

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592011

研究課題名 (和文)

下咽頭癌の遠隔転移を引き起こす神経ペプチドシグナルの解明

研究課題名 (英文)

Role of Neuropeptide Signals Induced Metastasis of Hypopharyngeal Cancer

研究代表者

花澤 豊行 ( HANAZAWA TOYOYUKI )

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90272327

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、下咽頭癌臨床検体を用いた遺伝子発現解析から遠隔転移に関わる遺伝子として、神経ペプチドであるニューロテンシン (NT) と、NT のレセプターであるニューロテンシンレセプター (NTR) を選択した。NT-NTR のシグナルが下咽頭癌細胞の転移に IL8 や MMP1 を介して、重要な役割を担っている事を証明した。下咽頭癌の遠隔転移に関わるパスウェイの解明と共に、これら遺伝子の発現制御メカニズムを解明する為、新しい概念であるマイクロ RNA (miRNA) の解析を行った。発現が抑制されている miRNA を下咽頭癌細胞に導入する事により転移や浸潤を抑える事を見出した。NT-NTR の発現亢進にはこれら miRNA の関与があると考えられ、下咽頭癌においては NT-NTR シグナルを介して IL8 や MMP の発現が誘導される事がはじめて証明された。

研究成果の概要 (英文)：

Distant metastasis is a major factor associated with poor prognosis in hypopharyngeal squamous cell carcinomas (HSCC), but little is known of its molecular mechanisms. New markers that predict clinical outcome, in particular the ability of primary tumors to develop metastatic tumors, are urgently needed. We narrowed our focus to the analysis of the neurotensin (NT) and neurotensin receptor (NTR) oncogenic signal pathways. In HSCC cells, which expressed NTR, a NT agonist promoted cellular invasion, migration and induction of several mRNAs, such as interleukin 8 and matrix metalloproteinase 1 transcripts. Our findings suggest a critical role for the NT and NTR oncogenic pathways in invasion and migration of HSCC cells during the metastatic process. Our study raises the possibility that NT and NTR could be a useful predictive marker of poor prognosis in patients with HSCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：下咽頭癌、ゲノム、神経ペプチド、マイクロ RNA、遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の統計によれば、口唇、口腔及び咽頭の悪性新生物による死亡数は30年間で3.7倍に増加している<sup>1)</sup>。特に下咽頭癌は、早期に症状が出現しにくいため、一次治療の症例のおよそ9割が進行癌(IV期)であり、IV期症例の5年生存率は30%程度と報告され、頭頸部癌の中で最も予後不良な癌腫である<sup>2)</sup>。この下咽頭進行癌に対する治療課題は、局所制御と機能温存、そして遠隔転移の制御である。現在、局所制御と機能温存に関しては、多数の施設において化学療法と放射線治療を同時併用することにより、数々の工夫がなされ、生存率の向上の兆しが得られ始めている。しかし、下咽頭進行癌症例の死因の多くは、やはり遠隔転移であり、この制御なしでは、さらなる生存率の改善にはつながらないことは明白である。

このような背景の中我々は、21世紀COEプログラム「消化器扁平上皮癌、最先端多戦略治療拠点形成」の中で、下咽頭癌の臨床検体を用いた遺伝子発現解析や染色体構造異常解析、更にはmicroRNA解析などのゲノム解析を精力的に展開してきた。この解析から、下咽頭癌の転移や再発にはさまざまな神経ペプチドが重要な関与をしていることを見出し報告してきた。例えば、13アミノ酸で構成される神経ペプチド・Neurotensin (NTS) は下咽頭癌患者で発現していることが発現解析から明らかとなった。また、この遺伝子が高発現している患者は再発までの時間が意に短いことが示された。

また、染色体11q13領域のゲノム構造異常解析から、ゲノムの増幅領域に存在して発現が亢進している神経ペプチド・Galaninを見出した。更に興味深いことに、癌細胞では、増殖抑制に寄与するレセプター・GalR1の発現が低下しており、ここにGalaninとGalR1

の関与がはじめて示された。このように、これまで下咽頭癌との関与が全く未知な神経ペプチドについて焦点を絞りその下流シグナルを探ることは、これまで知られていない下咽頭進行癌の遠隔転移の分子メカニズムに迫るものと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 神経ペプチドが癌細胞に作用し増殖や浸潤に関わるか検討する。

