

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791644

研究課題名(和文)

頭頸部癌特異的なマイクロRNAの解析と治療標的としての可能性

研究課題名(英文) Unique MicroRNA expression of Head and Neck Cancer; Analysis and Potential for Treatment Targets

研究代表者

稲垣 康治 (INAGAKI KOJI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70348738

研究成果の概要(和文)：喉頭癌の臨床検体から特有の miRNAs 発現傾向がわかった。この成果を踏まえて、miRNA を用いたバイオマーカーの開発を目的として研究を行った。まず、臨床検体を用いたマイクロ RNA の定量的発現解析を行い、続いて扁平上皮癌細胞株に特異的な miRNA を遺伝子導入した。結果、いくつかの細胞株において増殖抑制効果を認めた。次に喉頭癌細胞株を用いて in vivo 腫瘍モデルを作製し、miRNA 遺伝子導入を行った結果、腫瘍抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We found specific regulations of miRNAs in head and neck cancers. To confirm these findings, we examined the effect of these miRNAs on cell growth and viability using head and neck cancer cell lines. This study showed that inhibition of miR-196a suppressed the cell growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：頭頸部外科学・頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は、50 歳以上の男性に多く、全悪性腫瘍の 6% を占める。全世界では年間 65 万人が罹患し、その内 35 万人が原病死している。生存例においても、整容面、発声、嚥下等身体機能に影響を及ぼし、QOL の著しい低下をきたすことも少なくない。中でも喉頭癌は、頭頸部領域において最も多い疾患であり、がん・統計白書による喉頭癌の年間死亡数の将来予測では、死亡者数が増加するとされている。また他の頭頸部癌と比較して治療成績(生存率)は比較的良好であるものの、治療後の音声障害など患者の QOL を著しく低

下させることが少なくない。特に声門上癌・声門下癌においては初期症状が乏しく、診断された時点で既に進行しており、結果的に喉頭全摘術を余儀なくされて音声を喪失することが多い。治療後の QOL については、早期の診断・治療によってその低下を抑制することは可能であるが、患者自身が嗄声など自覚症状を訴えて医療機関を受診するか、健診で嗄声を指摘されて耳鼻咽喉科を受診するなど、症状発現後に診断されることが殆どである。しかしながら、発症・予後の予測に関しては、いくつかの因子が報告されてはいるものの、現在のところ十分な感度と特異度を併

せ持つバイオマーカーは存在しない。

miRNA は細胞内に存在し、タンパクへの翻訳がなされない長さ 22 塩基程度の 1 本鎖 RNA であるが、現在、ヒトゲノム上には 1000 種類近くの miRNA の存在が予測され、これまでに 800 種類以上がクローニングされている。これら miRNA は、ゲノム上のタンパク翻訳領域の約 30% に対して遺伝子制御を行っていることが推測されており、現在までに miRNA の機能破綻と癌の発症・進展との関与が明らかとなってきた。これまでの miRNA プロファイリングに関する報告は、癌・悪性腫瘍細胞株を用いた解析によって行われているが、腫瘍細胞株は臨床検体のように組織を構成せず、また他の組織から生体分子の影響を受けない等の理由のため、その細胞株に対応する臨床検体における発現プロファイルとは異なることが予測された。そこで研究代表者の所属する研究班では、下記のように選定した臨床検体 (8 検体) を用いて、まず網羅的解析を行った。

