

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09716

研究課題名(和文) 頭頸部癌における新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel biomarkers in head and neck cancer

研究代表者

若崎 高裕 (Wakasaki, Takahiro)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10608871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌の発生・進化にエピジェネティックな機構が大きく関与する事が注目されており、がん進展に重要と考えられるlncRNAに注目した。頭頸部癌におけるこれらlncRNAの機能を解明し、頭頸部癌の予後、治療耐性を予測・反映するバイオマーカーの開発につなげる研究を行った。OIP5-AS1はCDKインヒビターp15の発現を抑制することにより細胞周期のG1期進行を促進すること、ANROCは、サイクリンB1の発現を抑制することによりG2/M期進行を抑制することを示し、論文報告を行った。また、頭頸部癌症例におけるICIおよび二次化学療法におけるバイオマーカーに関して論文発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮癌では、有用なマーカー研究が発見されていない。頭頸部癌の発生・進化にエピジェネティックな機構が大きく関与する事が注目されているが、エピジェネティック機構に深く関与しているlncRNAは、癌の発生、進展に重要な役割を果たしていると考えており、有用なバイオマーカーの候補と考えている。我々の注目したlncRNAであるANRIL, PANDA, OIP5-AS1 およびANROCの頭頸部癌における機能解析は進んでおらず、その機能解析を行うことで、頭頸部癌の予後、治療耐性を予測・反映するバイオマーカーの開発につなげる成果を得た。

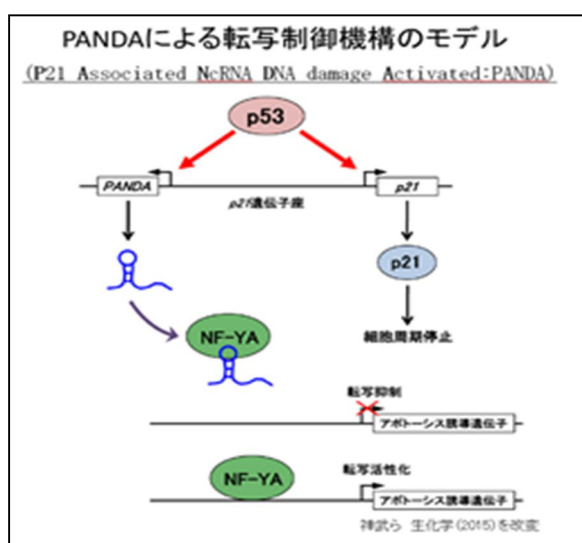
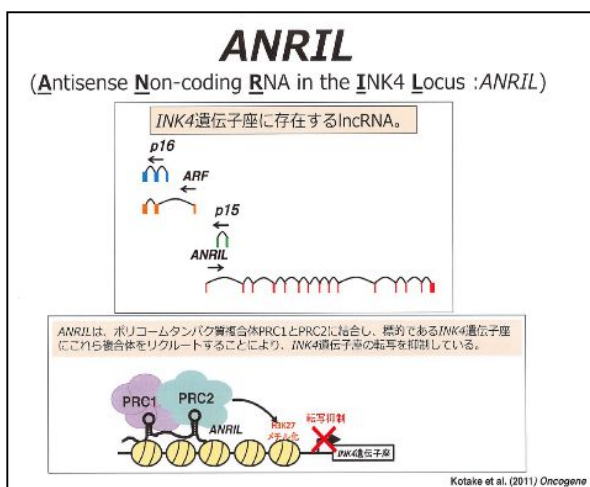
研究成果の概要(英文)：The involvement of lncRNAs, which are thought to be important in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma, has attracted attention as an epigenetic mechanism. We investigated the functions of these lncRNAs in head and neck cancer to develop biomarkers that predict and reflect prognosis and resistance to treatment. We found that OIP5-AS1 promotes G1 cell cycle progression by suppressing the expression of CDK inhibitor p15, and ANROC suppresses G2/M phase progression by suppressing the expression of cyclin B1, which we report in this paper. We also reported a paper on biomarkers in ICI and salvage chemotherapy in head and neck cancer cases.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 バイオマーカー lnc RNA

1. 研究開始当初の背景



頭頸部扁平上皮癌（以下 頭頸部癌）は全癌の4-5%を占めるに過ぎず、腫瘍の部位や発癌の機序が多岐にわたるため、特異的な治療ターゲットや有用なバイオマーカーの研究が進んでいない。ポストゲノム時代に入り、頭頸部癌の発生・進展にはエピジェネティックな機構が大きく関与していることが注目されている。特に、長鎖非コードRNA (lncRNA) は発癌および癌の進展に重要な役割を果たすことが報告されている。がん進展に関与すると考えられる3つの lncRNA、ANRIL (antisense non-coding RNA in the INK4 locus)、OIP5-AS1 (OPA-interacting protein 5 antisense transcript 1)、および PANDA (p21 associated ncRNA DNA damage activated) に注目した。

