

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月30日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16893

研究課題名(和文) 頭頸部癌転移抑制型マイクロRNAが制御するECM・インテグリン転移促進経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of metastasis promoting pathway involving ECM / integrin regulated by head and neck cancer suppressing microRNA

研究代表者

越塚 慶一 (Koshizuka, Keiichi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00791609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：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、頭頸部癌マイクロRNA発現プロファイルを作成した。そのプロファイルより、癌部において発現の低下しているマイクロRNAを抽出し、機能解析を行ったところ、癌抑制型マイクロRNAとして機能していることが明らかとなった。そのマイクロRNAが直接制御する遺伝子に、インテグリン関連遺伝子が含まれており、その遺伝子の機能解析を行ったところ、頭頸部癌細胞の遊走や浸潤に大きく関わる事が明らかとなった。さらにインテグリン関連遺伝子のシグナル伝達経路解析や予後解析を行い、インテグリン関連遺伝子が頭頸部扁平上皮癌の分子治療の標的となる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が次世代シーケンサーを用いて作成したマイクロRNA発現プロファイルには、今までのアレイ解析では抽出できなかった多くのマイクロRNAが含まれており、プロファイルを基にしたマイクロRNA研究の足掛かりを作ることができた。また、今までは分解され機能しないと考えられてきたパッセンジャー鎖マイクロRNAが癌抑制型マイクロRNAとして機能していることを新たに見出した。癌抑制型マイクロRNAを起点とした分子ネットワークの探索は、頭頸部扁平上皮癌の分子ネットワーク解明に有効であり、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)：A microRNA expression profile was generated using a next-generation sequencer from head and neck squamous cell carcinoma clinical specimens. We extracted microRNA with reduced expression in cancer tissues from profiles and performed functional analysis. As a result, it was found that it functions as a tumor suppressor microRNA. The genes directly regulated by the microRNAs include integrin-related genes, and functional analysis of the genes revealed that they are significantly involved in migration and invasion of head and neck cancer cells. We found that integrin-related genes could be targets for molecular therapy for head and neck squamous cell carcinoma from cell signaling pathway analysis and prognostic analysis.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 マイクロRNA インテグリン

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

厚生労働省の統計によれば、頭頸部癌による死亡数は30年間で3.7倍に増加している。頭頸部扁平上皮癌は、診断時には頸部リンパ節や遠隔転移をきたし、進行症例となっている症例も珍しくなく、進行症例の予後は極めて予後不良である。また、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、外科手術、化学放射線治療が発達し、治療成績の向上が認められている。しかしながら、遠隔転移をきたした症例の予後は極めて不良であり、今後治療成績を向上させるためには遠隔転移の制御が必要不可欠である。しかし、頭頸部扁平上皮癌の遠隔転移の分子メカニズムは未だに十分に解明されていないのが現状である。治療抵抗性に至った検体を用いて、最新の癌・ゲノム研究から、頭頸部扁平上皮癌の遠隔転移に関わる分子ネットワークを探索し、治療や診断の基礎となる知見を得る事が重要と考える。

(1-2) 機能性 RNA 研究の背景

ヒトゲノム中には蛋白をコードしない機能 RNA が多数存在する事が判明した。その中で、マイクロ RNA に分類される機能性 RNA は、僅か19塩基~22塩基の1本鎖 RNA 分として機能する。マイクロ RNA の特徴として、1つのマイクロ RNA は、配列依存的に数百~数千種の蛋白コード遺伝子を制御する事が報告されている。そのため、マイクロ RNA の発現異常が、蛋白コード遺伝子等の機能性 RNA ネットワークの破綻をきたす。そのため、マイクロ RNA の発現異常は、癌を含むヒト疾患に深く関わっている事が明らかとなってきた。ヒト癌においては、癌細胞で発現変化を認めるマイクロ RNA の解析から、癌抑制遺伝子または癌遺伝子として機能するマイクロ RNA の報告が相次ぎ、癌研究分野においてマイクロ RNA は一躍注目される分子となった。

