

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462676

研究課題名(和文) 機能性RNA分子ネットワーク解析による下咽頭癌の新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategies of hypopharyngeal cancer based on the RNA network analysis

研究代表者

吉川 直子 (KIKKAWA, Naoko)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50400924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は下咽頭癌マイクロRNA発現プロファイルから、miR-504が、下咽頭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-504を核酸導入すると、細胞増殖が顕著に抑制された事から、miR-504は「癌抑制型マイクロRNA」である事が判明した。更に、miR-504が制御する遺伝子の中で、cyclin-dependent kinase 6 (CDK6)は下咽頭癌組織において高発現している事を見出した。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、下咽頭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)：Despite of considerable advances in multimodality therapy, the overall 5-year survival rate for patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC) is ranging from 30-40%. To date, there is no effective treatment resumes for patients with recurrence and distant metastasis of HSCC. Our recent study of microRNA (miRNA) expression signature of HSCC showed that miR-504 was significantly reduced in cancer tissues. Ectopic expression of miR-504 markedly suppressed cancer cell proliferation. To identify the molecular targets of miR-504, cell cycle-related genes were selected as target genes of miR-504. The expression of cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) was significantly higher in HSCC tissues compared to non-cancer tissues. Expression of miR-504 inhibited CDK6 expression in HSCC cells. The identification of target oncogenes regulated by miR-504 might lead to a better understanding of HSCC pathogenesis the development of new therapeutic strategies to treat this disease.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：マイクロRNA 頭頸部扁平上皮癌 下咽頭癌 miR-504 CDK6

1. 研究開始当初の背景

(1) 下咽頭癌の臨床的背景

頭頸部癌の中で、下咽頭癌は 10% 余りを占め、ほとんどが扁平上皮癌である。罹患数は漸増傾向にあり、頭頸部癌の中でも特に増加が目立つとされている。下咽頭癌は早期に症状が出現しにくいいため、一次治療症例のおよそ 8 割が進行癌(期)であり、全体の 5 年生存率は 30~40% 程度と報告され、非常に予後不良な癌種の一つである。当診療科における下咽頭癌治療成績(2003 年~2012 年・根治治療を施行した 188 症例対象)は、全体の疾患特異的 5 年生存率が 63%、 期症例で 51% であったが、さらなる治療成績の向上が望まれる。切除不能な局所・頸部再発症例や遠隔転移症例に対する有効な治療プロトコルは確立されておらず、未だ予後不良な下咽頭癌の病態解明と新規治療戦略の確立が不可欠である。

(2) 癌研究における機能性 RNA 分子ネットワーク解析

ヒトゲノム中には蛋白をコードしない機能性 RNA が多数存在する事が判明した。その中で、マイクロ RNA は、僅か 19~22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子として機能する。マイクロ RNA の特徴として、1 つのマイクロ RNA は、配列特異的に数百~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。マイクロ RNA の発現異常が癌を含む各種疾患に深く関わっている事が明らかとなってきた。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ている。

(3) 頭頸部扁平上皮癌におけるマイクロ RNA 研究

頭頸部癌においてもマイクロ RNA の解析は、世界規模で精力的に行われている。我々の研究グループでは、これまでに、頭頸部扁平上皮癌(下咽頭癌・上顎癌・口腔癌)からマイクロ RNA 発現プロファイルを独自に作成している。そのプロファイルに基づき、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、「癌抑制型マイクロ RNA」の存在を明らかにしてきた。例えば、miR-218 は、癌細胞の遊走や浸潤に関与する「転移抑制型マイクロ RNA」であり、細胞外マトリックスからのシグナル伝達に関与する遺伝子(群)を制御している事を明らかにした。また、miR-375 や miR-874 は、細胞の増殖に関与する遺伝子を制御している「増殖抑制型マイクロ RNA」である事を明らかにした。

2. 研究の目的

現在においても予後不良である下咽頭扁平上皮癌について、マイクロ RNA を起点とした解析から、下咽頭扁平上皮癌に特徴的な RNA 分子ネットワークを探索する。マイクロ RNA が制御する多数の遺伝子の中から、下咽頭癌の治療の標的となる可能性のある分子を探索する。

3. 研究の方法

(1) microRNA-504 (miR-504) の発現確認
下咽頭癌マイクロ RNA 発現プロファイルにおいて、microRNA-504 (miR-504) の発現低下を認めた。下咽頭扁平上皮癌の臨床検体における miR-504 の発現を PCR を用いて確認した。

(2) miR-504 の機能解析

頭頸部扁平上皮癌細胞株に miR-504 を核酸導入し、XTT 解析による細胞増殖能の測定、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。

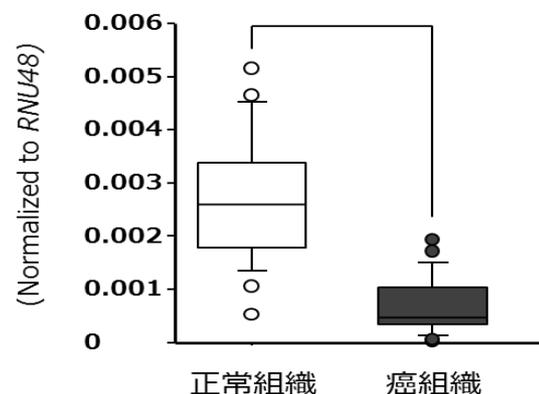
(3) miR-504 が制御する RNA ネットワークの探索

全ゲノム遺伝子発現解析と in silico 解析を用いて、miR-504 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-504 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-504 導入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) をを行い、いくつかの pathway を見出し、標的遺伝子候補を選択した。標的候補遺伝子につき、miR-504 との相関関係や、miR-504 により発現抑制されるかを検討した。