慶應義塾大学病院耳鼻咽喉科を受診した喉頭疾患患者より生検した検体の一部を研究の対象とした。採取した喉頭組織を RNA Later (Applied Biosystems 社) に浸して凍結保存し、組織内の RNA を安定化させた。また同一部位の病理学検査を実施し、組織診断を得た。次に凍結保存した各組織から mirVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems 社) を用いて miRNA を含む totalRNA を抽出し、分光光度計にて OD260/280 を計測し、Bio-Analyzer RNA6000 により、RIN (RNA Integrity Number) を計測して、RNA の質的評価を行った。解析には質的評価の高かった RNA のみを用いた。今回は喉頭腫瘍患者の腫瘍進展範囲を確定するために生検した主病変周囲の正常組織 2 検体と、良性声帯ポリープ 1 検体、前癌病変とされる異型性 2 検体、喉頭癌 3 検体 (うち再発例 1 検体) の計 8 検体を選定し、検討した。各組織の miRNA 発現解析には、Agilent Human miRNA V2 (Agilent Technologies 社) を用いて、723 種類のヒト miRNA について網羅的解析を行った。解析の結果、喉頭癌組織において発現が増加傾向を示す miRNA が 6 種類、減少傾向を示す miRNA が 3 種類あることが分かった。一方で、他領域の悪性腫瘍で特徴的な発現を示したとされる miRNA (miR15, 16, let-7 family etc.) に関しては、一定の傾向を認めなかった。よって頭頸部癌、特に喉頭癌の発症・進展において、特有の miRNAs の関与が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、これらの解析結果をもとに、まず喉頭癌組織において特徴的な傾向を示した miRNAs について、癌の悪性度や発症、

進展との関連について検討する。更には細胞を用いて、発現が増加傾向を示した miRNAs に対して、その作用を抑制する miR inhibitor を、また発現が減少傾向を示した miRNAs に対して、その作用を促進する miR mimic を遺伝子導入することによる腫瘍抑制効果について、細胞増殖の観点から in vitro および in vivo の両者において検討を行う。

現在、miRNA を用いた遺伝子診断法、疾患の病型判定、予後予測あるいは医薬品の開発が期待され、欧米では miRNA の機能解析と医療への応用が試み始められているが、我が国では医学分野での研究は非常に立ち遅れている。このような状況において、頭頸部癌に特異的に発現している miRNA を明らかにすることで、新しい診断・予後予測に関するバイオマーカーの開発が可能となり、またこれらの機能制御を利用したこれまでにない新しい癌治療が可能になると思われる。具体的には、正常組織には発現していないが罹患組織には高発現している miRNA、あるいは正常組織には発現しているが罹患組織では発現が抑制されている miRNA を治療標的とし、これらが疾患の発症あるいは進展に関与することが明らかとなった際には、前者に対して、それらを特異的に機能抑制する antagomiR の開発を行い、後者に対しては、抑制されている miRNA の機能を模倣する agomiR の開発が望ましいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた miRNA 定量的発現解析
研究代表者の所属する研究班では、慶應義塾大学医学部および佐野厚生総合病院の各倫理委員会で承認された多数の喉頭疾患患者の臨床検体 (約 400 検体) を所有している。これらの中から、喉頭腫瘍患者の腫瘍進展範囲を確定するために生検した主病変周囲の組織で、病理診断の結果正常あるいは良性であった組織、喉頭前癌病変 (軽度・中等度・高度異型性組織)、喉頭癌組織 (早期癌から進行癌まで) を 50 検体選択し、喉頭癌組織において発現が増加していた miR455-5p、miR130b*、発現が減少していた miR375 について、TaqMan[®] MicroRNA Assays (Applied Biosystem 社) を用いて、miRNA 定量的発現解析を行う。また喉頭癌を含む頭頸部癌全般において、その組織型の多くが扁平上皮癌であることから、臨床検体以外に 4 種類の扁平上皮癌細胞株 (SAS, Ca9-22, JHU-011, FaDu) を用いて同様に miRNA の定量的発現解析を行い、喉頭癌組織を用いた発現プロファイルと比較検討する。更に、正常部位組織、喉頭良性疾患、喉頭前癌病変、喉頭癌それぞれにおける miRNAs 発現レベルの差および喉頭癌の悪性度と発現レベルの相関について、我々の有する臨床情報をもとに検討する。

(2) miR inhibitor および miR mimic 遺伝子導入による癌細胞増殖抑制・促進効果の検討

(1) の結果より、喉頭癌組織および扁平上皮癌細胞株においてより顕著な発現増加または抑制を認めた miRNAs を選択し、上記 4 種類の扁平上皮癌細胞株にその miR inhibitor または miR mimic を遺伝子導入して細胞の増殖抑制・促進効果について検討を行う。

