

令和元年6月12日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11224

研究課題名(和文) 治療抵抗性頭頸部扁平上皮癌において活性化されている機能性RNA分子経路の探索

研究課題名(英文) Identification of activated molecular pathways involved in treatment-resistant head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

吉川 直子 (KIKKAWA, NAKO)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50400924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌の治療において、局所再発や遠隔転移の制御を含めた治療抵抗性の克服は非常に重要な課題である。近年、頭頸部扁平上皮癌の新たな治療戦略として、EGFR阻害剤が登場した。しかし、治療過程において癌細胞は治療抵抗性を獲得し、再発や遠隔転移をきたす。治療抵抗性に至った癌細胞を最新のゲノム学手法で解析し、再発および遠隔転移の分子メカニズムを解明し理解する事が必要である。低分子RNAであるマイクロRNAの発現異常は、癌の進展、転移、薬剤耐性に関与している。マイクロRNAを起点とした機能性RNAネットワーク解析から、頭頸部扁平上皮癌の治療抵抗性に関わる分子経路を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮癌において、局所再発や遠隔転移をきたした患者の治療は非常に困難である。近年開発された分子標的治療薬も、その効果は限定的であり、新規治療法の開発は急務である。本研究では、治療抵抗性を獲得した頭頸部扁平上皮癌・臨床検体から、次世代シーケンサーを用いてマイクロRNA発現プロファイルを作成した。作成されたマイクロRNA発現プロファイルには、これまでに機能が明らかになっていないマイクロRNAが多数含まれており、今後の研究のランドマークとなる事が期待できる。本プロファイルに基づき、治療抵抗性に関与する分子経路を明らかにした事は、新規治療法の開発へ向けて重要な知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：For patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), survival rates have not improved due to local recurrence and distant metastasis. The epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies are not considered curative for HNSCC. Therefore, it is necessary to use advanced genomic approaches to elucidate the molecular mechanisms underlying the aggressiveness of HNSCC cells. The microRNAs (miRNAs) belong to a family of small non-coding RNAs. Function of miRNA is a fine-tuner that expression of protein coding/noncoding RNAs by repressing translation or cleaving RNA transcripts in a sequence-dependent manner. The presence of dysregulated miRNA can disturb entire RNA networks. Numerous studies have shown that miRNAs are aberrantly expressed in several cancers, including HNSCC. Novel miRNA-based approaches for HNSCC can be used to identify potential targets for the development of new therapeutic strategies.

研究分野：頭頸部扁平上皮癌

キーワード：マイクロRNA 癌抑制遺伝子 頭頸部扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1-1) 頭頸部扁平上皮癌の臨床的背景

厚生労働省の報告によると、口腔および咽頭の悪性新生物による死亡者数は、過去 30 年間で 3.7 倍に増加しており、その症状の出現が遅い下咽頭癌などでは、初診時に進行癌である症例もしばしば遭遇する。頭頸部扁平上皮癌の治療課題である局所制御と臓器機能温存の両立を図るために、手術療法に加え、放射線療法や化学療法が開発され、治療成績の向上が認められてきている。しかしながら、進行症例や遠隔転移をきたした症例の予後は未だ極めて不良であり、これら症例に対する有効な治療法が求められている。この様な中、2012 年に上皮成長因子受容体 (EGFR) をブロックする事で癌細胞の増殖を阻害する分子標的薬 (セツキシマブ) の使用が認可され、局所進行例や再発・転移例に使用され始めた。治療効果が良好な症例がいる一方、治療効果が乏しい症例が存在する事も事実である。又、セツキシマブ治療後に局所再発や遠隔転移を起こした症例では、治療抵抗性を獲得していると考えられる。

(1-2) マイクロ RNA 研究の背景

マイクロ RNA とよばれる 19-23 塩基の小さな RNA 分子がヒトの発生・分化などの過程に重要な影響を及ぼすことが報告され注目されている。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 (タンパクコード・非タンパクコード遺伝子) の翻訳阻害や直接分解によりその発現制御をしている。1 つのマイクロ RNA は、極めて多くの機能性 RNA の発現を制御するため、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。ヒトゲノム中の 60% のタンパクコード遺伝子は、マイクロ RNA による発現制御を受けている。そのため、マイクロ RNA の発現異常は、ヒト癌を含む様々な疾患に関与している。癌研究において、世界規模でマイクロ RNA の研究が進んでおり、頭頸部癌を含め、癌細胞で発現異常を認めるマイクロ RNA を指標にして、その機能解析が相次いで報告されている。

