

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11375

研究課題名(和文)革新的治療法開発に向けた治療抵抗性頭頸部癌における機能性RNAネットワークの探索

研究課題名(英文) Identification of drug-resistance related RNA networks in head and neck squamous cell carcinoma cells

研究代表者

花澤 豊行 (HANAZAWA, TOYOYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90272327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌の臨床検体を用いたマイクロRNA発現プロファイルから、miR-99a-5pおよびmiR-99a-3pに着目した。これらマイクロRNAを癌細胞に導入し機能解析を行った結果、癌細胞の遊走能、浸潤能を制御する癌抑制型マイクロRNAであることを確認した。更に、miR-99a-3pが制御する癌促進型遺伝子を探索し、10種類の遺伝子(STAMPB, TIMP4, TMEM14C, CANX, SUV420H1, HSP90B1, PDIA3, MTHFD2, BCAT1, SLC22A15)が、頭頸部扁平上皮癌患者の予後に影響を及ぼしている事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNAは、僅か19塩基～22塩基の1本鎖RNA分子であるが、1種類のマイクロRNAが、極めて多数の蛋白コード遺伝子を制御する事から注目されている。頭頸部扁平上皮癌においても、マイクロRNAの発現異常が、癌の悪性化に深く関与している。本研究では、頭頸部扁平上皮癌において癌抑制機能を有するmiRNA-99a-3pを見出した。更に、その標的分子が、頭頸部扁平上皮癌患者の予後に影響を及ぼしている事を明らかにした。マイクロRNAを起点とした解析手法により、本疾患の分病理学的な理解が深まる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：microRNAs (miRNAs) are a class of functional noncoding RNAs, and aberrant expression of miRNAs is closely related to cancer pathogenesis. One unique feature of miRNAs is that a single miRNA controls the expression of many transcripts. In this study, we focused on both strands of the miR-99a-duplex (miR-99a-5p: the guide strand, and miR-99a-3p: the passenger strand) based on our miRNA signature in HNSCC. Ectopic expression of these miRNAs into cancer cells revealed that both miRNAs significantly blocked cancer cell migration and invasive abilities, suggesting miR-99a-5p and miR-99a-3p acted as antitumor miRNAs in HNSCC cells. Furthermore, we screened miR-99a-3p controlled oncogenes involved in HNSCC pathogenesis. Thirty-two genes were identified as miR-99a-3p-regulated genes, and 10 genes (STAMPB, TIMP4, TMEM14C, CANX, SUV420H1, HSP90B1, PDIA3, MTHFD2, BCAT1, and SLC22A15) significantly predicted 5-year overall survival.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 機能性RNA マイクロRNA 発現プロファイル miR-99a-3p

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、症状の発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。進行症例の 5 年生存率は 30% 程度と依然として予後不良な癌である。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、外科的手術、化学療法および放射線療法が組み合わされ治療成績の向上が認められている。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た。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ている。多くの症例で、初回治療に対する治療効果は期待できる。しかしながら、セツキシマブを用いた治療効果の継続は難しく、癌細胞はセツキシマブに対する抵抗性を獲得し、局所再発や遠隔転移に至る。頭頸部扁平上皮癌の治療抵抗性獲得の分子機序の解明と、治療抵抗性を解除する新規治療法の開発は急務である。

(2) 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

(1) セツキシマブ治療後に抵抗性を獲得し、局所再発した症例の検体から「頭頸部扁平上皮癌・治療抵抗性マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成する。作成されたマイクロ RNA 発現プロファイルに基づき、癌抑制型マイクロ RNA を探索する。

(2) マイクロ RNA を起点としたゲノム解析から、頭頸部扁平上皮癌・治療抵抗性に関わる分子を探索する。

(3) 頭頸部扁平上皮癌・治療抵抗性に関わる分子経路を探索し、その経路を遮断する戦略を考案する。

3. 研究の方法

(1) 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 を抽出後、small RNA cDNA ライブラリーを作製する、次世代シーケンサーを用いて、各ライブラリーについて、1000 万リード以上のシーケンスを行う。得られたリード配列を参照配列 (miRBase release 22.1) にマッピングし、既知 miRNA の発現レベルの算出および転写物へのアノテーション付与を行う。セツキシマブ治療後の検体で発現変動をするマイクロ RNA のプロファイルを作成する。

(2) マイクロ RNA 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 に着目し、頭頸部扁平上皮癌細胞株に核酸導入する。癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能について評

