

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462596

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌におけるマイクロRNAを基点としたセツキシマブ効果予測因子の探索

研究課題名(英文) Investigation into the predictor of cetuximab effect based on microRNA in head and neck squamous cell carcinoma

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌において、発現が抑制されていたmiR-1およびmiR-206について検討した。これらを頭頸部扁平上皮癌細胞に核酸導入すると、癌細胞の遊走能、浸潤能の顕著な抑制効果を認め、これらが癌抑制型マイクロRNAである事を確認した。次に、それぞれが制御する癌促進型遺伝子を探索した結果、EGFRおよびc-METが直接の標的分子である事が判明した。EGFR阻害薬の治療抵抗性に、c-METを介したシグナル伝達系の活性化が報告もあり、miR-1およびmiR-206の発現抑制は、EGFRおよびc-METの発現制御の破綻をきたす事から、頭頸部扁平上皮癌の治療抵抗性に関与している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we newly constructed the RNA sequencing based miRNA expression signature by using clinical specimens. Based on the expression signature, we have identified several antitumor miRNAs and these miRNAs regulated oncogenic targets in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells. miR-1 and miR-206 were significantly reduced HNSCC tissues and ectopic expression of these miRNAs inhibited HNSCC cancer cell aggressiveness. We found that two growth factor receptors, epidermal growth factor receptor (EGFR) and hepatocyte growth factor receptor (c-MET), were directly regulated by both miR-1 and miR-206 in HNSCC cells. Moreover, several reports showed that EGFR inhibitors induced c-MET signal activation, suggesting a possible mechanism of acquired resistance to EGFR inhibitors. The identification of targets modulated by tumor-suppressive miR-1 and miR-206 may lead to a better understanding of molecular pathogenesis of HNSCC.

研究分野：頭頸部がん

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 マイクロRNA セツキシマブ 治療効果予測因子

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析研究の結果、ヒトゲノム中には蛋白をコードしない RNA 分子が多数存在し、実際に転写されていることが判明した。その中で、僅か 19 塩基 ~ 22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子は、マイクロ RNA と呼ばれる。1 種類のマイクロ RNA は、配列依存的に数百 ~ 数千種の機能性 RNA (蛋白コード、非コード遺伝子) の発現を制御していることから、細胞内ではマイクロ RNA-機能性 RNA の極めて複雑な分子ネットワークが形成されている。マイクロ RNA の発現異常は、機能性 RNA ネットワークの破綻をきたし、ヒト疾患の原因となる事が報告されている。癌の研究においても、マイクロ RNA の発現異常が、癌細胞の発生、悪性化、転移、治療抵抗性に重要な役割を担っていることが相次いで報告されている。

頭頸部扁平上皮癌は、診断時には頸部リンパ節や遠隔転移をきたし、進行症例となっている症例も珍しくなく、進行症例の予後は極めて予後不良である。また、頭頸部扁平上皮癌の治療課題である局所制御と臓器温存の更なる向上を図るために、外科手術、化学放射線治療が発達し、治療成績の向上が認められている。しかしながら、遠隔転移をきたした症例の予後は極めて不良であり、今後治療成績を向上させるためには遠隔転移の制御が必要不可欠である。近年、頭頸部扁平上皮癌において、過剰発現している epidermal growth factor receptor (EGFR) を治療標的とした、分子標的治療薬 Cetuximab が認可され、遠隔転移症例や手術不能症例に対して、治療効果を上げている。しかしながら、分子標的治療薬の治療経過中に、多くの症例で治療抵抗性を獲得することが報告されている。治療抵抗性を獲得した癌細胞に対する治療法は皆無であり、その予後は極めて不良である。