(1-3) 申請者の頭頸部扁平上皮癌・マイクロ RNA 研究の背景

申請者は、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 に着目し、核酸を細胞株に導入する機能解析から、癌細胞の遊走や浸潤を制御する「転移抑制型マイクロ RNA」を探索した実績を有する。一連の解析から、複数の癌転移抑制型マイクロ RNA が、細胞外マトリックス (ECM) の構成遺伝子と、ECM 受容体であるインテグリンを制御している事を見出した。更に、これら遺伝子をノックダウンすると、癌細胞の遊走能・浸潤能が顕著に抑制された。最近の研究から、ECM の異常な蓄積は、癌細胞の増殖・分化・浸潤・遊走に関与している事が明らかとなってきている。細胞はインテグリンや CD44 などの細胞受容体を介した ECM との相互作用があり、癌の浸潤・転移には癌細胞の ECM シグナルが重要な役割を果たしている。この事から、転移抑制型マイクロ RNA を起点とした、機能性 RNA ネットワークの探索により、頭頸部扁平上皮癌の転移に関わる新たな分子経路の探索が可能である事が示された。このような背景を踏まえ、新たに、次世代シーケンサーを用いて作成した「頭頸部癌・マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づいて、転移抑制型マイクロ RNA が制御する転移促進経路の探索を行う。遠隔転移に関わる分子経路を明らかにする事は、本疾患の分子メカニズムの理解と、最適な治療方針の選択に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いて作成した「頭頸部癌・マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づいて、発現が抑制されているマイクロ RNA の機能解析から、「転移抑制型マイクロ RNA」を探索する。その転移抑制型マイクロ RNA が制御する機能性 RNA ネットワークを探索し、頭頸部扁平上皮癌臨床検体の転移に関与して活性化している分子経路を明らかにする。さらに、頭頸部扁平上皮癌で活性化している分子経路を遮断する戦略を考案し、in vitro/in vivo において、その有効性を検証する。

3. 研究の方法

(3-1) 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、「癌抑制型マイクロ RNA」の探索

頭頸部扁平上皮癌臨床検体から得られた RNA をもとに、次世代シーケンサーを用いて頭頸部扁平上皮癌マイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。そのプロファイルに基づいて、正常組織にくらべ癌組織において発現の低下しているマイクロ RNA を見出した。

miR-150-5p/3p は癌組織において発現の低下を認め、臨床検体での mRNA 発現レベルや頭頸部扁平上皮癌細胞株でのタンパク発現レベルにおいても発現の低下を認めた。頭頸部扁平上皮癌細胞株に、miR-150-5p/3p を核酸導入し、細胞遊走能や浸潤能の測定を行った。miR-150-5p/3p の核酸導入により癌細胞の遊走能・浸潤能は著明に抑制された。

(3-2) miR-150-5p/3p が制御する RNA ネットワークの探索

全ゲノム遺伝子発現解析と insilico 解析を用いて、miR-150-5p/3p がターゲットとする遺伝子の探索を行った。まず、頭頸部癌細胞株に miR-150-5p/3p を核酸導入し、得られた RNA から全ゲノム遺伝子発現解析を行い、比較群に比べて miR-150-5p/3p が核酸導入された群で発現抑制されている遺伝子を選択した。それらの遺伝子に GeneCodis analysis (in silico) を行い、

いくつかの pathway を見出した。miR-150-5p/3p の機能解析の結果から、標的遺伝子として細胞接着関連遺伝子を候補とし、インテグリン関連遺伝子 (ITGA3, ITGA6, TNC) が探索された。

(3-3) インテグリン関連遺伝子 (ITGA3, ITGA6, TNC) の解析

頭頸部扁平上皮癌細胞株において、インテグリン関連遺伝子 (ITGA3, ITGA6, TNC) をノックダウンし、遺伝子の機能解析を行ったところ、癌細胞の遊走能と浸潤能を顕著に促進していることが判明した。また、PCR や免疫染色を用いて、これら遺伝子が頭頸部扁平上皮癌臨床検体において、発現亢進していることを明らかにした。さらに TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースを用いて、インテグリン関連遺伝子を臨床的側面から解析した。