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性の分子メカニズムをマイクロ RNA を基点として明らかにすること、更に、治療抵抗性頭頸部扁平癌の増殖や転移を抑制する治療戦略を考案することである。

3. 研究の方法

セツキシマブ・放射線治療後に局所再発や遠隔転移を起こした、頭頸部扁平上皮癌臨床検体から、次世代シーケンサーを用いて、発現異常を示したマイクロ RNA をプロファイリングする。マイクロ RNA の機能解析と、マイクロ RNA が制御する機能性 RNA ネットワーク解析を行う。

「治療抵抗性頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づき、癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA について、マイクロ RNA を核酸導入する事により、機能解析を施行し、癌抑制機能をもつ「癌抑制型マイクロ RNA」を探索する。

「癌抑制型マイクロ RNA」が制御する機能性 RNA ネットワークを探索し、治療抵抗性頭頸部扁平上皮癌で活性化している分子経路を見出し、発現が亢進している標的「癌促進型遺伝子」を探索する。

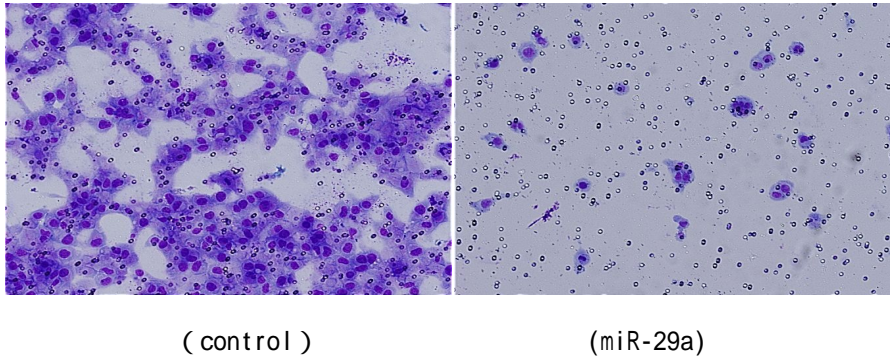
「癌促進型遺伝子」について、その機能解析と、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いて、臨床病理学的な解析を行う。

4. 研究成果

(4-1) マイクロ RNA (miR-29-family: miR-29a, miR-29b, miR-29c) の機能解析

頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルより、癌組織で発現が抑制されている、

miR-29-family: miR-29a, miR-29b, miR-29c に注目し、その癌抑制機能を検討した。頭頸部扁平上皮癌細胞株にこれらマイクロ RNA を導入する事により、癌細胞の遊走能、浸潤能(図 1)を抑制した事から、これらマイクロ RNA は、癌抑制型マイクロ RNA である事を証明した。

