

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592505

研究課題名(和文) 核酸医薬の併用による上顎癌新規治療法の確立に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Identification of tumor suppressive nucleic acid medicine in maxillary sinus squamous cell carcinoma

研究代表者

花澤 豊行 (Hanazawa, Toyoyuki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90272327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：上顎洞扁平上皮癌のマイクロRNA発現プロファイルから、マイクロRNA-874(miR-874)が顕著に発現抑制されている事が明らかとなった。癌細胞株にmiR-874を核酸導入する事により、癌細胞のアポトーシスが誘導された。miR-874の標的分子を探索した結果、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC1)を直接制御する事を証明した。HDACは細胞内情報伝達や細胞周期の制御にも関与しており、癌治療の標的分子として重要である。本研究により、上顎洞扁平上皮癌において、癌抑制型miR-874-HDAC1の分子経路の重要性が明らかとなった。今後の治療戦略を考える上で大きな手掛かりを得る事ができた。

研究成果の概要(英文)：Our recent studies of microRNA (miRNA) expression signature of maxillary sinus squamous cell carcinoma (MSSCC) demonstrated that microRNA-874 (miR-874) was significantly downregulated in cancer tissues, suggesting miR-874 function as a tumor suppressor. Restoration of mature miR-874 significantly inhibited cancer cell proliferation and induced apoptosis. Expression data of miR-874 transfectants and in silico analysis demonstrated that histone deacetylase 1 (HDAC1) was a direct target of miR-874 regulation. Silencing of the HDAC1 gene significantly inhibited cell proliferation and induced G2/M arrest and cell apoptosis in cancer cell. Downregulation of miR-874 was a frequent event in HNSCC. miR-874 acted as a tumor suppressor and directly targeted HDAC1. Recognition of tumor-suppressive miRNA-mediated cancer pathways provides new insights into the potential mechanisms of MSSCC oncogenesis and suggests novel therapeutic strategies for the disease.

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：microRNA 上顎洞癌 癌抑制遺伝子 miR-874 HDAC1

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析研究の成果として、ヒトゲノム中には、蛋白をコードしない機能性 RNA 分子が多数存在する事が示された。この中で、マイクロ RNA と呼ばれる RNA 分子は、19 ~ 22 塩基程度の 1 本鎖 RNA であり、その機能は、蛋白コード遺伝子に配列依存的に結合し、分解や翻訳阻害により標的となる遺伝子の発現制御を行う事である。1 種類のマイクロ RNA は、数十 ~ 数千の蛋白コード遺伝子の発現制御を行う事が明らかとなっている。そのため、マイクロ RNA の発現異常は、細胞内の RNA ネットワーク (マイクロ RNA-蛋白コード遺伝子) の破綻を引き起こし、ヒト癌を含め様々な疾患において、マイクロ RNA の発現異常が報告されている。しかしながら、上顎洞扁平上皮癌における網羅的なマイクロ RNA 研究の報告は極めて少ない。そこで、本疾患におけるマイクロ RNA 研究から、上顎洞扁平上皮癌に特徴的な機能性 RNA ネットワークを明らかにする事は、本疾患の分子メカニズムの解明にとどまらず、新たな治療戦略の構築にも寄与すると考えた。

2. 研究の目的

上顎洞扁平上皮癌臨床検体を用いた網羅的なマイクロ RNA 発現解析を施行し、上顎洞扁平上皮癌において発現変動を認めるマイクロ RNA の探索を行う。癌組織において発現抑制されているマイクロ RNA に着目し、その機能解析から、癌抑制型マイクロ RNA を探索する。上顎洞扁平上皮癌・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、本疾患の新規分子メカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

上顎洞扁平上皮癌臨床検体より total RNA を抽出し、PCR-base array により、778 種類のマイクロ RNA の発現を解析した。癌組織で発現抑制されているマイクロ RNA を癌細胞株に核酸導入し、細胞増殖の抑制、アポトーシス細胞の誘導を指標にしてスクリーニングを行った。癌抑制機能を有するマイクロ RNA について、ゲノム科学的手法により、その標的遺伝子の探索を行った。候補となった標的遺伝子については、上顎洞扁平上皮癌臨床検体における発現、siRNA を用いた機能解析を施行し、上顎洞扁平上皮癌における癌遺伝子機能の検討を行った。

