

## 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 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 22 年度～平成 23 年度

課題番号：22791570

研究課題名（和文） 唾液腺導管癌の遠隔転移制御を目的とした分子ネットワーク解析

研究課題名（英文） Molecular network analysis of salivary duct carcinoma for the control of distant metastasis

研究代表者 佐々木 慶太（SASAKI KEITA）

千葉県がんセンター（研究所）・医療局 頭頸科 部長

研究者番号：50400940

研究成果の概要（和文）：

唾液腺導管癌 4 症例（正常部と癌部のペア）の microRNA アレイの結果から、これまで癌遺伝子と報告されている miR-21 や miR-23-24-27 クラスターの発現亢進や癌抑制遺伝子と報告されている miR-375、miR-1、miR-200 ファミリーの発現低下が確認された。miR-200 ファミリーの制御する遺伝子（群）を解析するために、標的探索プログラムとパスウェイ解析プログラムを用いた結果、細胞接着に関わる遺伝子群が有意に抽出された。さらに同じ臨床サンプルのマイクロアレイ解析と照合し、細胞接着関連の発現亢進している遺伝子群は唾液腺導管癌の臨床的特徴である遠隔転移に関わっている可能性があり、予後改善のための新規治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

From the results of microRNA array (four pairs of the salivary duct carcinoma and normal salivary gland region), expressions of miR-21 and miR-23-24-27 cluster which have been reported as oncomiRs were increased, whereas expressions of miR-375, miR-1, and miR-200 family which have been reported as tumor suppressive miRNAs were decreased. In order to analyze the gene(s) regulated by miR-200 family, we performed in silico analysis with miRNA target search program and pathway analysis. The results suggested that genes regulated by miR-200 family are involved in cell adhesion. Furthermore, collated focal adhesion-related genes with the microarray analysis of clinical samples, over-expressed genes in cell adhesion may be involved in distant metastasis that is the clinical features of salivary duct carcinoma. These results suggested that the over-expressed genes in cell adhesion might be potential targets of novel treatment for improving the poor prognosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 23 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：

キーワード：唾液腺導管癌、microRNA、マイクロアレイ

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉科頭頸部外科（※研究代表者が本研究申請時に在籍）において、1991～2005年までに根治治療を行った耳下腺における唾液腺導管癌は17例であり、全例に耳下腺拡大全摘術を行い、さらに多くの症例で術後放射線化学療法を併用した集学的治療を施行した。しかしながら、その5年累積生存率は46.3%であり依然予後不良癌である。死因としては遠隔転移の頻度が多く、遠隔転移の制御が今後の最大の課題である。近年、HER-2レセプターが発現する唾液腺導管癌に対してトラスツマブの使用が試みられているが、比較的稀な疾患であるため単一施設での症例数の蓄積は難しいことから、分子標的薬剤を含む現行の治療法における有効性は証明されておらず、生命予後を改善させる治療法の確立は急務であると考えられる。

唾液腺導管癌に対して、現在のゲノム科学の手法を駆使して、新規の治療法や診断法の開発に繋がる分子メカニズムの解析は非常に重要と考える。これまでにゲノム的な解析が皆無である耳下腺における唾液腺導管癌を対象とした本研究を考案した。

### 2. 研究の目的

組織学的に乳腺の浸潤性乳管癌に類似した唾液腺導管癌は非常に予後不良な癌である。唾液腺導管癌の治療については近年、HER-2レセプターが発現する唾液腺導管癌に対してトラスツマブの使用が試みられているが確固としたプロトコルが無く、治療方針の検討も未だ十分行われていない。

今回の提案は、千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉科頭頸部外科（※研究代表者が本研究申請時に在籍）で手術・摘出された臨床サンプルを利用して、機能性RNAネットワーク（タンパクコード遺伝子と非タンパクコード遺伝子のネットワーク）を網羅的に解明することにより、唾液腺導管癌の分子メカニズムを検討し、分子標的薬剤の適応拡大を含め、今後の治療方針の礎となるデータを拾得する研究である。

### 3. 研究の方法

千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部外科（※研究代表者が本研究申請時に在籍）

において切除摘出した臨床検体を用いて唾液腺導管癌組織および同患者の正常唾液腺組織における遺伝子発現を網羅的に解析することを計画した。

これまでに採取を行った7症例からtotal RNAを抽出した。7症例のうちRNAの品質が良好な4症例（癌部と正常部のペア）のRNAサンプルに対して、アジレント社製マイクロアレイ（SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K）およびマイクロRNAアレイ（SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイキット 8x60K Rel. 16.0）を用いてタンパクコード遺伝子、マイクロRNA、long non-coding RNAの発現プロファイルを作成した。

### 4. 研究成果

#### ①唾液腺導管癌におけるmiRNA発現異常

4症例の唾液腺導管癌組織サンプルと同患者の正常唾液腺組織サンプルにおけるmiRNAの発現変動をSurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイキットを用いて解析を行った。