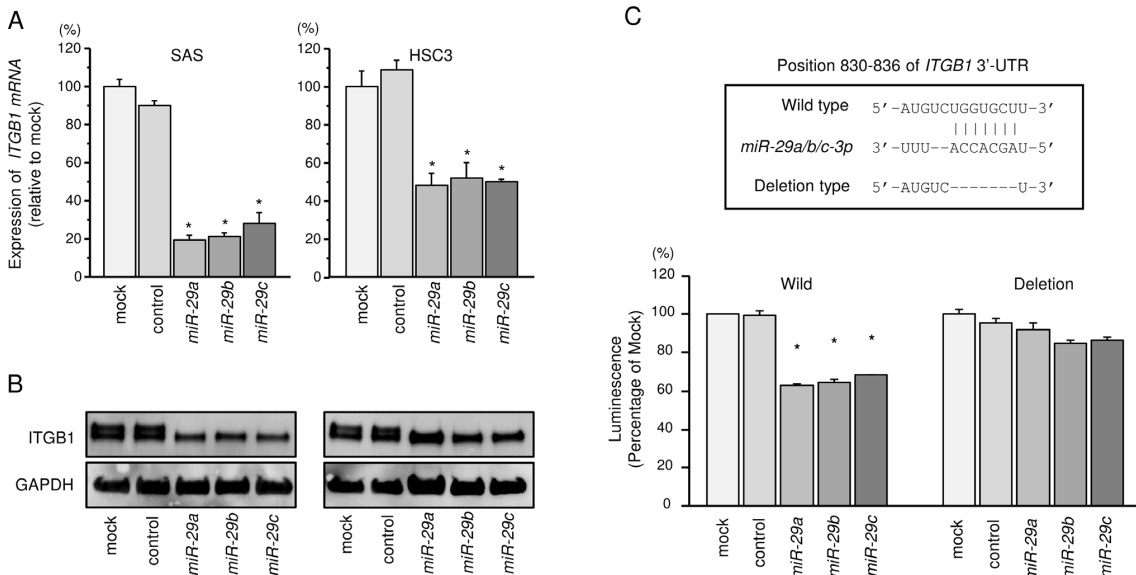


(図 1) Matrigel invasion assays

miR-29a を導入して 48 時間後、細胞浸潤が明らかに抑制された。

(4-2) miR-29-family が制御する機能性 RNA ネットワークの解析

miR-29-family が制御する分子ネットワークを探索し、Focal adhesion 経路に含まれる細胞外マトリックス受容体である ITGB1 (integrin beta-1) を、標的遺伝子として抑制している事を見出した(図 2)。



(図 2)

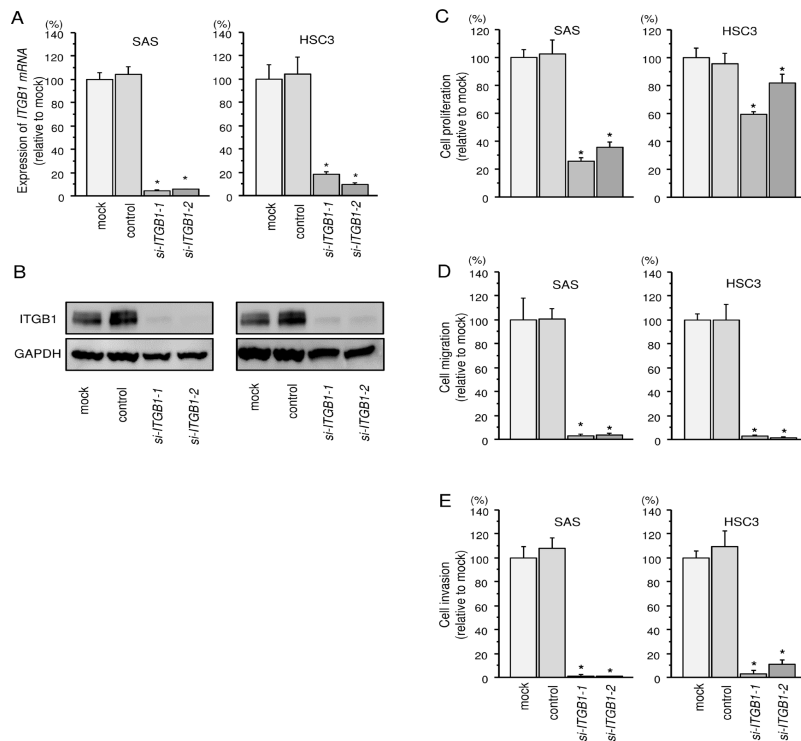
A: miR-29-family を導入して 72 時間後、ITGB1 mRNA 発現が抑制された。

B: 同様に、ITGB タンパク発現も抑制された。

C: luciferase reporter assays により、miR-29family が ITGB1 を直接制御している事が判明した。

(4-3) miR-29-family の標的分子 ITGB1 の機能解析

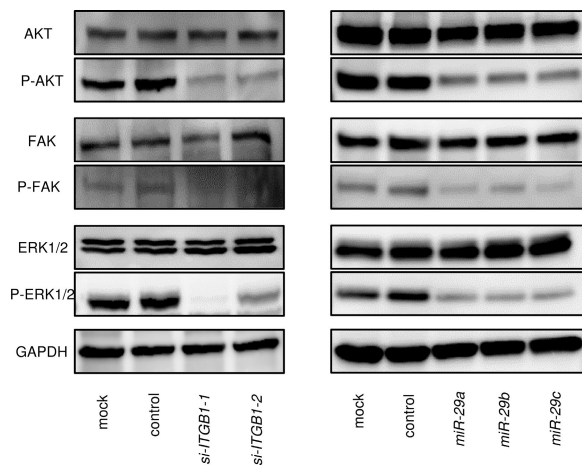
ITGB1 は頭頸部扁平上皮癌で高発現している事を確認した。また、ITGB1 は、癌促進機能を有する事が明らかになった(図 3)。さらに、ITGB1 のノックダウンにより、AKT, FAK, ERK1/2 のリン酸化が阻害された事を確認した(図 4)。この経路は、頭頸部扁平上皮癌において、今後の治療標的になり得ると考えられる。



