

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10801

研究課題名(和文) 治療抵抗性頭頸部癌における機能性RNA分子経路の解明と革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies in head and neck squamous cell carcinoma based on microRNA-mediated cancer pathways

研究代表者

関 直彦 (SEKI, NAHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50345013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌臨床検体を用いて、RNAシーケンスにより、マイクロRNA発現プロファイルを作成した。頭頸部扁平上皮癌において発現変動するマイクロRNAを160種類(発現亢進44種類、発現抑制116種類)同定した。プロファイルより、癌組織で発現が抑制されているマイクロRNA、miR-150-5pおよびmiR-150-3pに着目し、これらマイクロRNAの機能解析と、マイクロRNAが制御する分子経路の探索を行った。機能解析から、これらマイクロRNAは、癌抑制機能を有しており、インテグリンファミリー(ITGA3およびITGA6)を直接制御している事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we construct the microRNA (miRNA) expression signature of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Our signature revealed that a total of 160 miRNAs (44 upregulated and 116 downregulated) were aberrantly expressed in cancer tissues. Expression of miR-150-5p (guide strand miRNA) and miR-150-3p (passenger strand miRNA) were significantly silenced in cancer tissues. Ectopic expression of mature miRNAs, miR-150-5p and miR-150-3p inhibited cancer cell aggressiveness. We identified that integrin 3 (ITGA3) and integrin 6 (ITGA6) were coordinately regulated by these miRNAs in HNSCC cells.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：マイクロRNA 頭頸部扁平上皮癌 癌抑制遺伝子 インテグリン 発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

(1) ポストゲノムシーケンス時代における頭頸部扁平上皮癌： ヒトゲノム解析研究の成果として、ヒト細胞中には極めて多くの蛋白に翻訳されない RNA 分子が転写されている事が明らかとなった。最近の研究から、これらの RNA 分子は、RNA 分子のまま、生体内で様々な機能を有している事が明らかになりつつある。マイクロ RNA は、機能性 RNA 分類される 19~22 塩基の低分子 RNA である。この RNA 分子は、最終的に 1 本鎖の RNA 分子として機能し、機能性 RNA (蛋白コード・非蛋白コード遺伝子) の翻訳阻害や直接分解によりその発現制御をしている。マイクロ RNA の特徴として、1 種類のマイクロ RNA は、数十~数百種類の機能性 RNA の発現を制御している事から、マイクロ RNA の発現異常は、細胞内の機能性 RNA 分子ネットワークの破綻を引き起こし、ヒト癌を含む様々な疾患に関与している事が報告されている。

(2) 治療抵抗性に至った頭頸部扁平上皮癌の治療： 頭頸部扁平上皮癌の臨床において、最近の集学治療により治療生成は向上している。しかしながら、局所再発症例や遠隔転移を有する進行症例の治療は難渋する。最近、治療適応が認められた分子標的治療薬 (cetuximab) ・放射線療法でさえも効果は限定的であり、進行症例を完治するには至っていない。更に、癌細胞は治療過程で、治療抵抗性を獲得し、局所再発症例や遠隔転移を始める。このような症例に対する有効な治療法は無く、治療抵抗性に至った患者の予後は極めて不良である。治療抵抗性を獲得した癌細胞や、遠隔転移をきたした癌細胞内の機能性 RNA ネットワークを探索する事は、これら癌細胞の治療標的 (活性化している分子経路) を探索する事になる。活性化している分子経路を遮断する戦略は、治療抵抗性を獲得した癌細胞の新たな治療法の開発に繋がると考