##### 1) 癌部で発現上昇していたmiRNA

発現が2倍（マイクロアレイの信号値）以上亢進していたmiRNAは20種類存在していた。特にmiR-21は10倍近く発現が亢進していた。miR-21はOncomiR（オンコミラ；癌促進的miRNA）としてよく知られている。miR-21は乳癌、脳腫瘍、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、胃癌、肝細胞癌、頭頸部癌、食道癌、白血病など多くの癌種で共通に発現亢進が報告されている。癌遺伝子miR-21は、PTEN (phosphatase and tensin homologue)、TPM1 (tropomyosin1)、PDCD4 (Programmed cell death 4)、Maspinなどの癌抑制遺伝子を直接的に発現抑制している。

ほかに発現亢進していたmiRNAとして興味深いものにmiR-23a、miR-24、miR-27aが存在していた。これらのmiRNAはヒト染色体の9q22に近接して存在しているクラスターと言われるmiRNAである。これらは多種多様な疾患で発現の異常が報告されている。急性骨髄性白血病や急性リンパ球性白血病、膀胱癌、乳癌、肝細胞癌、膵癌では発現亢進が報告されている一方で、悪性黒色腫や舌扁平上皮癌、前立腺癌では発現低下が報告されている。癌以外にも心筋肥大や骨格筋萎縮の病態に寄与が示唆されている。

## 2) 癌部で発現低下していた miRNA

発現が2倍（マイクロアレイの信号値）以下に低下していた miRNA は27種類存在していた。とくに miR-375 は20%以下に低下していた。miR-375 は最近多くの癌（食道癌、頭頸部癌、胃癌、膵癌、肝細胞癌、悪性黒色腫）で発現低下および癌抑制的機能が報告されている miRNA の一つである。最近、下咽頭癌、上顎癌、食道癌においても miR-375 は発現低下しており、癌抑制型 miRNA として機能することが明らかになっている。(J Hum Genet. 2011 56(8): 595-601、Int J Oncol. 2012 40(1): 185-193)。

miR-1 も癌部で発現低下していた。miR-1 も miR-375 と同様に最近多くの癌（肝細胞癌、肺癌、胃癌、膵癌、大腸癌、横紋筋肉腫、甲状腺癌）で発現低下および癌抑制的機能が報告されている miRNA の一つである。miR-1 の癌部における発現低下および癌抑制的機能は頭頸部扁平上皮癌、膀胱癌、腎細胞癌、前立腺癌においても報告されている。(Br J Cancer. 104(5):808-18.、Oncotarget. 2(1-2):29-42.、Eur J Cancer. 48(6):827-36.、Br J Cancer. 17;106(2):405-13.)

他に興味深い発現低下遺伝子群として、miR-200a/200b/429、miR-141/200c のクラスターが存在していた。miR-200 ファミリーは、miR-200a/200b/429 が1番染色体に、miR-141/200c が12番染色体にそれぞれクラスターを形成している一方で miR-200b、200c、429 と miR-141、200a がそれぞれ同じタンパクコード遺伝子の翻訳を制御することがその塩基配列を基に標的遺伝子予測プログラムで示唆されている。また p53 タンパクが2つのクラスター近傍に結合し、miR-200 ファミリーの5つ miRNA の発現調節をしていることが報告されている。miR-200 ファミリーはがん抑制性の miRNA を考えられており、転写抑制因子 ZEB1/2 の発現を制御することでがんの浸潤・転移に関連した重要な現象である上皮間葉移行

(Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) を抑制することは有名な事実である。

## 3) in silico による miRNA のネットワーク解析

そこで、miR-200 ファミリーの標的遺伝子を配列予想プログラム TargetScanHuman

(<http://www.targetscan.org/>) を用いて抽出を行った。miR-200b/200c/429 の予想された標的遺伝子は3,414個、miR-141/200a の予想された標的遺伝子は3,634個であった。これらの遺伝子群に対して、さらに Pathway 解析プログラムである GeneCodis Ver3.0

(<http://genecodis.cnb.csic.es/>) を用いて解析を行った。両者の遺伝子群において共通して有意であると計算された Pathway の一つに 'Focal Adhesion' が示唆された。EMT



図1 miR-200b/c/429 の標的遺伝子候補の唾液腺導管癌サンプルにおける発現

は上皮細胞の極性がくずれ、細胞の運動性が亢進する現象である。In silico による解析のみから EMT 関連 miRNA-200 ファミリーが制御するパスウェイとして Focal adhesion が導き出されたことは極めて興味深い結果であった。