4 . 研究成果

頭頸部扁平上皮癌マイクロ RNA 発現プロファイルから、miR-150-5p/3p が、頭頸部扁平上皮癌組織において、有意に発現抑制されている事を見出した。頭頸部扁平上皮癌細胞株に、miR-150-5p/3p を核酸導入すると、細胞遊走能・浸潤能が顕著に抑制された事から、miR-150-5p/3p は頭頸部扁平上皮癌の転移に関わる癌抑制型マイクロ RNA であることが明らかとなった。更に、miR-150-5p/3p が制御する癌促進型遺伝子を探索した結果、細胞接着に関与するインテグリン関連遺伝子 (ITGA3, ITGA6, TNC) が見出された。これら遺伝子の機能解析から、ITGA3, ITGA6, TNC は頭頸部扁平上皮癌細胞の癌促進に関与し、特に癌細胞の転移に深く関与していることが明らかとなった。さらに TCGA データベース解析から、ITGA3, ITGA6, TNC の高発現患者群は低発現患者群に比べて、有意に予後が不良であることが明らかとなった。

また、一般的には、マイクロ RNA の機能として、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い、反対鎖の passenger strand は分解される。申請者は、次世代シーケンサーを用いたマイクロ RNA 発現解析から、pre-miRNA-150 の guide strand/passenger strand に着目し、2 つのマイクロ RNA が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を初めて明らかにした。

癌抑制型マイクロ RNA を起点とした分子ネットワークの探索は、頭頸部扁平上皮癌の分子ネットワーク解明に有効であり、新規治療法の開発へ向けて重要な知見を提供する。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件) 全て英文査読あり

Sugawara S, Yamada Y, Arai T, Okato A, Idichi T, Kato M, **Koshizuka K**, Ichikawa T, Seki N. Dual strands of the miR-223 duplex (miR-223-5p and miR-223-3p) inhibit cancer cell aggressiveness: targeted genes are involved in bladder cancer pathogenesis. J Hum Genet. 2018 May;63(5):657-668

Suetsugu T, **Koshizuka K**, Seki N, Mizuno K, Okato A, Arai T, Misono S, Uchida A, Kumamoto T, Inoue H. Downregulation of matrix metalloproteinase 14 by the antitumor miRNA, miR-150-5p, inhibits the aggressiveness of lung squamous cell carcinoma cells. Int J Oncol. 2018 Mar;52(3):913-924.

Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Katada K, Okato A, Arai T, Idichi T, Osako Y, Okamoto Y, Seki N. Antitumor miR-150-5p and miR-150-3p inhibit cancer cell aggressiveness by targeting SPOCK1 in head and neck squamous cell carcinoma. Auris Nasus Larynx. 2018 Aug;45(4):854-865

Yamada Y, **Koshizuka K**, Hanazawa T, Kikkawa N, Okato A, Idichi T, Arai T, Sugawara S, Katada K, Okamoto Y, Seki N. Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MYO1B in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2018 Jan;52(1):166-178

Koshizuka K, Kikkawa N, Hanazawa T, Yamada Y, Okato A, Arai T, Katada K, Okamoto Y, Seki N. Inhibition of integrin β 1-mediated oncogenic signalling by the antitumor *microRNA-29* family in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Dec 11;9(3):3663-3676.

Yonemori K, Seki N, Idichi T, Kurahara H, Osako Y, **Koshizuka K**, Arai T, Okato A, Kita Y, Arigami T, Mataka Y, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S. The microRNA expression signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by RNA sequencing: anti-tumour functions of the *microRNA-216* cluster. *Oncotarget*. 2017 Jul 26;8(41):70097-70115.

Okato A, Arai T, Yamada Y, Sugawara S, **Koshizuka K**, Fujimura L, Kurozumi A, Kato M, Kojima S, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Dual Strands of Pre-miR-149 Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion through Targeting FOXM1 in Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2017 Sep 13;18(9)

Koshizuka K, Hanazawa T, Arai T, Okato A, Kikkawa N, Seki N. Involvement of aberrantly expressed microRNAs in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017 Sep;36(3):525-545.