発現が増加していた miRNA を選択する場合には miR inhibitor を、発現が減少していた miRNA を選択する場合には miR mimic を導入することで増殖の抑制効果が期待される。検討を行う際には、wild type、miR inhibitor negative control、miR mimic negative control を比較条件として設定する。なお miRNA の細胞増殖への関与については、WST assay、鏡検（細胞の占める面積計測）、cell count を用いて評価する。

(3) in vivo における miR inhibitor および miR mimic による癌治療効果の検討

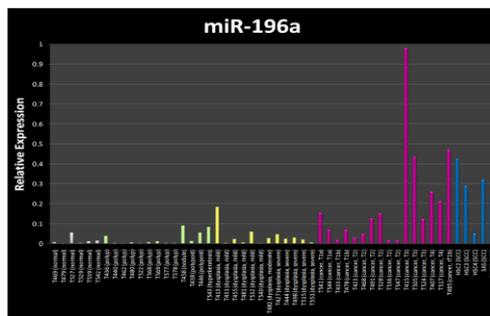
in vitro の実験で miR inhibitor、miR mimic の導入による増殖能の変化を比較した扁平上皮癌細胞をヌードマウスの頸部に異種移植したモデルをを作成し、miR inhibitor あるいは miR mimic を局所投与することによる治療効果の有無を検討する。

具体的には、ヌードマウス (BALB (nu/nu)) の頸部に扁平上皮癌細胞を 5×10^6 個局所投与し、腫瘍が 5mm 大になった時点で miR inhibitor または miR mimic を AteloGene[®] (Koken) とともに局所投与する。これを 6 日間隔で 3 回行い、その後の腫瘍サイズの変化を 3 次元測定にて行う。

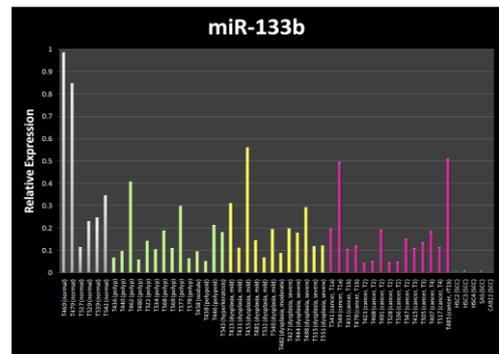
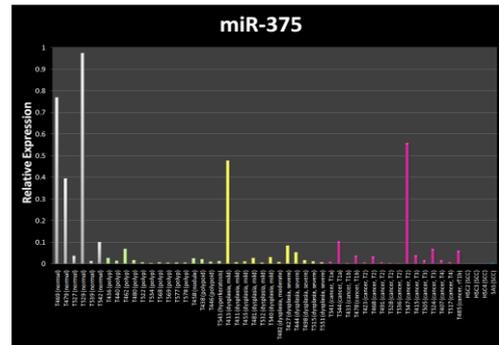
4. 研究成果