頭頸部扁平上皮癌の遠隔転移や治療抵抗性関与する分子メカニズムは未だに十分に

解明されていないのが現状である。治療抵抗性に至った検体を用いて、最新の癌・ゲノム研究から、頭頸部扁平上皮癌の遠隔転移に関わる分子ネットワークを探索し、治療や診断の基礎となる知見を得ることが重要と考える。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌において治療抵抗性となった臨床検体より、マイクロ RNA 発現プロファイルを作製する。このプロファイルに基づき、癌組織で発現抑制を認めるマイクロ RNA に着目し、癌抑制型マイクロ RNA を探索する。更に、癌抑制型マイクロ RNA を起点とした、機能性 RNA ネットワークを探索し、頭頸部扁平上皮癌における、遠隔転移あるいは治療抵抗性に関わる分子を探索する。

3. 研究の方法

研究は以下の手順で進めた。

(1) 分子標的薬 (Cetuximab・放射線) 治療後に、治療抵抗性に至った患者臨床検体から、頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルを作製し、癌組織で発現抑制されているマイクロ RNA を見出す。マイクロ RNA 発現プロファイルの作成は、次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing により作成した。

(2) 癌組織で発現抑制が認められたマイクロ RNA の機能解析から、頭頸部扁平上皮癌における、癌抑制型マイクロ RNA を探索する。特に、癌細胞の遊走能や浸潤を抑制する転移抑制型マイクロ RNA の探索を行った。

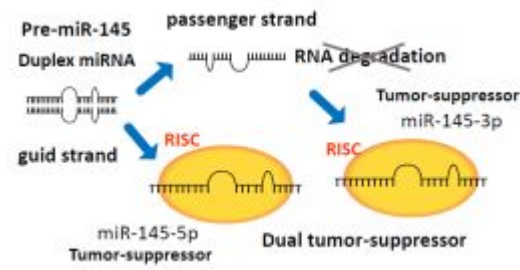
(3) ゲノム科学的手法 (マイクロアレイ解析、データベース解析) から、マイクロ RNA が制御する機能性 RNA ネットワーク解析を行い、頭頸部扁平上皮癌の治療抵抗性や転移に関わる分子を探索した。

(4) マイクロ RNA の標的分子の機能解析を施行し、治療抵抗性や転移に関与することを証明する。

4. 研究成果

(1) 頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルの作製

セツキシマブ治療後に再発した頭頸部扁平上皮癌組織から、RNA-sequence により、マイクロ RNA 発現プロファイルを作製した。本プロファイルは、全ゲノムを対象とした解析のため、これまで頭頸部癌において報告ないマイクロ RNA が多数含まれており、これらマイクロ RNA の機能を明らかにすることは、本申請研究を進める上で大きなアドバンテージである。マイクロ RNA の生合成においては、passenger strand は、機能しない事が一般的であるが、本結果は、マイクロ RNA の guide strand および、passenger strand が共に、癌組織で発現抑制されていることが示された。例えば、これまでの解析で癌抑制機能を証明した miR-145-5p (guide strand) と共に、miR-145-3p (passenger strand) の発現抑制が明らかとなった。このことから、miR-145-3p も癌抑制型マイクロ RNA として機能する可能性が示唆された。



(2) マイクロ RNA (miR-1、miR-206) の機能解析

頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルから、発現が抑制されている、miR-1 および miR-206 に着目し、その機能解析を施行した。その結果、miR-1、miR-206 を、頭頸部扁平上皮癌細胞株 (FaDu、SAS、HSC3) に核酸導入すると、癌細胞の遊走能、浸潤能を顕著に抑制した(図1)。このことから、miR-1 および miR-206 は、癌抑制型マイクロ RNA であることが判明した。また、miR-1 および miR-206 の発現を、臨床検体で測定した結果、癌組織で抑制されていることを検証した。