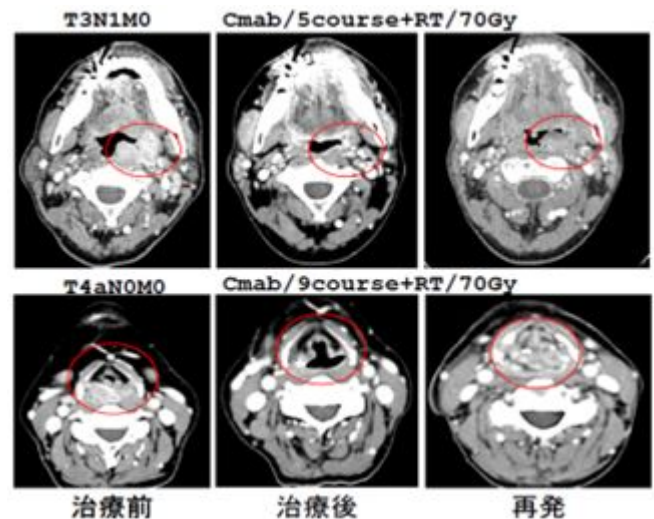
える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、頭頸部扁平上皮癌の治療抵抗獲得に関わる分子経路を探索する事である。そのために、治療抵抗を獲得した頭頸部扁平上皮癌・臨床検体を用いて、マイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、治療抵抗獲得に関わる機能性 RNA ネットワークの探索を行う。治療抵抗性獲得に関わる分子経路を遮断する戦略を考案する事は、癌治療の新たな治療法の開発に有用な情報を提供すると考える。

3. 研究の方法

(1) 初回の、分子標的薬・放射線治療後に再発した頭頸部扁平上皮癌組織から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、全ゲノムを対象としたマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。シーケンスは、イルミナ社のゲノムアナライザー II X を用いて、各サンプルにおいて、1000 万リード数以上の解析を行った。

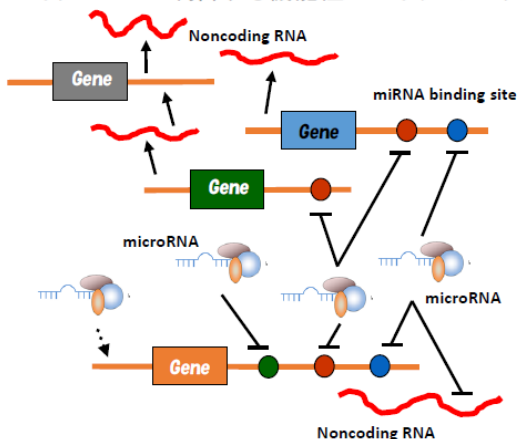


(2) 頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルに基づいて、癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA を癌細胞に核酸導入し、細胞の増殖能、浸潤能、遊走能について検討する。この解析から、頭頸部扁平上皮癌・癌抑制型マイクロ RNA を探索する。

(3) 癌抑制機能が明らかになったマイクロ RNA について、マイクロ RNA が制御する分子ネットワークを探索する。探索には、マイク

口 RNA を導入した細胞を用いた遺伝子発現解析と、マイクロ RNA データベースを駆使して、候補となる遺伝子を選択する。選択された遺伝子は、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイにより、マイクロ RNA と遺伝子の結合について調べる。

マイクロRNAが制御する機能性RNAネットワーク



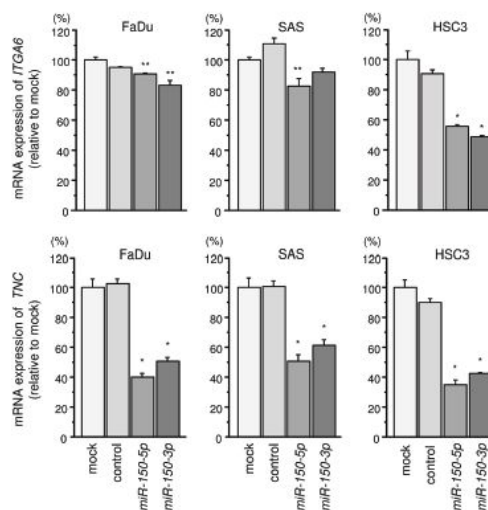
(4) 癌抑制型マイクロ RNA が、直接制御する遺伝子については、siRNA を用いた機能解析から、頭頸部扁平上皮癌における癌促進機能を評価する。

4. 研究成果

(1) 頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロフィール： これまでの概念では、マイクロ RNA の生合成において、pre-miRNA から 2 本鎖の miRNA duplex が形成される。そして、guide strand が RISC タンパクに取り込まれ標的遺伝子の制御を行う。これに対して、反対鎖の passenger strand は、分解され機能を有しないとされている。今回作成した、頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロフィールには、多数の、passenger strand マイクロ RNA が存在している事が明らかとなった。miR-145-3p、miR-150-3p、miR-199a-3p は、癌組織で有意に発現が抑制されていた。passenger strand マイクロ RNA に関する頭頸部扁平上皮癌の報告は、殆ど存在しない。これらマイクロ RNA が制御する分子ネットワークを探索する事から、頭頸部扁平上皮癌の新たな分子ネットワークが探索できると考え