価し、癌抑制機能を有しているか検討する。

(3) 癌抑制機能を有しているマイクロ RNA については、ゲノム科学的手法を用いて、マイクロ RNA が制御する遺伝子の網羅的な探索を行う。

(4) マイクロ RNA および標的遺伝子の発現と臨床病理学的な解析を、TCGA データベースを用いて行う。

(5) 標的遺伝子の癌促進機能について、siRNA を用いた解析により評価する。

(6) 癌促進機能を有する遺伝子について、遺伝子が関わる分子経路を明らかにして、その分子経路を遮断するドラックリポジショニングを考案する。

4. 研究成果

(1) 頭頸部扁平上皮癌・治療抵抗性マイクロ RNA 発現プロファイル

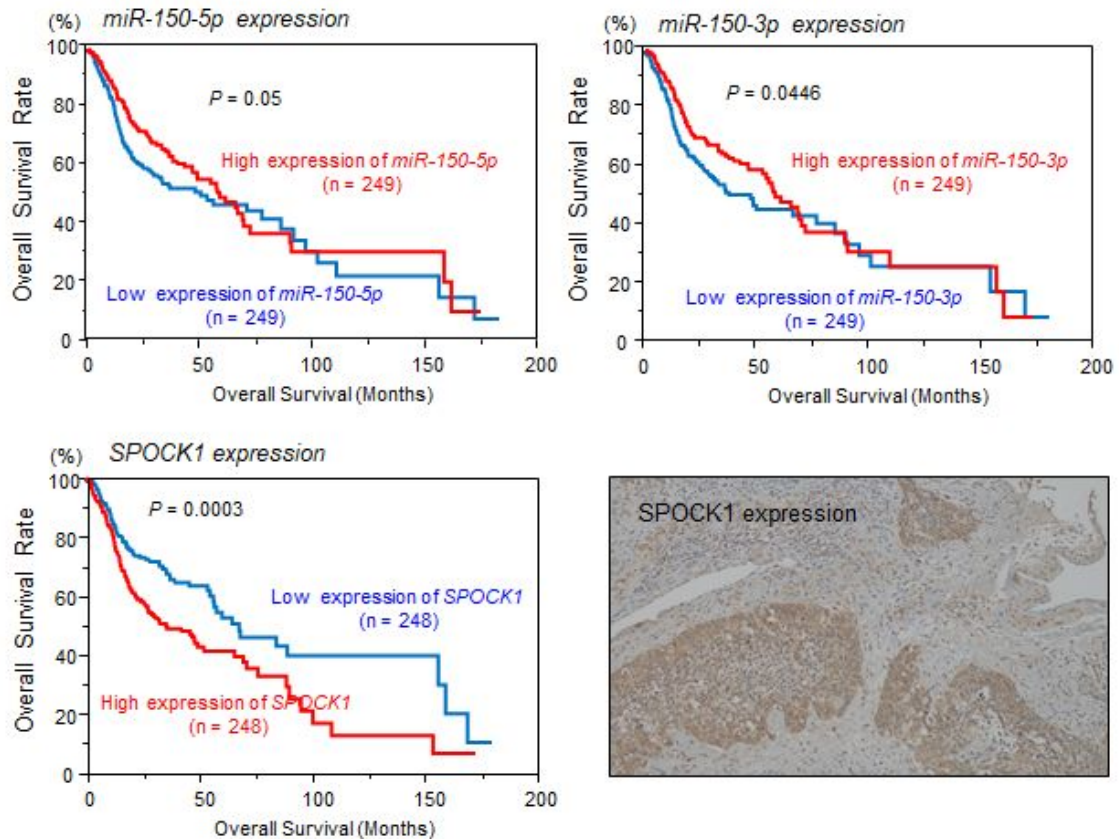
本プロファイルは、RNA シークエンスにより網羅的に作製したため、これまで詳細な機能解析の行われていないマイクロ RNA が多数含まれていた。これまでの概念では、マイクロ RNA の生合成において、pre-miRNA から 2 本鎖の miRNA duplex が形成される。そして、guide strand が RISC タンパクに取り込まれ標的遺伝子の制御を行う。これに対して、反対鎖の passenger strand は、分解され機能を有しないとされている。今回の解析では、miR-99a-3p、miR-126-3p、miR-143-5p、miR-145-3p、miR-150-3p などの passenger strand マイクロ RNA の発現が癌組織で抑制されている事が明らかとなった。

(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

癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA から、miR-150-5p (guide strand) および miR-150-3p (passenger strand) に着目し、これらマイクロ RNA の機能解析を施行した。まず、TCGA(The Cancer Genome Atlas) により miR-150-5p および miR-150-3p の発現について、頭頸部扁平上皮癌患者の予後を解析した。その結果、miR-150-5p および miR-150-3p の発現を中央値で 2 群に分けると、発現が低下している患者の予後が不良である事が明らかとなった。次に、これらマイクロ RNA を頭頸部扁平上皮癌由来細胞株に核酸導入する事により、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 として機能している事が明らかとなった。