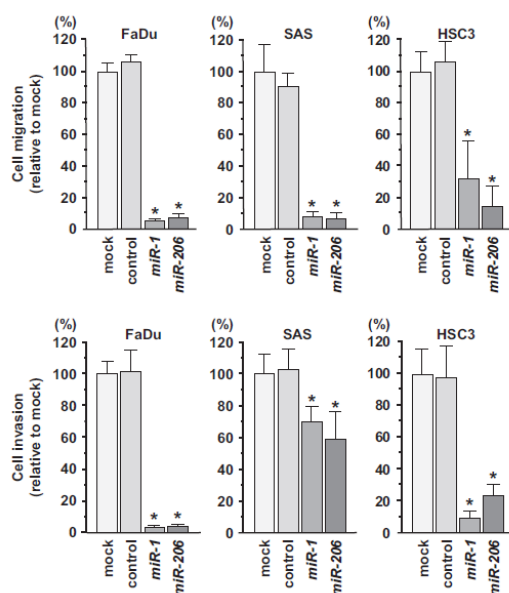


図1. マイクロ RNA、miR-1 または miR-206 を癌細胞株に核酸導入し、細胞の遊走能、浸潤能を測定した。

(3) 癌抑制型マイクロ RNA、miR-1 および miR-206 が制御する標的遺伝子の探索

頭頸部扁平上皮癌細胞内で、miR-1 および miR-206 が制御する癌促進型の遺伝子の探索を行った。その結果、epidermal growth factor receptor (EGFR) および hepatocyte growth factor receptor (c-MET) が、これらマイクロ RNA の直接の標的分子であることが判明した(図2)。更に、EGFR の下流シグナルである、AKT および ERK のリン酸化を調べた結果、miR-1 および miR-206 は、AKT、ERK のリン酸化を抑制する事が明らかとなった(図3)。

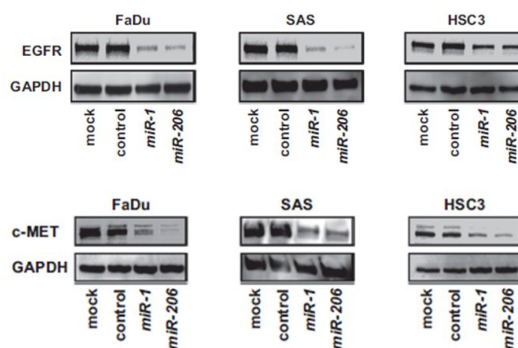


図2. miR-1 および miR-206 を癌細胞株に核酸導入し、72 時間後に細胞を回収し、EGFR

および c-MET 抗体で Western Blotting を行った。miR-1 および miR-206 は、EGFR および c-MET の発現を蛋白レベルで抑制することを確認した。

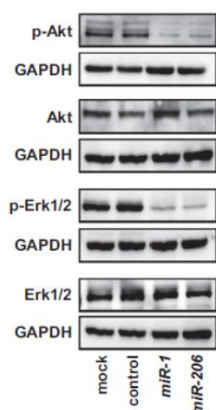


図 3. miR-1 および miR-206 を癌細胞株に核酸導入し、72 時間後に細胞を回収し、AKT および ERK 抗体で Western Blotting を行った。miR-1 および miR-206 は EGFR の下流シグナルである、p-AKT および p-ERK のリン酸化を抑制した。

(4) 頭頸部扁平上皮癌臨床検体における、EGFR および c-MET の発現

EGFR および c-MET の発現について、免疫組織染色法を用いて検討した。その結果、EGFR と c-MET が共に高発現している症例を認めた(図 4)。頭頸部扁平上皮癌では、EGFR の過剰発現が多く症例で認められることが知られている。そのため、EGFR を特異的に阻害する分子標的治療が承認された経緯がある。EGFR 阻害薬の治療反応性はおおむね良好であるが、少なからず、治療抵抗性に至り、再発や遠隔転移をきたす症例も認める。興味あることに、EGFR 阻害薬の治療抵抗性に、c-MET を介したシグナル伝達系の活性化が報告されている。本解析の結果、c-MET が発現している症例を認めた。このことは、EGFR 阻害薬の治療未反応症例や、治療抵抗性獲得症例に、c-MET が関与していることを示唆している。癌抑制型マイクロ RNA である miR-1 および miR-206 の発現抑制は、EGFR および c-MET の発現制御の破綻をきたすことから、頭頸部扁平上皮癌の悪性化、治療抵抗性に関与してい

