

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791630

研究課題名（和文） マイクロ RNA 解析による頭頸部癌・婦人科癌の発癌機構の解明と新規治療戦略

研究課題名（英文） Identification of carcinogenesis mechanism and strategy of novel treatment by microRNA analysis in head and neck cancer or gynecological cancer

研究代表者

宇野 光祐 (UNO KOSUKE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20464828

## 研究成果の概要（和文）：

我々は、喉頭癌、下咽頭癌及び子宮頸癌を検体として、組織・疾患特異的に発現するといわれているマイクロ RNA(以下 miRNA)の比較検討を行なうことで前癌病変を理解し、癌の発症、進展の機構を明らかにすることを研究目標とした。その結果、それぞれの癌において特異的で発現が上昇するまたは低下する miRNA の候補を突き止めるに至った。一方、細胞実験では、頭頸部癌細胞株、下咽頭癌細胞株に、前述の候補 miRNA を導入することにより、miRNA が細胞増殖へ与える影響について検討した。婦人科癌の候補 miRNA における細胞実験及び比較までは遂行できなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

MicroRNAs (miRNAs), showing highly disease-specific expression patterns, are promising biomarkers and novel therapeutic targets. We first examined the expression of human miRNAs in laryngeal and pharyngeal tissues using microarrays. To confirm these findings, we next performed quantitative real-time PCR (qRT-PCR) on cancer specific miRNAs and these findings were consistent with those obtained from microarrays. Finally, to explore the physiological significances of laryngeal and pharyngeal cancer-associated miRNAs, we examined the effect of these miRNAs on cell growth and viability using head and neck cancer cell line. We couldn't carry out the study about gynecological cancer in this term.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国では癌を含む悪性新生物が最も頻度の高い直接死因であるが、癌撲滅に貢献するためには、癌の発症、進展の機構を明らかにすることが必要となる。そしてその前癌病変を理解する必要もあるが、未だその理解には至っていない。そこで、我々は(1)同一の細胞種、(2)明らかな疫学的病因、(3)病理組織学的に明確な前癌病変、の特徴を有する二つの固形癌であり、かつその罹患者数及び死亡者数の増加が予測されている喉頭癌及び子宮頸癌を選択し、その分子機構の比較検討を行なうことで前癌病変を理解し、癌の発症、進展の機構を明らかにする。(1)においては、両者ともに重層扁平上皮由来であり、(2)においては、喉頭癌は喫煙が、子宮頸癌においてはパピローマウイルスの感染が明らかとなっている。(3)の前癌病変としては、頭頸部癌において、とくに喉頭癌の前癌病変として白板症が知られているが、これらは病理組織学的に異型上皮・異形成 epithelial dysplasia と診断され、軽度から高度まで三段階に区分される。この中でも、高度異形成 severe dysplasia はその約 30%が癌化することから、上皮内癌 carcinoma in situ とほぼ同義と理解され、同様の治療が行われている。一方、子宮頸部の前癌病変としても異形成と上皮内癌が定義され、異形成が軽度から高度までの三段階に区分されることは喉頭癌と同様である。

マイクロ RNA (miRNA) は癌を含めた

様々な疾患に関与し、組織・疾患特異的な発現をする長さ 22 塩基程度の 1 本鎖 RNA である。我々は、これまで 723 種類のヒト miRNA の網羅的発現解析を行い、喉頭癌・子宮頸癌組織とそれらに隣接する非癌組織とを比較することで、それぞれに特異的な miRNAs を見出し、それらの生理学的意義について解析を行ってきた。

## 2. 研究の目的

癌の発症、進展の機構を解明する手段として、組織・疾患特異的に発現するマイクロ RNA (miRNA) に着眼する。喉頭癌・子宮頸癌は、両者ともに扁平上皮癌ではあるが、組織学的診断基準が異なることから、各発癌機構・分子生物学的メカニズムが異なることは容易に想像できる。しかしこれらを分子生物学的視点から比較検討した研究はほとんど存在しない。そこで、これら疾患の各前癌病変ならびに癌の組織中 miRNA を研究者の所属する研究グループが構築してきた Tissue Bank を有効に活用して網羅的に解析し、その違いを明らかとすることで、今後の診断・治療に役立てるため、結果を in vivo、in vitro の実験系で検討し、二者の癌の発癌機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 喉頭下咽頭癌及び子宮頸部における前癌病変ならびに癌に特異的な miRNAs を明らかにする。具体的には、これまでの miRNA の網羅的発現解析で、悪性度にしたがって増加あるいは減少を認めた miRNAs を対象として、miRNA の定量的発現解析 (TaqMan miRNA

