

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：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791561

研究課題名（和文） 頭頸部癌細胞におけるマイクロ RNA 活性化機序の解明

研究課題名（英文） activation of micro-RNA in head and neck cancer cell

研究代表者

加納 里志（KANO SATOSHI）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00374421

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌細胞を用いて、TRIM32 に特異的に結合するマイクロ RNA を網羅的に同定し、そのマイクロ RNA が TRIM32 によって活性化されているかを解析することを目的とした。その結果、TRIM32 に特異的に結合するマイクロ RNA として has-miR-134 を同定した。has-miR-134 は舌癌での高発現が報告されており、そのターゲット遺伝子として VEGF-A と ABCC1 が候補に考えられた。しかし、TRIM32 による has-miR-134 の活性化は確認できなかった。また、TRIM32 を過剰発現させた細胞株、またはノックダウンさせた細胞株でも has-miR-134 の活性化、発現量の変化を確認できなかった

研究成果の概要（英文）：has-miR-134 was identified as a micro RNA specifically binding to TRIM32. has-miR-134 has been reported to express highly in tongue cancer. VEGF-A and ABCC1 were considered as the target gene of has-miR-134. However, we could not confirm an activation of has-miR-134 by TRIM32. Furthermore, we could not confirm an activation and change in the expression level of has-miR-134 in cell lines overexpressed or knocked down TRIM32.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：頭頸部癌、マイクロ RNA、TRIM32

1. 研究開始当初の背景
タンパク質をコードしていない小さなサイズの一本鎖 RNA であるマイクロ RNA は、タンパク質への翻訳の阻害やターゲット

mRNA の安定性に影響を与えることで、遺伝子発現を制御するといわれている。ヒトでは数百種類のマイクロ RNA が報告されており、それぞれのマイクロ RNA が複数のターゲット

ト遺伝子を制御しているとされる。その結果、発生、分化、代謝、アポトーシス、増殖、腫瘍形成など様々な領域でマイクロ RNA がその制御に関与していることが明らかになってきている。頭頸部癌においても、網羅的なプロファイリングにより数種類のマイクロ RNA の発現亢進または発現抑制が報告されている。

これまでに我々は頭頸部扁平上皮癌細胞における TRIM32 の分子生物学的機能解析を行ってきた。頭頸部扁平上皮癌組織では正常組織に比べ TRIM32 の発現が亢進していることを明らかにし、そして、TRIM32 が細胞増殖、腫瘍形成能および細胞運動能を促進し、抗癌剤であるシスプラチンによるアポトーシスを抑制することを新たに発見し報告した。また、我々が行った臨床検体を用いた研究では、TRIM32 の高発現群では低発現群に比べて、有意に腫瘍サイズは大きく、また頸部リンパ節転移例を多く認めた。この臨床データは我々の基礎研究データを裏付ける結果であった。そうした中、2009 年科学雑誌 Cell において TRIM32 が RISC (RNA Induced Silencing Complex) の構成因子である Argonaute-1 と結合することで特定のマイクロ RNA の機能を活性化するという報告が掲載された。

2. 研究の目的

本研究では、頭頸部癌細胞において TRIM32 が活性化を制御するマイクロ RNA を同定し、そのマイクロ RNA の活性化がおよぼす癌細胞への影響を明らかにすること目的とした

3. 研究の方法

(1)頭頸部癌細胞を用いて、TRIM32 に特異的に結合するマイクロ RNA をリアルタイム PCR 法により網羅的に同定する。

(2)同定されたマイクロ RNA が TRIM32 によって活性化されているかをルシフェラーゼアッセイによって検討する。

(3)同定されたマイクロ RNA のターゲット遺伝子を同定する。

(4)哺乳類細胞に同定されたマイクロ RNA および TRIM32 を形質導入し、細胞機能に及ぼす影響を検討する。

(5)臨床標本を用いて、マイクロ RNA とそのターゲットタンパク質、および TRIM32 の発現をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法により解析し、臨床的データ(癌の進行度、予後など)と比較検討する。

4. 研究成果

(1)頭頸部癌細胞を用いた網羅的解析により TRIM32 に特異的に結合するマイクロ RNA として has-miR-134 を同定した。

(2)has-miR-134 は舌扁平上皮癌で発現が亢進していることが報告されている。

(*Human Cancer Biology, 2008*)

(3)miRBaseを用いて has-miR-134 のターゲット遺伝子を検索したところ、血管内皮細胞増殖因子である VEGF-A と MRP1 (Multidrug resistance-associated protein 1)と呼ばれる癌の多剤耐性の原因の一つである膜タンパク質 ABCC1 (ATP-binding cassette transporter, sub-family C, member 1)がターゲット遺伝子の候補として考えられた。

(4)ルシフェラーゼアッセイにより miR-134 の活性化を調べたが、活性化は確認できなかった。さらに、細胞株を変更して同じく実験を行ったが同様の結果であった。

(5)TRIM32 を過剰発現させた細胞株、またはノックダウンさせた細胞株でも miR-134 の活性化、発現量の変化を確認できなかった。

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 13 件)