ることが明らかとなった。

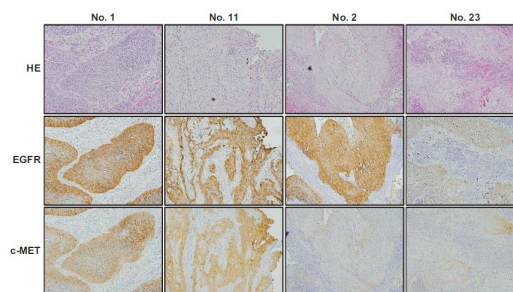


図 4. 頭頸部扁平上皮癌臨床検体における、EGFR および c-MET の免疫組織染色。症例 1 および 11 は、EGFR、c-MET の高発現を認める。症例 2 は、EGFR の高発現を認めるが、c-MET の発現は低い。症例 23 は、EGFR、c-MET 共に発現が低い。

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 5 件)

1. The tumor-suppressive microRNA-23b/27b cluster regulates the MET oncogene in oral squamous cell carcinoma. Fukumoto I, Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Matsushita R, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Okamoto Y, Seki N. *Int J Oncol.* 49(3):1119-29,2016. doi: 10.3892/ijo.2016.3602. Epub 2016 Jul 4. PMID:27573718 査読有
2. Dual-receptor (EGFR and c-MET) inhibition by tumor-suppressive miR-1 and miR-206 in head and neck squamous cell carcinoma. Koshizuka K, Hanazawa T, Fukumoto I, Kikkawa N, Matsushita R, Mataka H, Mizuno K, Okamoto Y, Seki N. *J Hum Genet.* 62(1):113-121, 2017. doi: 10.1038/jhg.2016.47. Epub 2016 May 12. PMID:27169691 査読有
3. Tumor-suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218) concertedly suppressed metastasis-promoting LOXL2 in head and neck squamous cell carcinoma.

Fukumoto I, Kikkawa N, Matsushita R,
Kato M, Kurozumi A, Nishikawa R, Goto Y,
Koshizuka K, Hanazawa T, Enokida H,
Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. J Hum
Genet. 61(2):109-18, 2016. doi:

10.1038/jhg.2015.120. Epub 2015 Oct 22.

PMID:26490187 査読有

4. MicroRNA expression signature of oral
squamous cell carcinoma: functional role of
microRNA-26a/b in the modulation of
novel cancer pathways. Fukumoto I,
Hanazawa T, Kinoshita T, Kikkawa N,
Koshizuka K, Goto Y, Nishikawa R,
Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M,
Okamoto Y, Seki N. Br J Cancer.
3;112(5):891-900, 2015. doi:
10.1038/bjc.2015.19. Epub 2015 Feb 10.
PMID:25668004 査読有

5. 当科における頭頸部癌に対するセツキ
シマブ併用放射線治療 40 例の治療経験 .
越塚慶一, 有本昇平, 山崎一樹, 茶園
英明, 花澤豊行, 岡本美孝 .頭頸部癌 42
(1), 81-86, 2016 . 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 花澤豊行 . ランチョンセミナー 頭頸部
扁平上皮癌に対する分子標的薬併用療法
の有効性と問題点 . 第 117 回日本耳鼻咽
喉科学会(国際会議場、愛知県名古屋市)
2016 年 5 月 20 日
2. 越塚慶一, 花澤豊行, 福本一郎, 吉川直
子, 松下良介, 俣木浩子, 水野圭子, 岡
本美孝, 関直彦 . 頭頸部扁平上皮癌にお
いて癌抑制型 miR-1/206 は EGFR と c-MET
を制御する . 第 75 回日本癌学会(パシフ
ィコ横浜、神奈川県横浜市) 2016 年 10
月 7 日

〔その他〕

ホームページ等
<http://genomejet.jp>

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

関 直彦 (SEKI NAOHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 : 50345013