

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06322・19K21406

研究課題名(和文) BRD4、EGFR発現口腔がんにおけるmiR-3140の治療応用性の検討

研究課題名(英文) Examination of the potential for miR-3140 therapy in BRD4, EGFR expressing oral cancer

研究代表者

外内 えり奈 (Tonouchi, Erina)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：50826831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA(miRNA)は複数の標的遺伝子を抑制する効果を持つ短いnon-coding RNAであり、がん抑制型miRNAの補充療法は、新しいがん治療戦略となる可能性を有する。miR-3140は、口腔がん分子標的治療薬の標的となっているEGFRや、頭頸部がん細胞株においても治療標的の可能性を有すると報告がなされているBRD4を直接的に抑制することが可能である。実際に、口腔がん細胞株HOC313にmiR-3140を導入することでがん細胞増殖抑制効果を示した。miR-3140は核酸医薬のシーズとして有用な可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がん治療は、手術療法を基本とし、一方で化学療法は治療標的となるマーカー遺伝子の同定が他のがん種と比較すると進んでおらず、標準治療として古典的な殺細胞性抗がん剤の使用を継続している。miRNAは、複数の標的遺伝子を抑制する機能を持つため、口腔がんにとって重要な経路の遺伝子を複数抑制することができれば、がんを多角的に制御可能となる可能性がある。miR-3140はEGFRやBRD4などがん遺伝子を直接抑制する機能を持ち、miRNA 核酸医薬への治療応用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA(miRNA) is a non-coding RNA which suppresses multiple target genes. The replacement therapy for tumor suppressor miRNA has the potential to become a new cancer treatment strategy. MiR-3140 directly suppresses EGFR, which is already targeted of molecular targeted therapeutic for oral cancer, and BRD4, which has reported to have potential therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. In fact, the tumor cell progression in HOC313 was downregulated by transfected with miR-3140. It is candidate for the development of miRNA-based cancer therapeutics for oral cancer.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔がん microRNA

1. 研究開始当初の背景

口腔がん治療は、手術療法を基本としているが、審美面、咀嚼嚥下や構音等の機能面から、可能な限りの切除範囲の縮小が求められる。一方、化学療法としては治療標的となるマーカー遺伝子の同定が他のがん種と比較すると進んでおらず、標準治療として古典的な殺細胞性抗がん剤の使用を継続している。microRNA(miRNA) は、22塩基対程度の短いnon-coding RNAであり、複数の標的遺伝子に結合し、その遺伝子の翻訳抑制機能を持つ。がんにおいてはがん抑制型miRNAがメチル化異常などにより機能不全となる傾向にあり、がん抑制型miRNAを補充するようなmiRNA核酸医薬が注目されている。口腔がんにとって重要な経路の遺伝子を複数抑制することができれば、がんを多角的に制御可能となる可能性がある。本研究では、口腔がんにおける遺伝子の発現状態を評価し、治療標的となり得る分子の同定と、miRNAを用いた抗がん核酸医薬の適応を評価する。

2. 研究の目的

これまでに、膵臓がん細胞株と1090種のmiRNAを搭載したmiRNAライブラリーを用いた、がん抑制型miRNAライブラリースクリーニングを施行し、新規がん抑制型miRNAとして*miR-3140*を同定した。さらに、*miR-3140*を膵臓がん細胞株や他臓器がん細胞株に*in vitro*で導入し、多種のがんでがん細胞増殖抑制効果を示した。さらにこのmiRNAは、MYC等がん遺伝子の転写を亢進させる*BRD4*や*BRD3*、現在口腔がんにおける分子標的治療薬の標的遺伝子として適応がある*EGFR*、細胞周期の亢進に関連する*CDK2*を標的遺伝子とすることから、複合的な効果が期待できる可能性がある。そこで、口腔がんにおける標的遺伝子の発現状態を評価し、層別化を行うことにより、*miR-3140*が新規がん核酸医薬のシーズとなりえるかを検討し、核酸医薬への発展を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

口腔がんは、その90%程度は扁平上皮癌であり、遺伝的背景として体細胞変異の蓄積が見られ、多様な遺伝子変異を有し、治療標的となる遺伝子の同定や治療応用が限定されてしまっている現実がある。このような遺伝的背景を分析するべく、多次元的ながんゲノムデータが集約されている、公共データベースであるcBioPortal for Cancer Genomics (<https://www.cbioportal.org/>)を用い、頭頸部扁平上皮癌において*miR-3140*の標的遺伝子である、*BRD4*、*BRD3*、*EGFR*、*CDK2*の遺伝子変異や増幅などを検索した。また、実際に口腔がん細胞株に*miR-3140*を*in vitro*で導入し、がん細胞増殖への影響をWST-8 assayで細胞数の評価を行った。