(1) miRNA 定量的発現解析

腫瘍の悪性度に関連して miR-196a は増加傾向を、miR-133b および miR-375 は減少傾向を示すことをつきとめた。

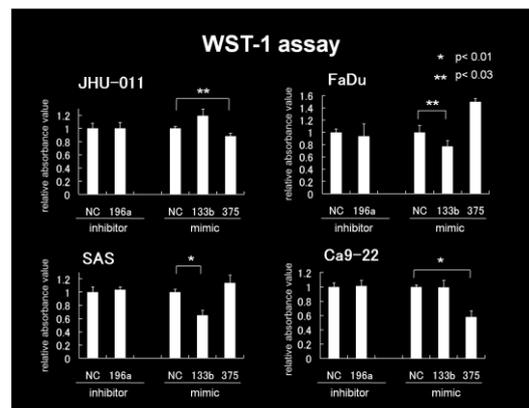


良性 ← → 悪性

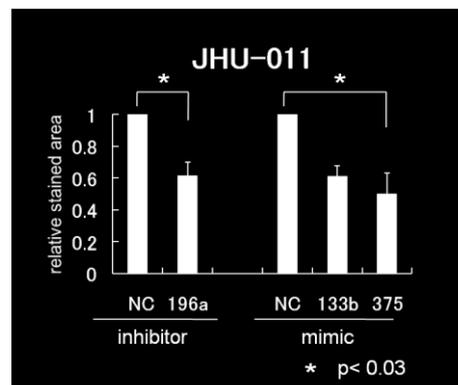


(2) 遺伝子導入による癌細胞増殖抑制効果の検討

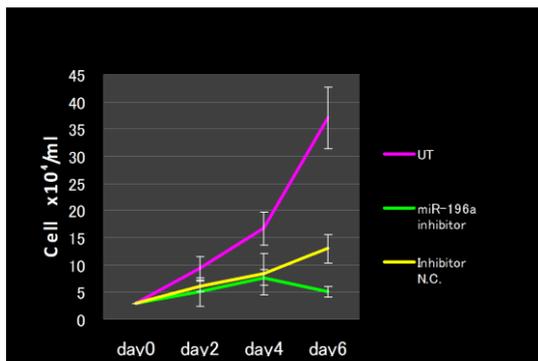
4 種の扁平上皮細胞株において、WST-1 assay ではそれぞれ miR-133b または miR-375 mimic にて細胞増殖抑制を認めた。



鏡検では、JHU-011 にて miR-196a inhibitor, miR-375 mimic の導入で細胞増殖抑制を認めた。

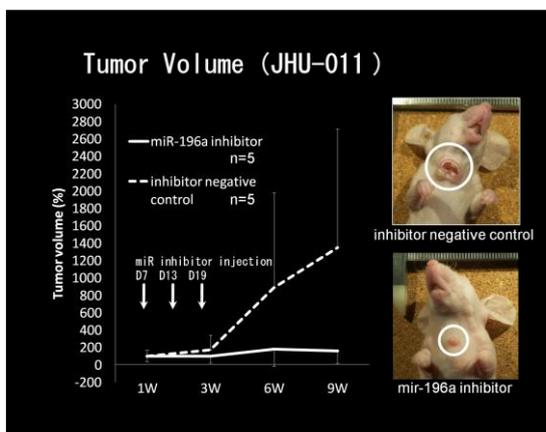


Cell count では、JHU-011 において、miR-196a inhibitor 導入による細胞増殖抑制を認めた。



(3) in vivo における miR inhibitor および miR mimic による癌治療効果の検討

JHU-011 腫瘍モデルにおいて、miR-196a inhibitor 導入による腫瘍抑制効果を認めた。



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0件)

〔学会発表〕(計3件)

① 稲垣康治、齋藤康一郎、宇野光祐、小川郁、座間猛

「頭頸部腫瘍と miRNA(5) —新たな治療標的としての miRNAs—」

日本気管食道科学会 2009年11月5日
横浜

② 宇野光祐、齋藤康一郎、稲垣康治、平沢晃、大久保啓介、座間猛

「頭頸部癌におけるマイクロ RNA」
日本癌学会 2009年10月1日 横浜

③ 稲垣康治、齋藤康一郎、長西秀樹、大久保啓介、赤羽智子、平沢晃、座間猛

「喉頭癌におけるマイクロ RNA-3 新たな治

療標的としてのマイクロ RNA」

日本頭頸部癌学会 2009年6月12日 札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：頭頸部腫瘍増殖抑制剤

発明者：座間猛、齋藤康一郎、平沢晃、稲垣康治

権利者：慶應義塾大学

種類：特許権

番号：特願2009-270157

出願年月日：21年11月27日

国内外の別：国内

名称：頭頸部腫瘍増殖抑制剤

発明者：座間猛、齋藤康一郎、平沢晃、稲垣康治

権利者：慶應義塾大学

種類：特許権

番号：PCT/JP 2010/002764

出願年月日：22年4月16日

国内外の別：国外

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 康治 (INAGAKI KOJI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70348738

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし