

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591918

研究課題名（和文） 疾患特異的マイクロRNAを治療標的とした頭頸部癌の新規治療戦略

研究課題名（英文） Novel therapeutic concept against head and neck cancer using disease-specific microRNAs.

研究代表者

齋藤 康一郎 (SAITO KOICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40296679

研究成果の概要（和文）：本研究は、臨床検体を用い、喉頭癌に特徴的に発現し、様々なしくみで遺伝子発現をコントロールしているマイクロRNAを複数(miRNAs)見出した。さらにはこれらのmiRNAsのうち、癌組織で上昇傾向を示したものに対してはその作用を阻害する遺伝子を、減少傾向を示したものに対してはその作用を模倣する遺伝子を頭頸部の癌細胞に導入し、その細胞増殖を抑制する効果を確認した。さらに、動物モデルを用い、同様の治療で癌の増殖ならびに転移の抑制が可能であることを突き止めた。結果として、疾患に特徴的なmiRNAsが、頭頸部癌の診断・治療標的として有用である可能性を示唆することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have successfully identified laryngeal cancer-specific microRNAs (miRNAs) using clinical tissue samples. While several miRNAs were over-expressed in cancers, expressions of several miRNAs were suppressed in diseased tissues. Growth levels of cancer cells were suppressed by inhibitors or mimics of these miRNAs respectively in vitro. Furthermore, tumor growth and metastasis were inhibited by manipulating cancer-specific miRNA in vivo. Our results paved the way for future possibilities to diagnose/treat head and neck cancer by targeting disease specific miRNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：喉頭科学・頭頸部腫瘍・癌・マイクロRNA・治療・診断

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は、手術・放射線・抗癌剤を組み合わせた集学的治療を行っても、その根治性はとくに進行癌では30%程度に留まっていた(Jemal, A. et al. CA Cancer J Clin. 57, 2007.)。この状況は現在でも変わっていない。さらに、根治例でも、整容面や、発声・嚥下障害など、著しいQOLの低下を伴い、患者・家族に苦痛を強いることとなる点が、頭頸部

癌の悲惨な一面である。近年、新規治療戦略のひとつとして分子標的治療が注目され、固形腫瘍においては上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)/血管内皮細胞増殖因子受容体(VEGF receptor: VEGFR)がそのターゲットとして研究され、これらに対するモノクローナル抗体や、チロシンキナーゼ(TK)

阻害薬が臨床応用されつつあった。しかしながら薬剤への耐性化や効果の人種差、さらには強い副作用など、解決すべき点が山積していた。頭頸部癌でも、EGFR の TK 阻害薬の臨床試験 (Cohen EEW. *J Clin Oncol.* 24, 2006.)や、抗 EGFR 抗体と放射線治療の併用 (Bonner JA, et al. *N Engl J Med.* 354, 2006) といった試みがなされてきたものの、局所制御率は 15 ヶ月程度、3 年生存率も 55% に留まり、決定的な治療とは言い難い状況であった。一方で、これまでの抗体医薬品あるいは低分子合成医薬品などの医薬品のやく約 90% は主にタンパク質への作用を標的として設計されているのに対し、近年明らかにされている生体内の RNA 機能解明と相まって、RNA 医薬を含めた核酸医薬に関心が高まっていた。

2. 研究の目的

本研究は、我々が独自に突き止めた頭頸部癌に特徴的な miRNAs 発現プロファイルに基づき、これまで確率してきた癌研究システムと手技 (in vitro, in vivo) を用いる。その上で、疾患に特徴的な発現を認める miRNAs を標的とした、頭頸部癌に対する新規治療戦略の確立を目指し、その有効性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 我々は喉頭癌において発現上昇を認める miRNAs を 6 種 (miR-21, miR-130b*, miR-196a, miR-455-3p, miR-455-5p, miR-801)、発現低下を認める miRNAs を 3 種 (miR-133b, miR-145, miR-375) 突き止め、とくに miR-455-5p と miR-196a が癌において有意に上昇していることをつきとめていた (特許国際出願 PCT/JP2009/002629)。本研究では、まず治療標的となり得る miRNAs を絞り込むため、多数の臨床検体を用い、TaqMan qRT-PCR (Chen C, et al. *Nucleic Acids Res.* 33, 2005) によるこれら miRNAs の定量的な発現解析を行った。その上で 1) 同一患者の癌部と非癌部、2) 正常喉頭組織、良性疾患、前癌病変、癌の各疾患群、3) 早期癌と進行癌、これらにおける特徴的な発現傾向を比較し、発癌や悪性度に関与すると考えられる miRNAs を治療標的として絞り込んだ。なお、解析には RIN (RNA Integrity Number) が 7.5 以上の、ほとんど分解されない状態の miRNA を用いた。