4. 研究成果

上顎洞扁平上皮癌臨床検体におけるマイクロ RNA 発現プロファイルの結果、マイクロ RNA-874 (miR-874)、miR-133a、miR-375、miR-204、miR-1 など、23 種類のマイクロ RNA の発現が低下している事が判明した(表 1)。この中で、最も発現抑制されていた miR-874 に着目し、その機能解析を行った。その結果、

miR-874 を上顎扁平上皮癌・頭頸部扁平上皮癌細胞株に核酸導入すると、細胞増殖の抑制および癌細胞のアポトーシス誘導が観察された。この事から、miR-874 は、上顎洞扁平上皮癌における新規癌抑制型マイクロ RNA である事が示された。

表 1 上顎洞扁平上皮癌検体で発現低下していたマイクロ RNA

MicroRNA	Accession no.	Fold change	Normalised ratio		P-value
			Normal	Tumour	
miR-874	MIMAT0004911	0.011	3.05E-04	3.36E-06	0.0463
miR-133a	MIMAT0000427	0.017	1.89E-02	3.14E-04	0.0033
miR-375	MIMAT0000728	0.035	3.95E-02	1.36E-03	0.0161
miR-204	MIMAT0000265	0.045	3.26E-02	1.47E-03	0.0055
miR-1	MIMAT0000416	0.054	1.88E-03	1.02E-04	0.0024
miR-139-5p	MIMAT0000250	0.132	3.61E-02	4.75E-03	0.0044
miR-145	MIMAT0000437	0.167	6.57E-01	1.10E-01	0.0367
miR-143	MIMAT0000435	0.177	2.58E-01	4.57E-02	0.019
miR-486-3p	MIMAT0004762	0.183	2.26E-03	4.13E-04	0.0407
miR-146a	MIMAT0000449	0.253	1.09E+00	2.76E-01	0.0041
miR-410	MIMAT0002171	0.254	4.92E-04	1.25E-04	0.002
miR-126	MIMAT0000445	0.262	3.16E+00	8.28E-01	0.0037
miR-539	MIMAT0003163	0.278	4.00E-03	1.11E-03	0.005
miR-134	MIMAT0000447	0.308	1.69E-03	5.19E-04	0.0158
miR-218	MIMAT0000275	0.316	1.62E-02	5.13E-03	0.0329
miR-146b-5p	MIMAT0002809	0.337	5.18E-01	1.75E-01	0.0012
miR-140-3p	MIMAT0004597	0.341	2.04E-02	6.94E-03	0.0111
miR-30a-3p	MIMAT0000088	0.431	6.37E-02	2.75E-02	0.0089
miR-191	MIMAT0000440	0.489	6.22E-01	3.04E-01	0.0251
miR-186	MIMAT0000456	0.51	1.75E-01	8.90E-02	0.0309
miR-148a	MIMAT0000243	0.523	3.30E-02	1.73E-02	0.0334
miR-30e-3p	MIMAT0000693	0.525	4.95E-02	2.60E-02	0.0048
miR-29c	MIMAT0000681	0.552	7.94E-02	4.39E-02	0.0305

次に、miR-874 が制御する遺伝子の探索についてゲノム科学的手法を用いて行った。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC1) を直接制御する事を証明した。HDAC は細胞内情報伝達や細胞周期の制御にも関与しており、癌治療の標的分子として注目されている分子である。

HDAC1 は、上顎洞扁平上皮癌・頭頸部扁平上皮癌の臨床検体で高発現しており、siRNA を用いたノックダウンの実験から、G2/M アレートを引き起こし、アポトーシスを誘導する事が示された (図 1)。

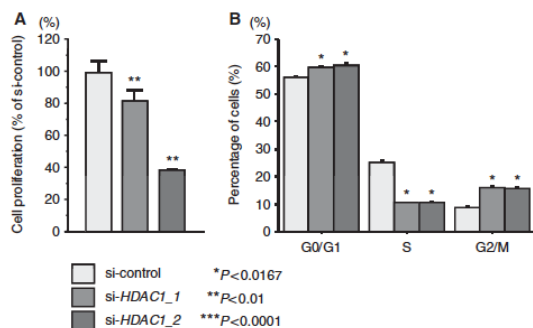


図 1 siRNA を用いた HDAC1 の機能解析。A : XTT アッセイを用いた si-HDAC1 導入 72 時間後の癌細胞の増殖能の変化。B : フローサイトメトリーを用いた si-HDAC1 導入 72 時間後の癌細胞の細胞周期の変化。