更に、miR-150-5p および miR-150-3p が共通して制御する癌促進型遺伝子探索した。その結果、19 遺伝子が候補となった。その中で、5 遺伝子 (SPOCK1、TIMP4、CAV2、NUBPL、KLHL29) の発現が頭頸部扁平上皮癌患者の予後に関与している事が明らかとなった。この中で、SPOCK1 について機能解析を行い、癌細胞の増殖、浸潤、遊走を促進する癌促進型遺伝子である事を明らかにした。臨床検体を用いた免疫染色により SPOCK1 の過剰発現を確認した。

更に SPOCK1 が制御する分子経路を探索した結果、Regulation of actin cytoskeleton、ECM8212;receptor interaction、TGF-beta signaling pathway などの分子経路を制御している事を明らかにした。

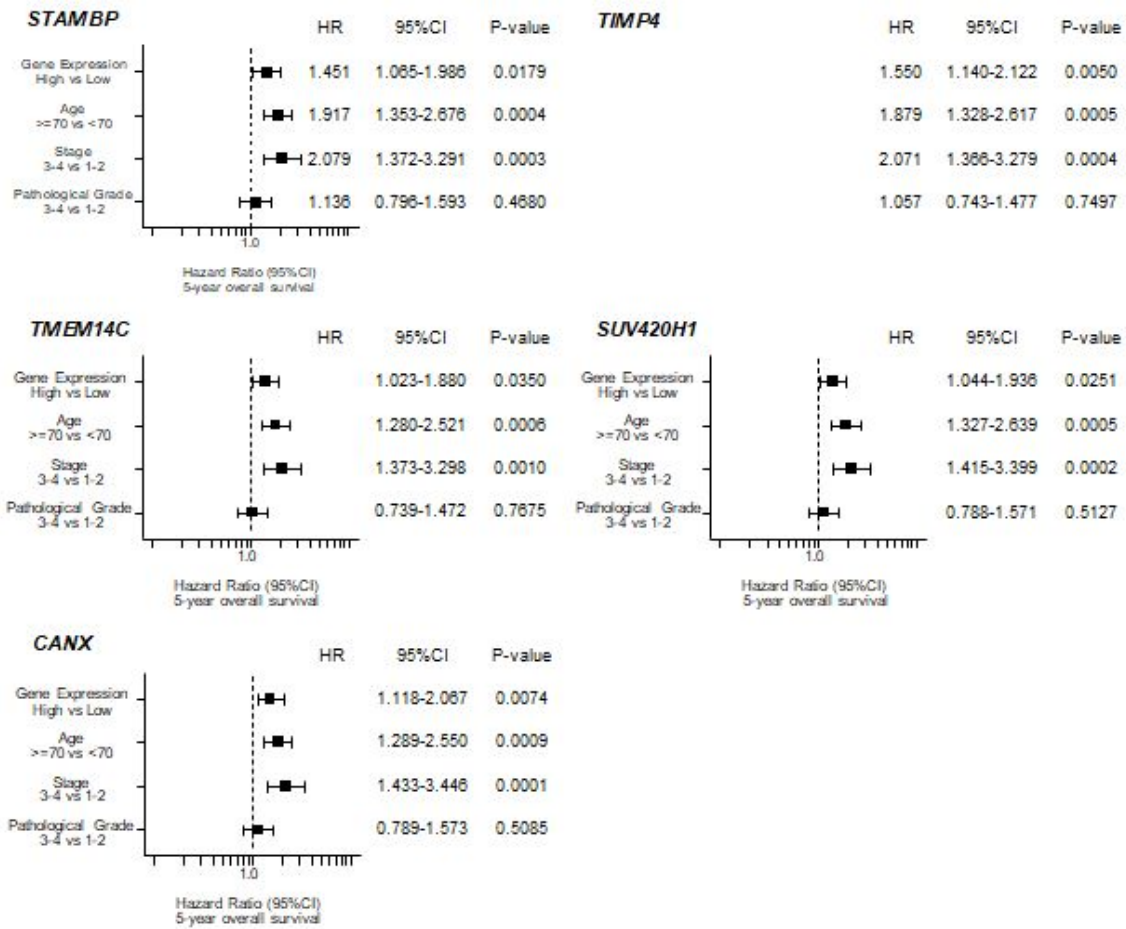


(3) 頭頸部扁平上皮癌における miR-99a-5p および miR-99a-3p の機能解析

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 miR-99a-5p および miR-99a-3p に着目した。TCGA コホート解析の結果、miR-99a-5p および miR-99a-3p の発現が低下している患者グループは、発現が亢進している患者に比べ、有意に予後が不良である事が明らかとなった (miR-99a-5p: $p=0.0008$, miR-99a-3p: $p=0.0012$)。マイクロ RNA を癌細胞株に核酸導入する機能解析から、これらマイクロ RNA は癌細胞の遊走能、浸潤能を制御する癌抑制型マイクロ RNA である事を証明した。