これらの lncRNA は、細胞周期およびアポトーシス制御に関与し、肺癌や胃癌で高発現していることが明らかとなっている。頭頸部癌におけるこれら lncRNA の機能を解明し、予後や治療耐性を予測・反映するバイオマーカーの開発、新規治療に繋げたい。頭頸部癌では癌抑制遺伝子 TP53 の変異が約 40-80%認められるが、有力ながん遺伝子は検出されていない (The Cancer Genome Atlas, Nature 2015)。最近では、発癌進展機構におけるエピジェネティックな機構を介する lncRNA の機能が注目されている。lncRNA は長さが 200 塩基以上の構造物で、1 万個以上存在する。遺伝子発現の調節および RNA 対 DNA/RNA/タンパク質相互作用に基づく発現機構に関与し、分化、がん化、アポトーシスなどの細胞運命決定に重要な役割を果たしている。頭頸部癌における

lncRNA の研究としては、2013 年以降、HOTAIR をはじめとして lnc-ROR、H19、CCAT1、ZEB1-AS1、NEAT1、MALAT1、UCA1 などの報告があり、腫瘍組織で発現が上昇していることやその機能が部分的に示されている (Sci Rep. 2018)。

ANRIL (Oncogene. 2011) および PANDA (Nature Genet. 2011) は、研究協力者の神武らが発見・解析した lncRNA で、HOTAIR と同じ転写抑制性 lncRNA である。ANRIL は PRC1 (Polycomb repressive complex 1) および PRC2 と結合し、INK4 遺伝子座 (p15、p16 および p53 安定化因子 ARF をコードしている) への PcG 結合を促進する。それにより ANRIL は、CDK1 (cyclin-dependent kinase inhibitor) である p15 および p16 の転写抑制を促し、細胞増殖を促進する。また、ANRIL は ARF を介してがん抑制遺伝子 p53 を正に制御していると考えられている。その他多くの転写制御に関わり、胃がん、大腸癌、乳癌など腺癌系の報告のほか、メラノーマにおいても重要な役割が示唆されている。PANDA は p21 遺伝子の転写開始点の 5kb 上流に存在し、p21 とは逆向きに転写される。DNA 損傷に反応して p53 依存的に誘導される PANDA は、NF-YA と結合し、その標的遺伝子プロモーターへの結合を阻害することでアポトーシス誘導遺伝子群の転写を抑制すると考えられている。PANDA は現在までに腺癌系で腫瘍形成との関連性が示されている。OIP5-AS1 は主に腺癌系臨床検体で高発現が確認されており、腫瘍進行における機能が示唆されている。さらに、一部の癌腫においては癌幹細胞維持に必要な分子として報告されている。

今回注目した ANRIL、OIP5-AS1、PANDA、ANROC の頭頸部癌における役割は未だ明らかにされていないが、他癌腫においては強力な腫瘍増生に関わる lncRNA とされており、将来の治療ターゲットおよびバイオマーカー候補と考えている。

2. 研究の目的

頭頸部癌における lncRNA ANRIL、PANDA、OIP5-AS1 の機能解明

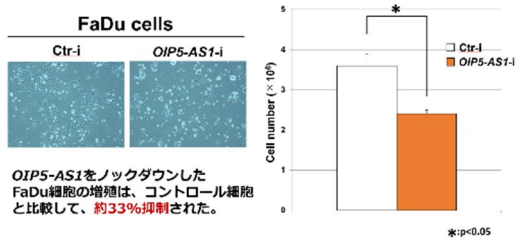
### 3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌細胞における lncRNA ANRIL、PANDA の機能解明 ANRIL、OIP5-AS1、PANDA、ANROC の過剰発現 / ノックダウンによる形質転換の解析 口腔癌由来：CAL27/HSC4/SCC9 等、下咽頭癌由来：FaDu 等で、siRNA およびレトロウイルスベクター（過剰発現用：pBabe-puro、ノックダウン用：pSUPER.retro-puro）を用いて実験を行った。フローサイトメーターを用いて細胞周期解析を、リアルタイム RT-PCR 法を用いて CDK インヒビターおよびサイクリン遺伝子の発現解析を行なった。

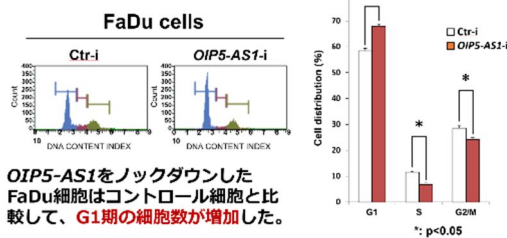
(2) 頭頸部癌における免疫チェックポイント阻害剤およびサルベージ化学療法の治療効果に関して臨床データを用いたバイオマーカーの研究を行った。