我々はこれまでに、下咽頭癌臨床検体を用いた網羅的なゲノム解析を行ってきた。その結果、Neurotensin (NTS) やGalanin (GAL) といった神経ペプチドが高発現していることは判明した。臨床検体においてNTSが高発現している患者群では有意に遠隔転移を起すまでの期間が短く、この神経ペプチドが、遠隔転移に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。また、データベース検索から、NTSの標的レセプターとして、7回膜貫通型のレセプターであるNeurotensin receptor 1-3 (NTR1-3)が存在することが、GALのレセプターとして同じく、7回膜貫通型のレセプターであるGALR1-3が存在することが報告されている。これまでに、我々は扁平上皮癌由来細胞株HSC3に対して、NTSのアゴニストを作用させることにより、癌細胞の浸潤能が増進することを見出している。

また、臨床検体や細胞株の検討では、GALのレセプターの一つであるGALR1は発現が抑制されていることが判明している。

本研究では、まず始めに、神経ペプチドとその標的となるレセプターの関係を明らかにし、これら相互作用と癌細胞の増殖・浸潤との関係を明らかにする。

(2) NTSおよびGALの下流シグナルの探索  
癌の増殖・浸潤には多くの遺伝子の関与があることは明らかであり、どのようなシグナル伝達のもとに、増殖・浸潤が引き起され

るかを解明することは、その後の治療標的を  
探る上で重要である。これまでの検討では、  
浸潤や転移に関与することが報告されてい  
る MMP 遺伝子群が NTS の下流で発現誘導され  
ることを見出している。本研究では、それぞ  
れのレセプターごとにどのような下流シグ  
ナルが存在するか、網羅的な遺伝子発現解析  
を用いて検討する。また、癌細胞で示された  
現象が臨床検体で起こっているか検討する。

(3) 癌の増殖や浸潤を抑制する標的遺伝子  
を用いた治療法の開発

先述の2つの研究を受けて、どの遺伝子を  
どのような方法でブロックした場合（低分子  
の化合物、中和抗体や siRNA など）効率よく  
癌の増殖や浸潤を抑えることができるか検  
討を行う。

### 3. 研究の方法

これまでの解析データから、NTS とそのレ  
セプター NTR1・-2・-3、GAL とそのレセプ  
ター GAL1R・2R・3R に焦点を絞り、レセプ  
ターを介するすぐなる伝達の解明と癌の増殖・浸  
潤の関係を明らかにする。更に、これらシグ  
ナルパスイェの解明から治療の標的とな  
る分子の探索を行う。

(1) 神経ペプチドが癌細胞に作用し増殖や  
浸潤に関わるか検討する。

本実験に適した細胞株を選択するため、今  
回注目する神経ペプチド (NTS、GAL) 2 遺伝  
子とそれぞれのレセプター 6 種類について、  
使用する癌細胞株における発現状態を遺伝  
子およびタンパク質レベルで調べた。また、  
神経ペプチドおよびそれぞれのレセプター  
の発現を抑える siRNA を設計し、発現が抑制  
されることを確かめた。これまでに、口腔扁  
平上皮癌細胞株 HSC2 および HSC3 については  
予備的検討を行っており、HSC3 においては  
NTS の発現が低いことを確かめている。また、  
NTS、NTSR1 については、siRNA を用いた遺伝

子抑制実験が済みであり、いずれの細胞にお  
いても 80%以上の抑制効果を得ている。

発現抑制が可能な siRNA の設計および条件  
が整った段階で、神経ペプチドとレセプター  
を組み合わせ、癌細胞の増殖能や浸潤能につ  
いて検討を行った。増殖能測定には MTT 法を  
浸潤能測定にはマトリジェルを用いたイン  
ベンジョンアッセイを行った。