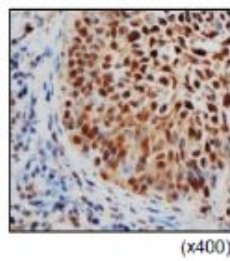
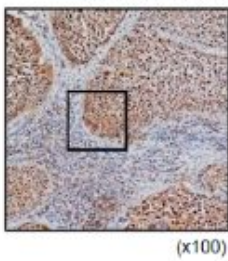
次に、miR-99a-3p が制御する癌促進型遺伝子を探索し、10 種類の遺伝子 (STAMBP, TIMP4, TMEM14C, CANX, SUV420H1, HSP90B1, PDIA3, MTHFD2, BCAT1, SLC22A15) が、頭頸部扁平上皮癌患者の予後に影響を及ぼしている事を明らかにした。更に、多変量解析を行い、5 種類の遺伝子 (STAMBP, TIMP4, TMEM14C, CANX, SUV420H1) の発現は独立した予後因子である事を見出した。

更に、これら遺伝子の中で、これまで頭頸部扁平上皮癌との関連が報告されていない STAMBP に着目し、機能解析を行った。免疫染色の結果、STAMBP は、癌組織 (咽頭癌、下咽頭癌、舌癌) において過剰発現している事を認めた。STAMBP を siRNA によりノックダウンすると、癌細胞の遊走能、浸潤能を顕著に抑制した。これらの事から、STAMBP の過剰発現は、頭頸部扁平上皮癌において、癌促進型遺伝子として機能している事を証明した。

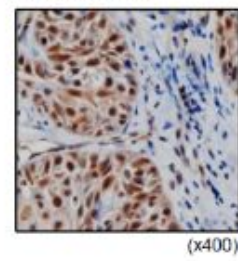
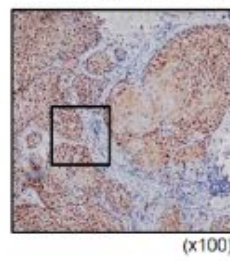


STAMBP expression

squamous cell carcinoma (larynx)



squamous cell carcinoma (oral)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 2. Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Katada K, Okato A, Arai T, Idichi T, Osako Y, Okamoto Y, Seki N.	4. 巻 45(4)
2. 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.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 854-865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2017.11.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koshizuka Keiichi, Nohata Nijiro, Hanazawa Toyoyuki, Kikkawa Naoko, Arai Takayuki, Okato Atsushi, Fukumoto Ichiro, Katada Koji, Okamoto Yoshitaka, Seki Naohiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Deep sequencing-based microRNA expression signatures in head and neck squamous cell carcinoma: dual strands of pre-<i>miR</i>-150 as antitumor miRNAs	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 30288 ~ 30304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.16327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koshizuka Keiichi, Hanazawa Toyoyuki, Kikkawa Naoko, Arai Takayuki, Okato Atsushi, Kurozumi Akira, Kato Mayuko, Katada Koji, Okamoto Yoshitaka, Seki Naohiko	4. 巻 108
2. 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1681 ~ 1692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koshizuka Keiichi, Hanazawa Toyoyuki, Arai Takayuki, Okato Atsushi, Kikkawa Naoko, Seki Naohiko	4. 巻 36
2. 論文標題 Involvement of aberrantly expressed microRNAs in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Metastasis Rev	6. 最初と最後の頁 525 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10555-017-9692-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada R, Koshizuka K, Yamada Y, Moriya S, Kikkawa N, Kinoshita T, Hanazawa T, Seki N.	4. 巻 8(12)
2. 論文標題 Regulation of Oncogenic Targets by miR-99a-3p (Passenger Strand of miR-99a-Duplex) in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8121535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 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.	4. 巻 52(1)
2. 論文標題 Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MY01B in head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 166-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2017.4190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 越塚慶一, 花澤豊行, 吉川直子, 福本一郎, 岡本美孝
2. 発表標題 2種類のマイクロRNA(miR-150-5p/-3p)が共通して制御する頭頸扁平上皮癌・癌抑制機構の探索
3. 学会等名 第41回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関 直彦 (SEKI NAOHIKO) (50345013)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	