### 4. 研究成果

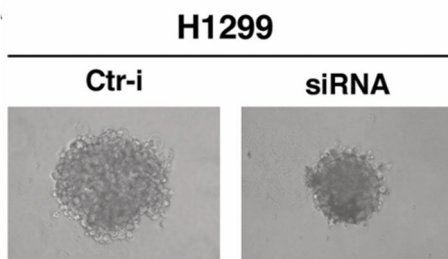
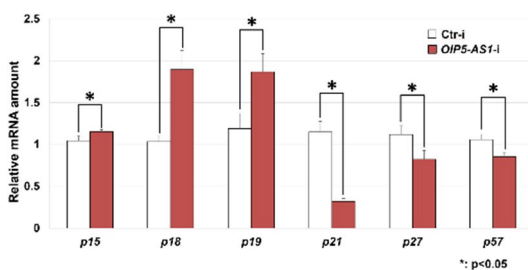
#### 咽頭癌細胞 FaDu で、OIP5-AS1 をノックダウンすると細胞増殖が抑制された。



#### OIP5-AS1 をノックダウンすると細胞周期が G1 期に停止した。



#### FaDu 細胞において OIP5-AS1 をノックダウンすると p18, p19 mRNA の発現量が増加した。

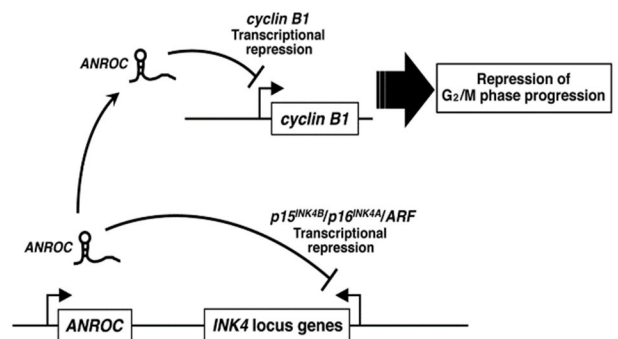


(1) ANRIL および PANDA に関しては、下咽頭癌細胞株 FaDu において p53 を介して細胞周期を制御し、その増殖能と正に相関することを示した。

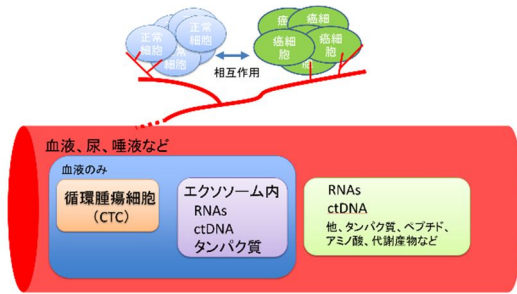
OIP5-AS1 は非小細胞肺癌細胞 (H1299 および A549) と頭頸部扁平上皮癌細胞 (FaDu および CAL27) の細胞周期進行において重要な役割を果たしていることを示した。OIP5-AS1 のサイレンシングにより、これらの癌細胞の増殖が抑制され、CDK 阻害因子 (p15、p16、p18、p19) の発現が増加し、G1 期の停止が引き起こされた。OIP5-AS1 は CDK 阻害因子を抑制することで G1 期の進行を調節し、癌細胞の増殖を促進することを示した。さらに、OIP5-AS1 のサイレンシングにより、OIP5-AS1 が sphere 形成を抑制することを示した。OIP5-AS1 ががんの増殖に重要と考えられる 3D 増殖を促進することを示唆した。

さらに、我々は最近、INK4 遺伝子座から転写される新規 lncRNA を同定し、これを ANROC (associated negative regulation of cell proliferation) と命名した。HeLa 細胞および CAL27 細胞において ANROC をノックダウンすると、細胞増殖が促進され、細胞周期解析の結果、ANROC をノックダウンすると G2/M 期の細胞数が増加し、リアルタイム RT-PCR の結果、ANROC をノックダウンすることにより G2/M 期進行を促進するサイクリン B1 の mRNA 量が増加することが明らかとなった。ANROC はサイクリン B1 の発現を抑制することで G2/M 期進行の抑制を示唆する結果だった。