Arai T, Okato A, Kojima S, Idichi T, **Koshizuka K**, Kurozumi A, Kato M, Yamazaki K, Ishida Y, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Regulation of spindle and kinetochore-associated protein 1 by antitumor miR-10a-5p in renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2017 Oct;108(10):2088-2101.

Osako Y, Seki N, **Koshizuka K**, Okato A, Idichi T, Arai T, Omoto I, Sasaki K, Uchikado Y, Kita Y, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. Regulation of SPOCK1 by dual strands of pre-miR-150 inhibit cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *J Hum Genet*. 2017 Nov;62(11):935-944.

Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Arai T, Okato A, Kurozumi A, Kato M, Katada K, Okamoto Y, Seki N. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer. *Cancer Sci*. 2017 Aug;108(8):1681-1692.

Okato A, Arai T, Kojima S, **Koshizuka K**, Osako Y, Idichi T, Kurozumi A, Goto Y, Kato M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Dual strands of pre-miR-150 (miR-150-5p and miR-150-3p) act as antitumor miRNAs targeting SPOCK1 in naïve and castration-resistant prostate cancer. *Int J Oncol*. 2017 Jul;51(1):245-256.

Koshizuka K, Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Arai T, Okato A, Fukumoto I, Katada K, Okamoto Y, Seki N. Deep sequencing-based microRNA expression signatures in head and neck squamous cell carcinoma: dual strands of pre-miR-150 as antitumor miRNAs. *Oncotarget*. 2017 May 2;8(18):30288-30304.

Yonemori K, Seki N, Kurahara H, Osako Y, Idichi T, Arai T, **Koshizuka K**, Kita Y, Maemura K, Natsugoe S. ZFP36L2 promotes cancer cell aggressiveness and is regulated by antitumor microRNA-375 in pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Sci. 2017 Jan;108(1):124-135.

Koshizuka K, Hanazawa T, Fukumoto I, Kikkawa N, Okamoto Y, Seki N. The microRNA signatures: aberrantly expressed microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. J Hum Genet. 2017 Jan;62(1):3-13.

Kato M, Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Okato A, Nishikawa R, Fukumoto I, **Koshizuka K**, Ichikawa T, Seki N. Regulation of metastasis-promoting LOXL2 gene expression by antitumor microRNAs in prostate cancer. J Hum Genet. 2017 Jan;62(1):123-132.

〔学会発表〕(計 5 件)

越塚慶一、花澤豊行、吉川直子、岡本美孝、関直彦、microRNA-199 family が制御する頭頸部扁平上皮癌・癌分子ネットワークの探索、第 42 回日本頭頸部癌学会、2018 年

越塚慶一、花澤豊行、中川拓也、國井直樹、山崎一樹、吉川直子、茶園英明、櫻井大樹、岡本美孝、関直彦、頭頸部扁平上皮癌におけるマイクロ RNA 解析、第 93 回日本耳鼻咽喉科学会千葉県地方部会、2018 年

越塚慶一、野畑二次郎、花澤豊行、吉川直子、福本一郎、新井隆之、岡東篤、岡本美孝、関直彦、Deep-sequencing based microRNA expression signature in head and neck squamous cell carcinoma: dual-strand of microRNA-150 act as tumor-suppressors、AACR Annual Meeting 2017、2017 年

越塚慶一、花澤豊行、福本一郎、吉川直子、岡本美孝、関直彦、頭頸部癌・癌抑制型マイクロ RNA (miR-1/206) が制御する受容体型チロシンキナーゼの探索、第 118 回日本耳鼻咽喉科学会、2017 年

越塚慶一、花澤豊行、吉川直子、福本一郎、岡本美孝、関直彦、2 種類のマイクロ RNA (miR-150-5p/-3p) が共通して制御する頭頸部扁平上皮癌・癌抑制機構の探索、第 41 回日本頭頸部癌学会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ: <http://genomejet.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 関直彦

ローマ字氏名 : SEKI Naohiko

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。