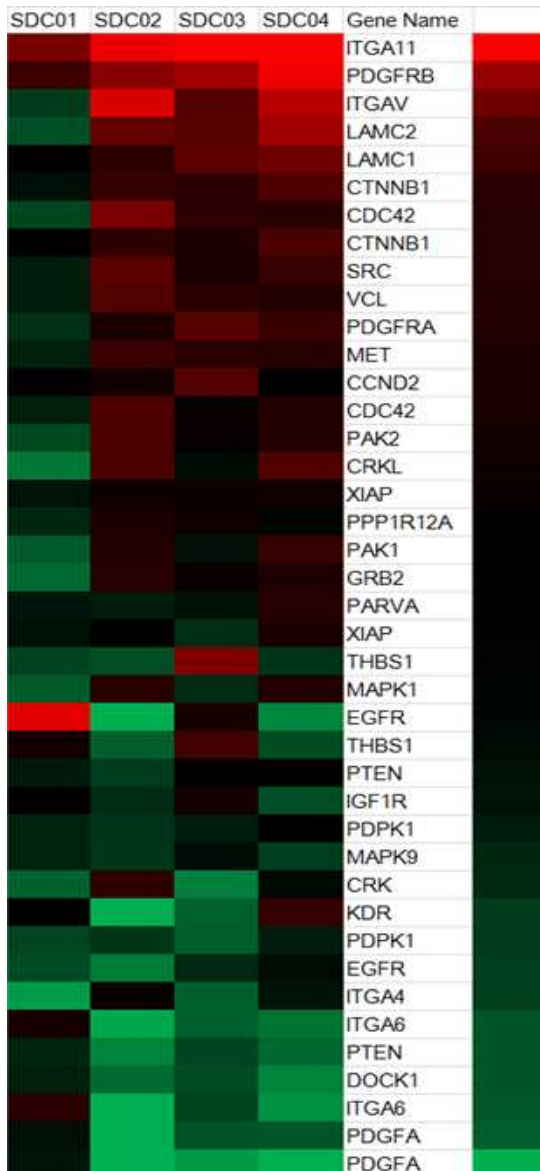


図 2 miR-200a/141 の標的遺伝子候補の唾液腺導管癌サンプルにおける発現

②唾液腺導管癌におけるタンパクコード遺伝子発現異常

引き続き、同じ 4 症例の唾液腺導管癌ペアサンプルを用いて、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K によるタンパクコード遺伝子の発現を解析した。上記の miR-200 ファミリーの標的遺伝子群から予想された Focal adhesion のパスウェイの中に存在する遺伝子群の発現を実際のマイクロアレイデータと照合したところ、唾液腺導管癌においては、FN1 (fibronectin1) や ITGA (integrin alpha)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、Laminin などが特に発現亢進していた。これらの遺伝子が唾液腺導管癌細胞における上皮間葉移行の現象に深く関与していることが示唆された。(図 1・2)

同様の手法で miR-1 の制御する下流パスウェイを検討したところ、癌と関連の深い MAPK パスウェイが示唆された (P=4.23685E-06)。(図 3)

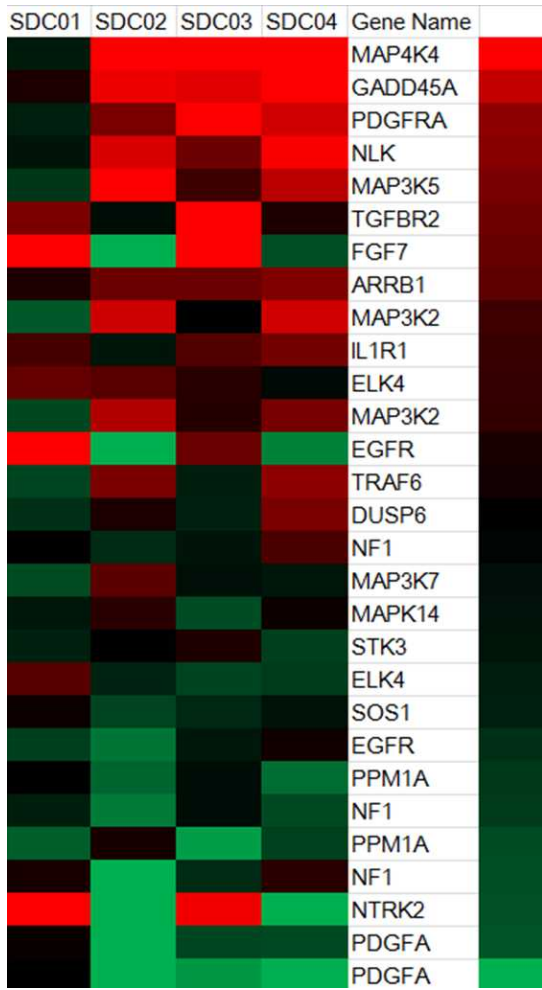


図 3 miR-1 の MAPK pathway 関連標的遺伝子群の唾液腺導管癌サンプルにおける発現

③考察

本研究で得られたデータは、唾液腺導管癌の臨床的特徴である遠隔転移を分子生物学的に説明する上で基盤となりうる結果となった。今回発現異常が見出された miRNA あるいはタンパクコード遺伝子は唾液腺導管癌における治療標的となる可能性を秘めている。唾液腺導管癌の分子メカニズムの解明と新規治療方法の確立に向けた更なる解析を進めていく上で、臨床サンプル数の蓄積と癌細胞株 (未だ樹立されていない) を用いた in vitro での機能解析が今後必要である。さらに、今回解析を行ってはいないが唾液腺導管の long non-coding RNA の発現も SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K を用いて取得しており、今後このデータの解析も併せて進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 慶太 (SASAKI KEITA)

千葉県がんセンター(研究所)・医療局 頭

頸科 部長

研究者番号：50400940