(2) NTS および GAL の下流シグナルの探索

先述 (1) の実験で、神経ペプチドおよ  
びそれぞれのレセプターの発現を抑制でき  
れば、それぞれのレセプターのみを介したシ  
グナル伝達の機構が解明できる。例えば、NTS  
が発現している細胞株で、NTSR2 または NTSR3  
の発現を抑制すれば、NTS-NTSR1 特異的なシ  
グナル伝達の観察が可能である。更に NTS に  
ついて抑制を行い、合成アミノ酸やアゴニ  
ストを加えれば濃度依存的な解析が可能で  
ある。これまでの検討で、NRS-NTSR1 の下流  
シグナルに MMP1 や MMP13 が存在すること  
を明らかにしている。本研究では、更に下流シ  
グナルについて網羅的な遺伝子発現解析を  
行い、それぞれのレセプターを介したパス  
ウェイを明らかにする。

さらに得られた情報については臨床検体  
においても同様の現象が起こっているか、臨  
床検体を用いて検証した。方法は、免疫染色  
と PCR を用いた遺伝子発現を検討した。

(3) 癌の増殖や浸潤を抑制する標的遺伝子  
を用いた治療法の開発

(1) および (2) の研究から神経ペプチ  
ド (NTS、GAL) がどのレセプターを通してど  
のようなシグナルを入れているのか解明し  
た後、増殖や浸潤を抑えるためには、どの分  
子を標的として、どのような方法で抑制し  
たら最適かを検討した。

また、これら神経ペプチドとレセプターが、  
癌細胞の増殖や浸潤に正のシグナルを送っ

ていないことを見出している。例えば、GAL1R は、細胞株や臨床検体で発現は抑制されていることを発見した。おそらく GAL1R を介するシグナルは癌細胞の増殖や浸潤に負のシグナルを伝達し、癌化を予防していることが示唆されており、NTS-NTSR1 のシグナル伝達について同様の検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) NTS、GAL が癌細胞に作用し増殖や浸潤に関わるか検討する。

神経ペプチド (NTS、GAL) 2 遺伝子とそれぞれのレセプター 6 種類について、扁平上皮癌細胞株における発現状態を遺伝子およびタンパク質レ

ベルで調べた。

また、神経ペプチドおよびそれぞれのレセプターの発現を抑える siRNA を設計し、発現が抑

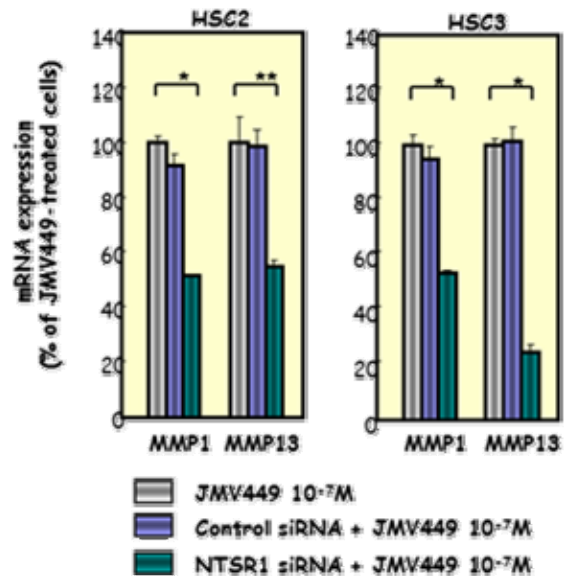
制されることを確かめた。口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 および HSC3 においては NTS の発現が低いことが確認できた。また NTS アゴニスト (JMV449) により増殖能は有意に亢進し、NTSR1 siRNA の前処置によりこの増殖能は有意に抑制されることが確認できた。

さらにマトリジェルを用いたインベージョンアッセイを行った結果、NTSR1 siRNA により NTSR1 をブロックすることで、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 および HSC3 においては有意に癌細胞の浸潤能が抑制された。

(2) NTS および GAL の下流シグナルの探索

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 および HSC3 において、NTS アゴニスト単独投与と NTSR1 siRNA の併用処置に対して、下流シグナルと

考えられる MMP1 と MMP13 の発現変化を検討した結果、NTS のアゴニストによる MMP1 と MMP13 の発現は有意に上昇し、これは NTSR1 siRNA の前処置により有意に抑制されることが確認できた。(下図) 同様の結果は、IL-8 においても認められた。



NRS-NTSR1 の下流シグナルに MMP1、MMP13 および IL-8 が存在することを明らかにした。

(3) 癌の増殖や浸潤を抑制する標的遺伝子を用いた治療法の開発(マイクロ RNA に着目)