(図3)

A B : mRNA およびタンパクレベルで siITGB1-1、siITGB1-2 の効果を確認した。

C D E : siITGB1 により、それぞれ、細胞増殖、遊走、浸潤が抑制された。



(図4)

siITGB1 により、AKT,FAK,ERK1/2 のリン酸化が阻害された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件) 全て英文査読あり

Misono S, Seki N, Mizuno K, Yamada Y, Uchida A, Sanada H, Moriya S, Kikkawa N, Kumamoto T, Suetsugu T, Inoue H.

Molecular Pathogenesis of Gene Regulation by the *miR-150* Duplex: *miR-150-3p* Regulates *TNS4* in Lung Adenocarcinoma.

Cancers (Basel). 2019 Apr 30;11(5). pii: E601. doi: 10.3390/cancers11050601.

Regulation of *KIF2A* by Antitumor *miR-451a* Inhibits Cancer Cell Aggressiveness Features in Lung Squamous Cell Carcinoma.

Uchida A, Seki N, Mizuno K, Yamada Y, Misono S, Sanada H, Kikkawa N, Kumamoto T, Suetsugu

T, Inoue H.

Cancers (Basel). 2019 Feb 22;11(2). pii: E258. doi: 10.3390/cancers11020258.

Involvement of dual-strand of the miR-144 duplex and their targets in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma.

Uchida A, Seki N, Mizuno K, Misono S, Yamada Y, Kikkawa N, Sanada H, Kumamoto T, Suetsugu T, Inoue H.

Cancer Sci. 2019 Jan;110(1):420-432. doi: 10.1111/cas.13853. Epub 2018 Dec 6.

Antitumor miR-150-5p and miR-150-3p inhibit cancer cell aggressiveness by targeting SPOCK1 in head and neck squamous cell carcinoma.

Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Katada K, Okato A, Arai T, Idichi T, Osako Y, Okamoto Y, Seki N.

Auris Nasus Larynx. 2018 Aug;45(4):854-865. doi: 10.1016/j.anl.2017.11.019. Epub 2017 Dec 9.

Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MYO1B in head and neck squamous cell carcinoma.

Yamada Y, Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Okato A, Idichi T, Arai T, Sugawara S, Katada K, Okamoto Y, Seki N.

Int J Oncol. 2018 Jan;52(1):166-178. doi: 10.3892/ijo.2017.4190. Epub 2017 Nov 6.

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

Koshizuka K, Kikkawa N, Hanazawa T, Yamada Y, Okato A, Arai T, Katada K, Okamoto Y, Seki N.

Oncotarget. 2017 Dec 11;9(3):3663-3676. doi: 10.18632/oncotarget.23194. eCollection 2018 Jan 9.

Involvement of aberrantly expressed microRNAs in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma.

Koshizuka K, Hanazawa T, Arai T, Okato A, Kikkawa N, Seki N.

Cancer Metastasis Rev. 2017 Sep;36(3):525-545. doi: 10.1007/s10555-017-9692-y.

Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer.

Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Arai T, Okato A, Kurozumi A, Kato M, Katada K, Okamoto Y, Seki N.

Cancer Sci. 2017 Aug;108(8):1681-1692. doi: 10.1111/cas.13298. Epub 2017 Jul 4.

Deep sequencing-based microRNA expression signatures in head and neck squamous cell carcinoma: dual strands of pre-miR-150 as antitumor miRNAs.

Koshizuka K, Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Arai T, Okato A, Fukumoto I, Katada K, Okamoto Y, Seki N.

Oncotarget. 2017 May 2;8(18):30288-30304. doi: 10.18632/oncotarget.16327.

〔学会発表〕(計 2 件)

吉川直子ほか 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の臨床的検討 (第79回日本耳鼻咽喉科臨床学会 2017年)

吉川直子ほか 次世代シーケンサーを用いた頭頸部扁平上皮癌・マイクロRNA発現プロファイルに基づく新規癌抑制型マイクロRNAの探索 (第41回日本頭頸部癌学会 2017年)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：関直彦

ローマ字氏名：SEKI NAOHIKO

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 50345013

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。