assays, Applied Biosystems) を行う。対象とする臨床検体は、良性疾患、異形成、癌それぞれ 20 程度とし、異形成には、軽度・中等度・高度の異形成をそれぞれ含め検討する。次に、これらの解析で、前癌病変である異形成の悪性度と相関して発現が増加あるいは減少する miRNAs には、前者に対してはその作用を阻害する antagomiR を、また後者に対してはその作用を模倣する agomiR を、それぞれ頭頸部癌細胞あるいは子宮癌細胞に遺伝子導入し、その細胞形質転換能力に対する影響を検討する。

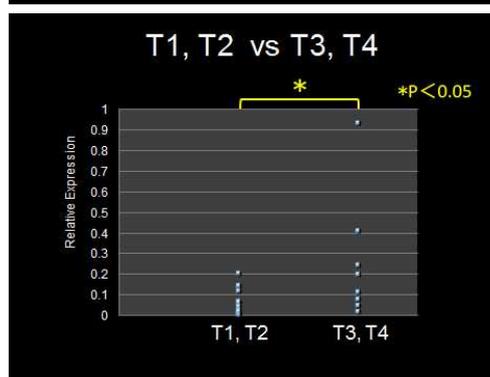
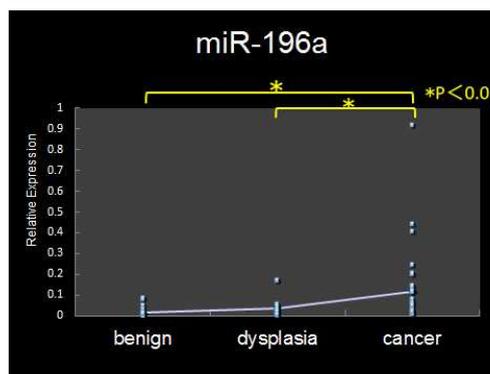
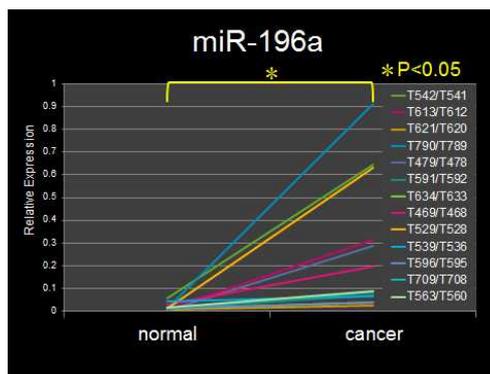
(2) これらの miRNAs を標的とした、in vivo での抗腫瘍効果・治療効果を検討する。具体的には、ヌードマウスの頸部皮下あるいは大腿部や背部皮下に異種モデルを作成し、3-5 mm 大になった時点で、AteloGene (KOKEN) を用いて antagomiR あるいは agomiR による治療効果を評価する。このとき、二日おきに遺伝子を腫瘍周辺に注射投与し、3-4 回投与した時点で腫瘍のサイズを測定し、未治療群、治療群、コントロール miRNA 導入群で比較する。治療後の残存腫瘍は摘出し、そのアポトーシスを TUNEL 法による免疫染色にて検討する。また、周囲リンパ節も摘出し、転移の有無も検討項目に加える。