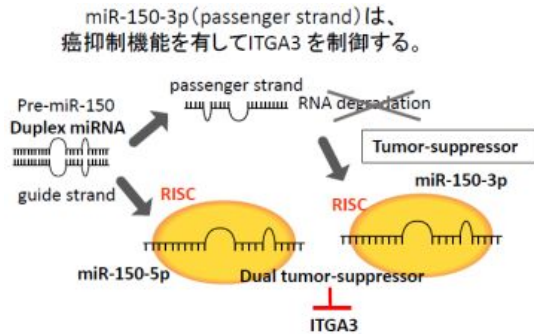
る。

(2) 頭頸部扁平上皮癌における miR-150-5p および miR-150-3p の機能解析： プロファイル中に、passenger strand である、miR-150-3p と、guide strand である miR-150-5p が存在している事に着目した。頭頸部扁平上皮癌・臨床検体で発現を調べた結果、両 miRNA 共に、癌組織において、有意に発現が抑制されている事を認めた。miR-150-5p および miR-150-3p を癌細胞株 (SAS、FaDu) に核酸導入した結果、両マイクロ RNA 共に、癌細胞の遊走能、浸潤能を顕著に抑制した。これらの結果から、miR-150-5p および miR-150-3p は、頭頸部扁平上皮癌において、癌抑制型マイクロ RNA である事が明らかとなった。



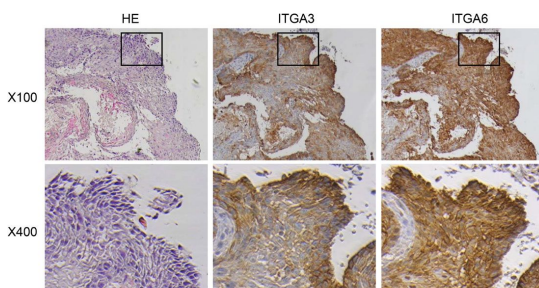
(3) マイクロ RNA が制御する分子ネットワークの探索： 1 種類のマイクロ RNA は、細胞内で、極めて多くの機能性 RNA を制御しているため、マイクロ RNA を起点として、細胞内の分子ネットワークの探索が可能である。miR-150-5p および miR-150-3p が制御する分子経路を探索した結果、両マイクロ RNA は、Focal adhesion に関与する分子を制御する事が明らかになった。更に、細胞外マトリックス受容体であるインテグリン (ITGA3 および ITGA6) を直接制御している事が明らかとな

った。



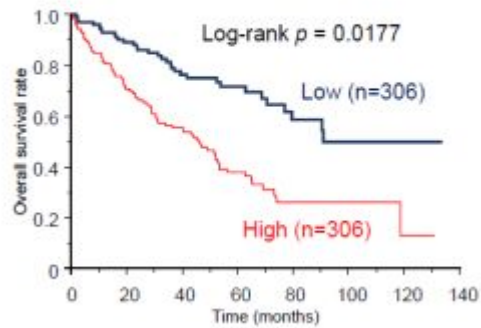
(4) 細胞外マトリックス受容体、ITGA3 および ITGA6 の機能解析： 頭頸部扁平上皮癌における ITGA3 および ITGA6 の機能を調べるため、癌細胞株 (SAS、FaDu) に siRNA を導入し (ITGA3 および ITGA6 をノックダウン)、細胞の増殖能、浸潤能、遊走能について検討を行った。その結果、ITGA3 および ITGA6 をノックダウンする事により、癌細胞の遊走能、浸潤能の顕著な抑制を認めた。また、リン酸化 ERK やリン酸化 SRC の抑制も認めた。この事から、ITGA3 および ITGA6 を介した癌シグナルの活性化が、頭頸部扁平上皮癌細胞の遊走、浸潤に重要な影響を及ぼしている事が明らかとなった。

(5) ITGA3 および ITGA6 の発現と頭頸部扁平上皮癌・臨床病理学的解析： 頭頸部扁平上皮癌・臨床検体で ITGA3 および ITGA6 の発現を調べた結果、mRNA レベル、蛋白レベルで、ITGA3 および ITGA6 の高発現を認めた。