研究の成果として、miR-874 は、癌細胞の細胞増殖を顕著に抑制する上顎洞扁平上皮癌・癌抑制型マイクロRNA である事が判明した。miR-874 が制御する分子として、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC1) を直接制御する事を証明した。HDAC は細胞内情報伝達や細胞周期の制御にも関与しており、癌治療の標的分子として注目されている分子である。本研究により、上顎洞扁平上皮癌において、癌抑制型 miR-874-HDAC1 の分子経路の重要性が明らかとなった。今後の治療戦略を考える上で大きな手掛かりを得る事ができた。

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 16 件)

Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma. Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Yamamoto N, Yoshino H, Itesako T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Br J Cancer. (2013) 109:2636-45. doi: 10.1038/bjc.2013.607. (査読有)

Tumour-suppressive microRNA-874 contributes to cell proliferation through targeting of histone deacetylase 1 in head and neck squamous cell carcinoma. Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T, Inamine A, Kikkawa N, Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Br J Cancer. (2013) 108:1648-58. doi: 10.1038/bjc.2013.122. (査読有)

Tumor suppressive microRNA-375 regulates lactate dehydrogenase B in maxillary sinus squamous cell carcinoma. Kinoshita T, Nohata N, Yoshino H, Hanazawa T, Kikkawa N, Fujimura L, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Int J Oncol. (2012) 40:185-93. doi: 10.3892/ijo.2011.1196. (査読有)

Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Sakurai D, Fujimura L, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Katayama A, Harabuchi Y, Okamoto Y, Seki N. Br J Cancer. (2011) 105:833-41. doi: 10.1038/bjc.2011.311. (査読有)

Identification of novel molecular

targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Sakurai D, Sasaki K, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Int J Oncol. (2011) 39:1099-107. doi: 10.3892/ijo.2011.1096. (査読有)

[学会発表](計 20 件)

AACR Annual 104th Meeting (April 6-10, 2013, Washington, DC, USA)
Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion through targeting laminin-332 in head and neck squamous cell carcinoma. Takashi Kinoshita, Toyoyuki Hanazawa, Nijiro Nohata, Naoko Kikkawa, Noriko Yamamoto, Hideki Enokida, Hirofumi Yoshino, Takeshi Yamasaki, Hideo Hidaka, Masayuki Nakagawa, Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki.

8th International Conference on Head and Neck Cancer (July 21-25, 2012, Toronto, ON, Canada)
Tumor suppressive microRNA-1 and microRNA-133a cluster regulating molecular targets in head and neck squamous cell carcinoma. Nijiro Nohata, Toyoyuki Hanazawa, Takashi Kinoshita, Naoko Kikkawa, Daiju Sakurai, Miki Fuse, Hirofumi Yoshino, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa, Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki

第 36 回日本頭頸部癌学会学術講演会(平成 24 年 6 月 7・8 日 島根県民会館 島根)
癌抑制型 microRNA-874 が制御する頭頸部扁平上皮癌の新規分子ネットワークの解明
花澤豊行、野畑二次郎、木下崇、吉川直子、堅田浩司、茶園英明、岡本美孝、関直彦

第 113 回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会(平成 24 年 5 月 10-12 日 朱鷺メッセ 新潟)
癌抑制型 microRNA-375 が制御する分子ネットワークの解明と頭頸部扁平上皮癌新規治療戦略の開発
花澤豊行、野畑二次郎、木下崇、吉川直子、鈴木誉、茶園英明、櫻井大樹、岡本美孝

AACR 103rd Annual Meeting (March, 31-April, 4, 2012, Chicago, IL, USA)
microRNA-874 as a tumor suppressor in maxillary sinus squamous cell carcinoma based on microRNA expression signature
Toyoyuki Hanazawa, Nijiro Nohata, Takashi

Kinoshita,Naoko Kikkawa,Miki Fuse,
Takeshi Chiyomaru, Hirofumi Yoshinoi,
Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa,
Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki

AACR 102nd Annual Meeting (April 2-6,
2011, Orlando, Florida, USA)

Identification of tumor suppressive
microRNAs in maxillary sinus squamous cell
carcinoma based on microRNA expression
signature

Toyoyuki Hanazawa, Nijiro Nohata, Naoko
Kikkawa, Akihiro Katayama, Yasuaki
Harabuchi, Yoshitaka Okamoto, Naohiko
Seki

〔その他〕

ホームページ等

<http://genomejet.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

花澤 豊行 (HANAZAWA TOYOYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90272327

(2)研究分担者

関 直彦 (SEKI NAOHICO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50345013