(2) 発癌や悪性度と関連すると考えられる miRNAs を絞り込んだ後、細胞レベルでの治療標的としての有用性を検討した。癌において発現が上昇している miR-196a に関しては、その阻害遺伝子 (mimic) を、発現が低下している miR-133b, miR-375 に関してはその模倣遺伝子 (inhibitor) を細胞に導入し、治療効果を検討した (Shanmugam N, et al. *J Biol Chem.* 283, 2008)。細胞としては、喉頭癌由来の JHU-011 細胞を中心に扱うが、同

時に下咽頭癌由来の FaDu 細胞や、舌癌由来の SAS 細胞といった、頭頸部癌由来の複数の細胞株を使用し、その効果の違いについても検討を加えた (JHU-011 細胞と FaDu 細胞は Johns Hopkins 医科大学の Joseph A. Califano 医師より供与; Chang SS, et al, *Int J Cancer.* 123, 2008)。まず Lipofectamine™ 2000 reagent を用いて遺伝子導入した細胞と、阻害遺伝子・模倣遺伝子それぞれの negative control を導入した細胞において、経時的に細胞数をカウントすることで、細胞増殖への影響を確認した。その上で、multitox-fluor multiplex cytotoxicity assay (Promega) により cell viability を測定し、治療による殺細胞効果を検討した。

(3) in vivo でとくに効果が顕著であった、miR-196a の抑制による治療効果を動物モデルにおいて検討した。ヌードマウスの頸部に上記細胞を異種移植したモデルを用い (Saito K, et al. *Laryngoscope.* 119, 2009)、miR-196a の阻害遺伝子あるいはコントロールを局所投与した後、A) 腫瘍局所のコントロール効果と、B) 転移の抑制効果を検討した。投与に際しては、コラーゲン製剤 (AteloGene: 高研 (局所用/全身用)) と miR-196a の阻害遺伝子を混和して投与した。A) に関しては、腫瘍径が 3 mm 程度になった時点で治療を行い、腫瘍サイズを経時的に測定した。B) に関しては、実験開始後 12 週での腫瘍摘出時に、頸部リンパ節も同時に摘出し、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) これまでのマイクロアレイ解析で疾患に特徴的な発現傾向を示した miRNAs につき、多検体で定量的に発現を解析した。まず同一患者の非癌部分と癌部分での発現量を比較したところ、癌部分で発現量の多い傾向を認めた miR-130b-5p, miR-096a, miR-455-5p、さらに癌部分で発現量の少ない傾向を認めた miR-133b において、発現量が有意に異なることをつきとめた。これらのうち、① 良性疾患、② 前癌病変、③ 癌の 3 群における発現量の比較で、① と③ ならびに② と③ で有意差を認めた miR-196a を有望な標的候補と考え、91 検体で解析した。その結果、早期癌 (T1-T2) と進行癌 (T3-T4)、さらに前癌病変 (dysplasia) と極めて初期の癌 (T1a) のいずれの比較でも後者で有意に発現増加を認め、miR-196a の疾患バイオマーカーとしての有用性、疾患の進行との関与、治療標的としての可能性が示唆された。

(2) 引き続き、これまで我々が喉頭癌に特徴的な発現傾向を認めることを見出した miRNAs のうち、発現の上昇傾向を示した miR-196a に関してはその阻害遺伝子を、低下傾向を示した miR-133b, miR-375 に関してはその模倣遺伝子を頭頸部扁平癌細胞に導入

し、その治療効果を検討した。喉頭癌由来の JHU-011 細胞 (Johns Hopkins 医科大学の Joseph A. Califano 医師より供与) を用い、まず遺伝子導入による細胞増殖抑制効果を検討した。いずれの系でも細胞増殖の抑制を認めたが、とくに miR-196a を用いた場合、有意な細胞増殖抑制効果を認めた。さらに、cell viability を定量的に測定するアッセイとして multitox-fluor multiplex cytotoxicity assay (Promega) を行ったところ、生細胞数の有意な減少と、死細胞数の有意な増加を認めた。これらの結果はいずれも、頭頸部癌に特徴的な発現傾向を認める miRNAs が治療標的となり得ることを示唆するものであった。