更に、The Cancer Genome Atlas データベース解析から、ITGA3 および ITGA6 の高発現患者群は、低発現患者群に比べ、有意に生存期間が短い事が明らかとなった。

ITGA3は、頭頸部扁平上皮癌患者の予後規定因子である



頭頸部扁平上皮癌臨床検体を用いたマイクロ RNA 発現プロファイルから、癌抑制型マイクロ RNA として、miR-150-5p および miR-150-3p の存在を明らかとした。これらマイクロ RNA は、細胞外マトリックス受容体であるインテグリンを直接制御する事を証明した。インテグリンの高発現は、頭頸部扁平上皮癌の遊走、浸潤に関連していた。更に、これら遺伝子は、頭頸部扁平上皮癌の予後予測マーカーになる可能性が示された。これまで、機能を有しないとされていた、passenger strand である miR-150-3p が、癌抑制効果を有する事は今回の報告が最初であり、マイクロ RNA 研究の新しい展開である。

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 35 件)

(1) 著者名: Koshizuka K, Kikkawa N, Hanazawa T, Yamada Y, Okato A, Arai T, Katada K, Okamoto Y, Seki N.

論文標題: Inhibition of integrin

1-mediated oncogenic signalling by the antitumor *microRNA-29* family in head and neck squamous cell carcinoma.

雑誌名: *Oncotarget*

査読有、巻 11 発行年 2018 最初と最後の頁 3663-3676.

doi:10.18632/oncotarget.23194.

(2) 著者名: Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Katada K, Okato A, Arai T, Idichi T, Osako Y, Okamoto Y, Seki N.

論文標題: Antitumor miR-150-5p and miR-150-3p inhibit cancer cell

aggressiveness by targeting SPOCK1 in head

and neck squamous cell carcinoma.
雑誌名 : Auris Nasus Larynx
査読有、巻 45 発行年 2018 最初と最後の
頁 854-865.
doi: 10.1016/j.anl.2017.11.019.

(3) 著者名 : Yamada Y, Koshizuka K,
Hanazawa T, Kikkawa N, Okato A, Idichi T,
Arai T, Sugawara S, Katada K, Okamoto Y,
Seki N.
論文標題 : Passenger strand of miR-145-3p
acts as a tumor-suppressor by targeting
MYO1B in head and neck squamous cell
carcinoma.
雑誌名 : International Journal of
Oncology
査読有、巻 52 発行年 2018 最初と最後の
頁 166-178.
doi: 10.3892/ijo.2017.4190.

(4) 著者名 : Koshizuka K, Hanazawa T,
Kikkawa N, Arai T, Okato A, Kurozumi A,
Kato M, Katada K, Okamoto Y, Seki N.
論文標題 : Regulation of ITGA3 by the
anti-tumor miR-199 family inhibits cancer
cell migration and invasion in head and
neck cancer.
雑誌名 : Cancer Science
査読有、巻 108 発行年 2017 最初と最後の
頁 1681-1692.
doi: 10.1111/cas.13298.

(5) 著者名 : Koshizuka K, Nohata N,
Hanazawa T, Kikkawa N, Arai T, Okato A,
Fukumoto I, Katada K, Okamoto Y, Seki N.
論文標題 : Deep sequencing-based microRNA
expression signatures in head and neck
squamous cell carcinoma: dual strands of
pre-miR-150 as antitumor miRNAs.
雑誌名 : Oncotarget
査読有、巻 8 発行年 2017 最初と最後の頁
30288-30304.
doi: 10.18632/oncotarget.

(6) 著者名 : Koshizuka K, Hanazawa T, Arai
T, Okato A, Kikkawa N, Seki N.
論文標題 : Involvement of aberrantly
expressed microRNAs in the pathogenesis of
head and neck squamous cell carcinoma.
雑誌名 : Cancer Metastasis Review
査読有、巻 36 発行年 2017 最初と最後の
頁 525-545.

[学会発表](計 10 件)
発表代表者 : Koshizuka K.
発表標題 : Deep-sequencing based microRNA
expression signature in head and neck
squamous cell carcinoma: dual-strand of
microRNA-150 act as tumor-suppressors.
学会名 : AACR Annual Meeting 2017

発表月日 : April 1 - 5, 2017
発表場所 : Washington, D.C., USA

[その他]
ホームページ等
千葉大学、大学院医学研究院、機能ゲノム学
ホームページ : <http://genomejet.jp/>

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
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