### ANROC の機能

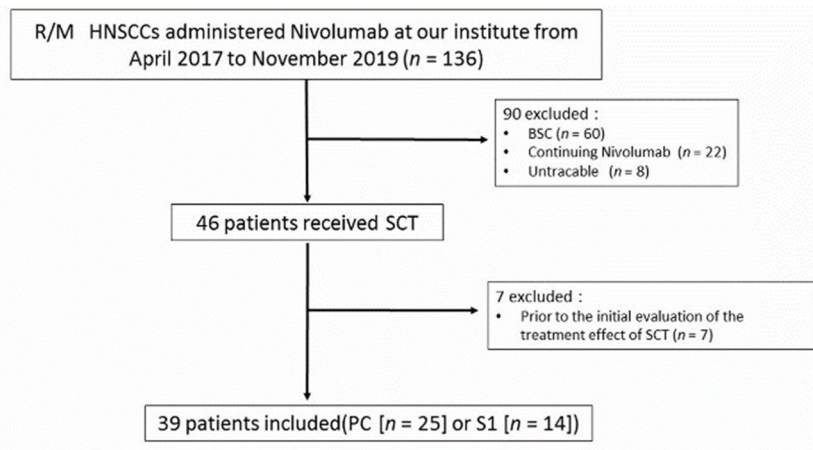


将来期待される腫瘍マーカー



これらの lncRNA は血液中のエクソソームに含まれており、これらをターゲットとしての解析をすすめている。

(2) ICI 後に有効な薬物療法である weekly PTX, Cetuximab 併用療法または経口フルオロピリミジン (S1) の治療効果および予後バイオマーカーとして導入時の血清 C 反応性タンパク質 (CRP) レベルと好中球-リンパ球比 (NLR) が有用であることを、統計学的解析により示した。



The univariate analysis of factors associated with overall survival and progression-free survival in patients administered salvage chemotherapy with PTX and Cetuximab

Factor	OS		PFS		
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	
Sex	Male/Female	0.0531 (0.00971-0.293)	0.0007	0.197 (0.0430-0.905)	0.0367
Age	<65/>65	0.599 (0.197-1.817)	0.365	0.467 (0.148-1.476)	0.195
Smoking status	B.I. <1000/>1000	0.663 (0.201-2.191)	0.500	0.566 (0.168-1.905)	0.358
SCT line	2nd (n = 16)/>2nd (n = 9)	0.691 (0.240-1.989)	0.493	0.813 (0.288-2.300)	0.697
pre-SCT NLR	<7.0/>7.0	0.258 (0.0730-0.911)	0.0354	0.470 (0.151-1.458)	0.191
pre-SCT CRP	<1.2 mg/dL/>1.2 mg/dL	0.324 (0.0108-0.970)	0.0440	0.674 (0.231-1.969)	0.471

HR, hazard ratio, B.I., Brinkman Index.

The multivariate analysis of factors associated with overall survival and progression-free survival in patients administered salvage chemotherapy with PC (reference to PS, Sex, and Age).

Factor	OS		PFS		
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	
pre-SCT NLR	<7.0/>7.0	0.498 (0.112-2.208)	0.359	0.839 (0.240-2.931)	0.783
pre-SCT CRP	<1.2 mg/dL/>1.2 mg/dL	0.0929 (0.0161-0.535)	0.0078	0.3411 (0.0897-1.298)	0.115

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wakasaki Takahiro, Manako Tomomi, Yasumatsu Ryuji, Hara Hirotaka, Toh Satoshi, Masuda Muneyuki, Yamauchi Moriyasu, Kuratomi Yuichiro, Nishimura Emi, Takeuchi Toranoshin, Matsuo Mioko, Jiromaru Rina, Hashimoto Kazuki, Komune Noritaka, Nakagawa Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Effectiveness and safety of weekly paclitaxel and cetuximab as a salvage chemotherapy following immune checkpoint inhibitors for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: A multicenter clinical study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0271907	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 KOTAKE YOJIRO, MATSUNAGA NATSUMI, WAKASAKI TAKAHIRO, OKADA RYOTARO	4. 巻 18
2. 論文標題 <i>OIP5-AS1</i> Promotes Proliferation of Non-small-cell Lung Cancer and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 543 ~ 548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20279	査読の有無 無
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 Wakasaki Takahiro, Yasumatsu Ryuji, Masuda Muneyuki, Takeuchi Toranoshin, Manako Tomomi, Matsuo Mioko, Jiromaru Rina, Uchi Ryutarō, Komune Noritaka, Noda Teppei, Nakagawa Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Prognostic Biomarkers of Salvage Chemotherapy Following Nivolumab Treatment for Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2299 ~ 2299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12082299	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 WAKASAKI TAKAHIRO, YASUMATSU RYUJI, TANABE MIKA, YOSHIKAWA HIROSHI, JIROMARU RINA, HASHIMOTO KAZUKI, MATSUO MIOKO, FUJIMURA AKIKO, NAKAGAWA TAKASHI	4. 巻 37
2. 論文標題 Lacrimal Sac Tumors: A Single-institution Experience, Including New Insights	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.13198	査読の有無 無
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 神武 洋二郎、谷川 由信、樽見 涼花、若崎 高裕
2. 発表標題 長鎖非コードRNA OIP5-AS1とANROCによる細胞周期制御
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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	神武 洋二郎  (Kotake Yojiro)  (90531963)	近畿大学・産業理工学部・教授    (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------