- (1) Kano S, Homma A, Hayashi R, Kawabata K, Yoshino K, et al : Salvage surgery for recurrent oropharyngeal cancer after chemoradiotherapy. *Int J Clin Oncol*, Epub ahead of print, 2012 (査読あり)
- (2) Mizumachi T, Kano S, Sakashita T, Hatakeyama H, Suzuki S, et al. : Improved survival of Japanese patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*, Epub ahead of print, 2012 (査読あり)
- (3) Taki S, Homma A, Suzuki F, Oridate N, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, et al. : Combined modality therapy for laryngeal cancer with superselective intra-arterial cisplatin infusion and concomitant radiotherapy. *Int J Clin Oncol* 17, 441-446, 2012 (査読あり)
- (4) Sakashita T, Homma A, Oridate N, Hatakeyama H, Kano S, et al. : Evaluation of nodal response after intra-arterial chemoradiation for node-positive head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 269, 1671-1676, 2012 (査読あり)
- (5) Sakashita T, Homma A, Oridate N, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, et al. : Platinum concentration in sentinel lymph nodes after preoperative intra-arterial cisplatin chemotherapy targeting primary tongue cancer. *Acta Otolaryngol* 132, 1121-1125, 2012 (査読あり)
- (6) 加納里志, 折館伸彦, 福田 諭 : ESD 後に反復感染をきたし喉頭全摘に至った 1 症例. 日気食会 63, 331-336, 2012

(査読あり)

- (7) 本間明宏, 折館伸彦, 鈴木清護, 鈴木章之, 畠山博充, 加納里志他 : 切除可能 T3、T4 上顎洞扁平上皮癌における手術の位置付け—当院における治療戦略. 耳鼻 58, S52-S56, 2012 (査読あり)
- (8) 水町貴論, 折館伸彦, 本間明宏, 坂下智博, 加納里志他 : 喉頭癌 T3 症例の治療成績の検討. 頭頸部外科 22, 317-321, 2012 (査読あり)
- (9) 倉本倫之介, 折館伸彦, 本間明宏, 及川敬太, 藤田 香, 鈴木清護, 畠山博充, 加納里志他 : 頭頸部癌化学放射線療法における経管栄養の役割に関する検討. 嚥下医学 1, 359-363, 2012 (査読あり)
- (10) 坂下智博, 本間明宏, 折館伸彦, 鈴木清護, 畠山博充, 加納里志他 : <第 13 回耳鼻咽喉科手術支援システム・ナビ研究会> 早期舌癌におけるセンチネルリンパ節の領域分布に関する検討. 耳展 55, 364-368, 2012 (査読あり)
- (11) 加納里志, 本間明宏, 折館伸彦, 鈴木章之, 畠山博充他 : 【Best articles of the year】舌根癌における放射線同時併用超選択的動注化学療法 北海道医誌 87, 208, 2012 (査読なし)
- (12) 坂下智博, 本間明宏, 折館伸彦, 鈴木清護, 畠山博充, 加納里志他 : 【Best articles of the year】口腔癌における超選択的シスプラチン動注化学療法後のセンチネルリンパ節内プラチナ濃度測定. 北海道医誌 7, 261, 2012 (査読なし)
- (13) Kano S : Superselective arterial cisplatin infusion with concomitant radiation therapy for base of tongue cancer. *Oral Oncology* 47, 665-670, 2011 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Kano S : Matched-pair analysis in patients with advanced oropharyngeal cancer: surgery versus concurrent chemoradiotherapy. 第 8 回国際頭頸部癌学会 (8th International Conference on Head and Neck Cancer, 2012 年 7 月

24 日, Metro Toronto Convention
Centre (Toronto, Canada)

- (2) **加納里志** : 原発不明頸部リンパ節転移における p16 とヒト乳頭腫ウイルスの解析. 第 36 回日本頭頸部癌学会, 2012 年 6 月 7 日 日島根県民会館 (松江市)
- (3) **加納里志** : 照射後の異時重複下咽頭癌に対する ESD 後に反復感染をきたし喉頭全摘に至った一症例. 第 63 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会, 2011 年 11 月 11 日, 名古屋東急ホテル (名古屋市)
- (4) **加納里志** : 唾液腺悪性腫瘍における EGFR, HER2, c-KIT の発現解析. 第 35 回頭頸部癌学会, 2011 年 6 月 9 日, ウィンク あいち愛知 (産業労働センター) (名古屋市)
- (5) **Kano S**: TRIM32 facilitates cell growth, migration and anti-apoptosis. 第 102 回米国癌研究会議(AACR 102nd Annual Meeting), 2011 年 4 月 5 日, Orange County Convention Center(USA),
- (6) **加納里志** : 中咽頭側壁・前壁癌に対する放射線化学療法の検討. 第 23 回日本口腔・咽頭科学会総会学術講演会, 2010 年 9 月 17 日 京王プラザホテル (東京都)
- (7) **加納里志** : Concurrent chemoradiotherapy for oropharyngeal cancer: A retrospective comparison of superselective high-dose cisplatin infusion and systemic chemotherapy. IFHNOS (第 4 回国際頭頸部腫瘍学会議), 2010 年 6 月 17 日, ロッテホテル (ソウル)

[図書] (計 1 件)

- (1) **加納里志**, 他: 東京医学社, 特集 嗅神経芽細胞腫, JOHNS Vol.26No.3, 2010, 402-3

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

加納 里志 (KANO SATOSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 00374421