
研究 分 担 者	花澤 豊行  (Hanazawa Toyoyuki)  (90272327)	千葉大学・大学院医学研究院・教授   (12501)	

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
---------	---------