4. 研究成果

公共データベースであるcBioPortal for Cancer Genomicsを用い、*miR-3140*の標的遺伝子である、*BRD4*、*BRD3*、*EGFR*、*CDK2*の遺伝子異常を、頭頸部扁平上皮癌臨床検体において検索した(Cancer Genome Atlas Network, Nature. 2015 Jan 29;517(7536):576-82.)。 *BRD4*、*BRD3*、*EGFR*、*CDK2*はいずれも10%、12%、23%、6%で遺伝子異常を有していた(図1)。いずれも遺伝子増幅や、mRNA Upregulationがそのほとんどを占め、これらがん遺伝子は口腔がんにおいても、悪性化に寄与している可能性が示唆された。また、いずれの遺伝子変化も同一の症例に多発することは少なく、*miR-3140*単独で直接的に4遺

伝子を抑制することができることを考慮すると、それぞれの症例で重要な経路が異なっているにもかかわらず、複合的に制御可能な可能性が考えられた。

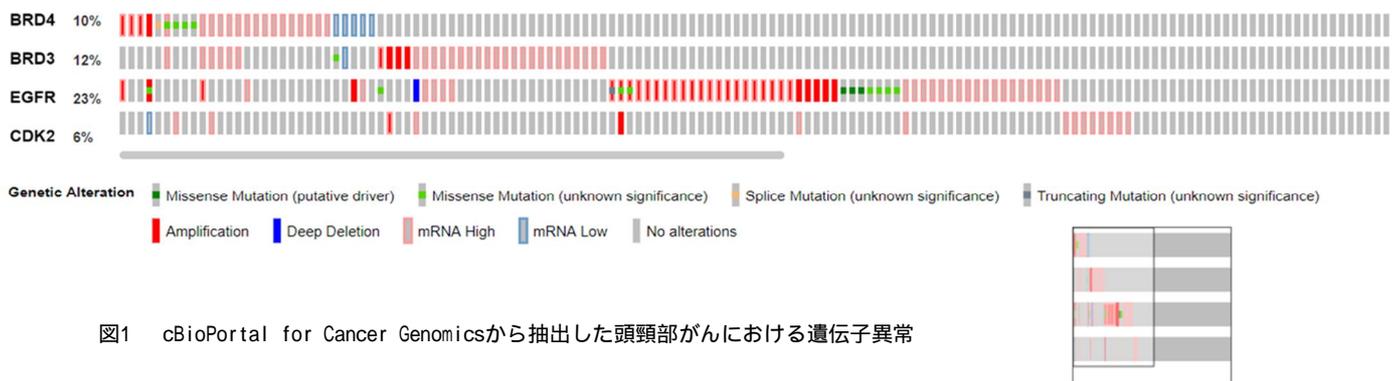
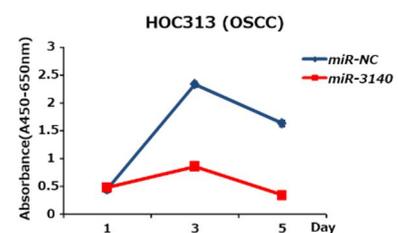


図1 cBioPortal for Cancer Genomicsから抽出した頭頸部がんにおける遺伝子異常

図2 miR-3140 導入によるがん細胞増殖への影響

次に、口腔がん細胞株にmiR-3140を*in vitro*で導入し、がん細胞増殖にどのように影響するかをWST-8 assay で評価した。浸潤性が高く高悪性度の口腔がん由来の細胞株であるHOC313を用いて評価を行った。HOC313細胞株にmiR-3140を10nMで導入すると、著明な細胞増殖抑制を認め



た(図2)。今後は、他の細胞株で確認できたように、miR-3140を導入した際に標的遺伝子の発現が低下し、下流遺伝子の発現も低下することを口腔がん細胞株においても確認する。また、miR-3140標的遺伝子を口腔がん細胞株においてsiRNAでノックダウンすることにより、口腔がん細胞株での各遺伝子の細胞増殖への影響を評価したい。また、複数の遺伝子に対するsiRNAを同時に導入することで、複数の経路を同時に遮断し、miR-3140導入時と同様の挙動を示すか評価する。もし、既知標的遺伝子のノックダウンではmiR-3140ほどの強い効果が見られないのであれば、miR-3140に未知の重要な標的がん遺伝子が存在する可能性があるため、探索を行う。

また、臨床応用を困難としている理由として、通常体内に取り込まれたmiRNAは、非常に不安定で速やかに分解されてしまうことが挙げられる。核酸医薬を現実化させるためには、最適なDrug Delivery Systemの開発が必須である。その際に、がん細胞に選択的に取り込まれれば、薬剤の効果も強く期待できる上、正常細胞への影響も最小限に留められる。口腔がんは、その特徴として視診、触診が可能な位置に生じることが多く、静脈内投与だけでなく、局所注射や局所塗布薬への応用も望まれる。今後の検討課題として非常に重要な検討事項であるため、継続して探索を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------