#### 4. 研究成果

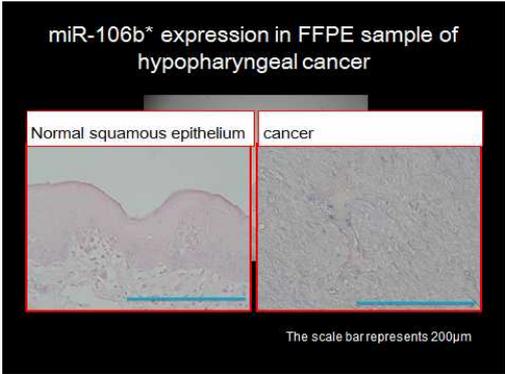
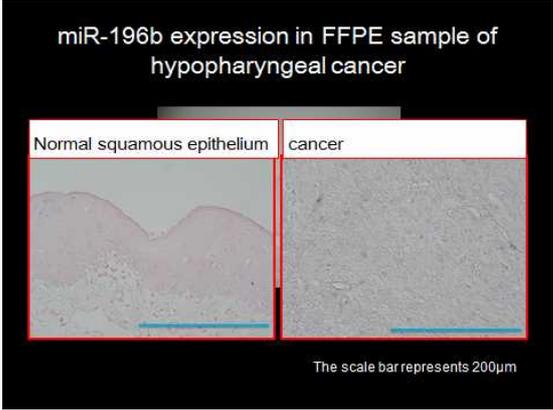
我々は、喉頭癌、下咽頭癌及び子宮頸癌を検体として、組織・疾患特異的に発現するといわれているマイクロ RNA (以下 miRNA) の比較検討を行なうことで前癌病変を理解し、癌の発症、進展の機構を明らかにすることを研究目標とした。まず miRNA のプロファイリングとして、蓄積された臨床検体を用いて、それぞれの組織から miRNA を含む total RNA を抽出し microarray を用いて網羅的に解析後、TaqMan qRT-PCR を用いて定量的発現解析を行

った。

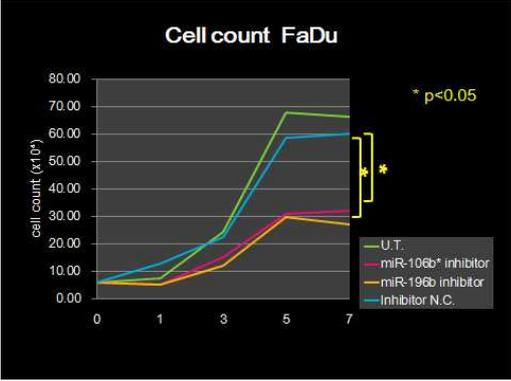
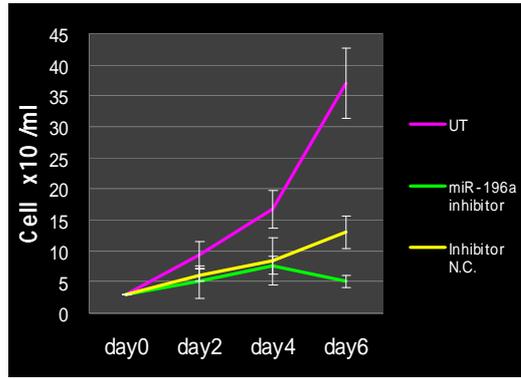
その結果、それぞれの癌において特異的に発現が上昇するまたは低下する miRNA の候補を突き止めるに至った。そして特に喉頭癌で発現上昇がみられた miR-196a においては、臨床検体 84 検体を用いて解析した結果、(1) 同一患者の癌部と非癌部、(2) 正常組織、良性疾患、前癌病変、癌の各疾患群同士、(3) 早期癌と進行癌とを比較し、有意差を認めた。



また、下咽頭癌では検体組織における癌部と非癌部における miR-196b、miR-106b\* (両者とも下咽頭癌で発現上昇がみとめられた miRNA) の免疫染色を行ったところ、非癌部と比較し癌部での染色を認めた。



一方細胞実験では、頭癌細胞株、下咽頭癌細胞株に、前述の候補miRNAを導入（癌組織における発現が上昇しているmiRNAではinhibitor、発現の低下しているmiRNAではmimicを導入）することにより、miRNAが細胞増殖へ与える影響について検討した。評価はcell count、画像解析ソフトを用いた。喉頭癌においてはmiR-196a inhibitor、下咽頭癌においてはmiR-196b inhibitor、miR-106b\* inhibitor、miR-375 mimicを導入した細胞で有意差を示した。婦人科癌の候補miRNAにおける細胞実験及び比較までは遂行できなかった。



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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Disease specific miRNAs as novel therapeutic target for hypopharyngeal cancer  
宇野光祐 斎藤康一郎 稲垣康治 他。  
 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月23日 大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宇野 光祐 (UNO KOSUKE)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：20464828