(3) さらに、in vitro でとくに顕著な腫瘍細胞増殖抑制効果を示した miR-196a 阻害遺伝子の導入による in vivo での頭頸部癌治療効果の検討を行った。まず、ヌードマウスの頸部に喉頭癌由来の JHU-011 細胞を皮下注射して頭頸部癌の同所異種移植モデルを作成した。腫瘍径が 3mm 大となった時点で、週に 1 度、計 3 回 miR-196a の阻害遺伝子を局注し (治療群)、治療効果を検討した。腫瘍細胞の皮下注射後 12 週まで追跡したところ、治療群において腫瘍の増殖は継続して有意に抑制された。さらに、頸部リンパ節を摘出してホルマリン固定し、HE 染色にて検討すると、治療群においてリンパ節転移の抑制効果も認められた。

本研究は、喉頭癌を例に、頭頸部癌に特徴的な発現傾向を認める miRNAs の存在の一端を明らかとし、その特徴的な発現署名が、将来的な診断の指標となる可能性を示唆した。さらに、疾患に特徴的な発現傾向を示す miRNAs の治療標的としての有用性も示す結果を得ており、将来的な頭頸部癌の診断・治療技術の進歩に大いに寄与する成果を得ることができたと考えている。

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 1 件)

齋藤康一郎、座間猛 (査読なし)

【頭頸部扁平上皮癌の最新情報】 頭頸部扁平上皮癌に対する新しい診断法 頭頸部扁平上皮癌の腫瘍マーカー
JHNS. 2012; 28: 1170-1174.

[学会発表] (計 9 件)

① 齋藤康一郎、座間猛

シンポジウム「新しい頭頸部癌治療の展望」
miRNA 医薬
第 35 回日本頭頸部癌学会 (招待講演)
2011 年 6 月 9 日
愛知

② Yabe H, Saito K, Zama T, et al.
Regulation of cancer-specific microRNA by aberrant DNA methylation in laryngeal cancer.
102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research
2011 年 4 月 5 日
Orlando, FL, USA.

③ Saito K, Zama T, et al.
The laryngeal cancer specific small RNAome revealed by deep sequencing using Applied Biosystems SOLiD platform.
102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research
2011 年 4 月 4 日
Orlando, FL, USA.

④ 齋藤康一郎、座間猛 他
頭頸部癌および婦人科癌における疾患特異的 miRNAs と DNA メチル化異常
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会
2010 年 12 月 8 日
神戸

⑤ 矢部はる奈、齋藤康一郎、座間猛 他
頭頸部癌の新規診断治療標的としての疾患特異的マイクロ RNA
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会
2010 年 12 月 8 日
神戸

⑥ 宇野光祐、齋藤康一郎、座間猛 他
疾患特異的マイクロ RNA を標的とした下咽頭癌の新規治療
第 69 回日本癌学会
2010 年 9 月 23 日
大阪

⑦ 木村美和子、齋藤康一郎、座間猛 他
喉頭癌および子宮体癌における癌特異的 miRNAs ならびに DNA メチル化異常
第 69 回日本癌学会
2010 年 9 月 23 日
大阪

⑧ 齋藤康一郎、座間猛 他
喉頭癌の新規診断マーカー・治療標的としての miR-196a
第 69 回日本癌学会
2010 年 9 月 22 日
大阪

⑨ Saito K, Zama T, et al.

miR-196a is a novel diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer.

101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research

2010年4月20日

Washington DC, USA.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

①名称: バイオマーカーとしての新規スモール RNA を用いた腫瘍の診断

発明者: 座間猛、齋藤康一郎、神本高宏

権利者: 同上

種類: 国内特許出願

番号: 2011-111206

出願年月日: 2011年5月18日

国内外の別: 国内

②名称: バイオマーカーとしてのマイクロ RNA を用いた婦人科がんの診断・治療選択 (Diagnosis/Therapeutic Strategy For Gynecological Cancer By Utilizing Micro-RNA as Biomarker)

発明者: 座間猛、平沢晃、齋藤康一郎、赤羽智子

権利者: 学校法人 慶應義塾

種類: 米国特許出願

番号: 12/999,124

出願年月日: 2010年12月15日

国内外の別: 国外

③名称: バイオマーカーとしてのマイクロ RNA を用いた頭頸部腫瘍の診断・治療選択 (Diagnosis/Treatment Option for Head-And-Neck Tumor Using Micro-RNA as Biomarker)

発明者: 座間猛、齋藤康一郎、平沢晃、長西秀樹

権利者: 学校法人 慶應義塾

種類: 米国特許出願

番号: 12/996,420

出願年月日: 2010年12月6日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科学教室

<http://www.keio-ent.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 康一郎 (SAITO KOICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 40296679

(2) 研究分担者

座間 猛 (ZAMA TAKERU)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号: 30296719

(3) 連携研究者

なし