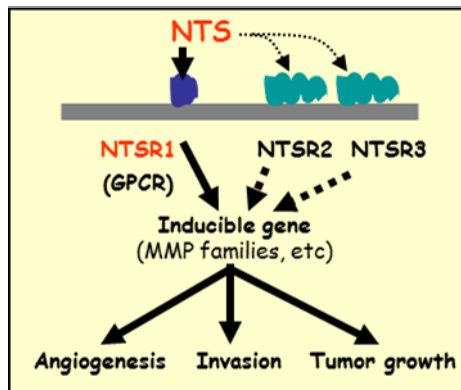
NRS-NTSR1 が関与する扁平上皮癌の増殖・浸潤能について下流シグナルに MMP 群および IL-8 の関与が確認でき、これら遺伝子の発現制御メカニズムを解明する為、新しい概念である microRNA (miRNA) の解析を行った。

臨床検体を用いた miRNA プロファイリングから、複数の miRNA が癌細胞で発現抑制されている事が判明した。発現抑制されている miRNA (miR-133a、miR-145) を下咽頭癌細胞に導入する事により転移や浸潤を抑える事を見出した。miRNA はタンパクコード遺伝子の発現を抑制する事が知られており、NT-NTR の発現亢進にはこれら miRNA の関与があると考えられる。miRNA は、人工的に量産が可能

な核酸であり、抗がん作用を持つ薬剤としての開発が可能であり、期待できる治療法の実現の基盤となるものと考えられる。

以上をまとめると下咽頭癌細胞においては NT-NTR シグナルを介して IL8 や MMP の発現が誘導される事がはじめて証明された。

(下図は、まとめのシエーマ)



#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Fujimura L, Yoshino H, Kawakami K, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. (2011) Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 38(1):209-17.
2. Kikkawa N, Hanazawa T, Fujimura L, Nohata N, Suzuki H, Chazono H, Sakurai D, Horiguchi S, Okamoto Y, Seki N. (2010) miR-489 is a tumour-suppressive miRNA target PTPN11 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC). *Br J Cancer.* 7;103(6):877-84.
3. 花澤豊行, 吉川直子, 野畑二次郎, 堅田浩司, ムラディル・ムラリフ, 鈴木誉, 佐々木慶太, 茶菌英明, 堀口茂俊, 岡本美孝, 関直彦. (2010) マイクロ

RNA(miR-145、miR-133a・b)の頭頸部扁平上皮癌における増殖・浸潤抑制機能と標的遺伝子の同定. *頭頸部癌*36(1)1-8.

4. Sugimoto T, Seki N, Shimizu S, Kikkawa N, Tsukada J, Shimada H, Sasaki K, Hanazawa T, Okamoto Y, Hata A. (2009) The galanin signaling cascade is a candidate pathway regulating oncogenesis in human squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 48(2):132-42.
5. Shimizu S, Tsukada J, Sugimoto T, Kikkawa N, Sasaki K, Chazono H, Hanazawa T, Okamoto Y, Seki N. (2008) Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: A role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int J Cancer.* 15;123(8):1816-23.

[学会発表] (計 5 件)

1. Nohata N. miR-133a as a tumor suppressive microRNA targeting multiple oncogenes in head neck squamous cell carcinoma. AACR102nd 2011.4.3 Orland
2. Hanazawa T. miR-15a as potential therapeutic molecule for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). AACR101st 2010.4.19 Washington DC
3. 吉川直子. 下咽頭 SCC の遺伝子発現プロファイルによる microRNA 発現多様性の同定. 第 69 回日本癌学会 2009.10.1 横浜.
4. 花澤豊行. ニューロテンシンシグナルによる頭頸部扁平上皮癌転移・浸潤機構の解明. 第 68 回日本癌学会 2008.10.28 名古屋.
5. 花澤豊行. ゲノム解析に基づく頭頸部扁平上皮癌・分子標的の探索 (1) ガラニンレセプターを介するシグナル伝達機

構の解明. 第 32 回日本頭頸部癌学会

2008. 6. 13 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花澤 豊行

(千葉大学・大学院医学研究院・准教授)

研究者番号：90272327

(2) 研究分担者

関 直彦

(千葉大学・大学院医学研究院・准教授)

研究者番号：50345013