4. 研究成果

(1)

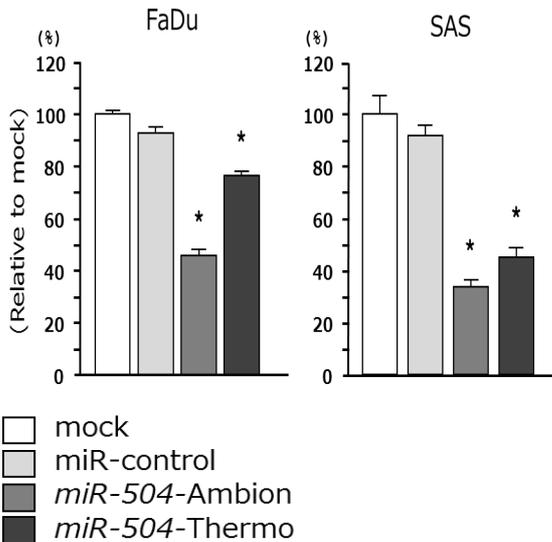
miR-504 は正常組織に比べ、癌組織において有意に発現が低下していた(図 1)。



(図 1) miR-504 の発現 (臨床検体 n=23) (p < 0.0001)

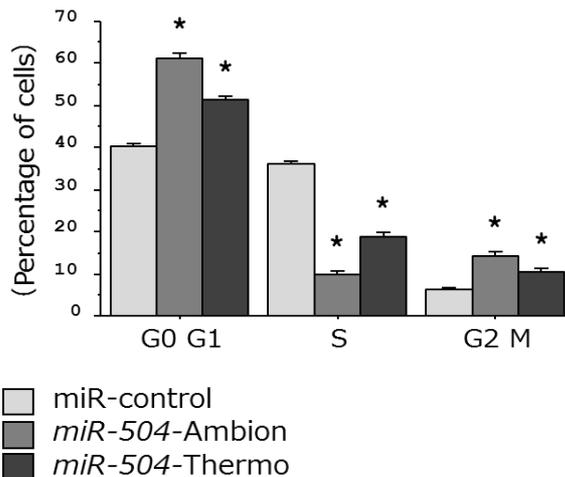
(2)

頭頸部扁平上皮癌細胞株 (FaDu:下咽頭癌由来、SAS:舌癌由来) に miR-504 を核酸導入したところ、癌細胞の増殖が著明に抑制された (図2)。



(図2) 細胞増殖能の測定 (*p<0.01)

又、miR-504 の核酸導入により、下咽頭癌細胞株 FaDu においては、G0/G1 期で停止しアポトーシスを誘導することが判明した(図3)。



(図3) 細胞周期の解析 (*p<0.05)

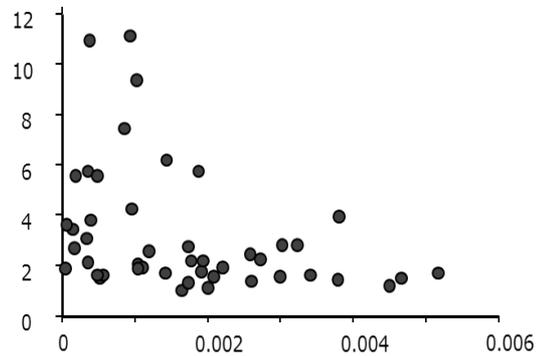
(3)

標的遺伝子候補として複数の細胞周期関連遺伝子が探索された。

- RB1; retinoblastoma 1
- CDK6; cyclin-dependent kinase 6
- CDC23; cell division cycle 23
- CCND1; cyclin D1

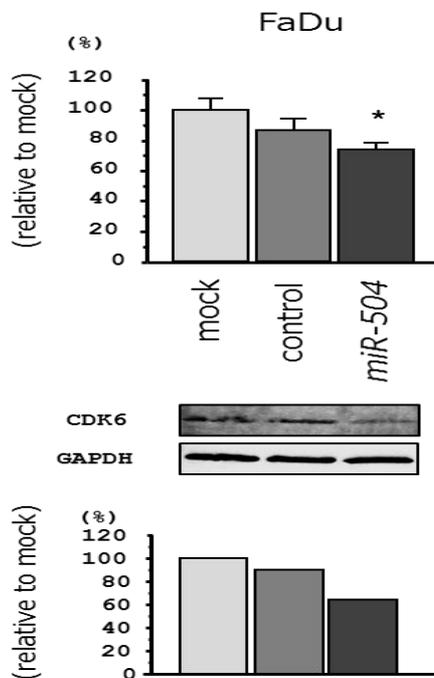
その中でも、CDK6 は、下咽頭癌臨床検体の癌組織において発現が著明に増加していることが判明した。

又、miR-504 と CDK6 の発現の逆相関を確認した (図4)。



(図4) miR-504 と CDK6 の発現の相関関係
縦軸: CDK6 の発現 横軸: miR-504 の発現
相関係数は-0.43(p=0.0039)であった。

さらに、下咽頭扁平上皮癌細胞株に miR-504 を核酸導入し、CDK6 の mRNA とタンパクの発現が有意に抑制されることを確認した(図5)。



(図5) miR-504 による CDK6 の発現抑制
上段: mRNA レベル、下段: 蛋白レベル
(*p<0.0167)

(結果まとめ)

下咽頭癌マイクロ RNA 発現プロファイルより、癌組織において発現低下している miR-504 を癌抑制型マイクロ RNA 候補として見出した。頭頸部扁平上皮癌細胞株に miR-504 を核酸導入すると、細胞増殖が顕著に抑制されたことから、miR-504 は細胞増殖に参与する「癌抑制型マイクロ RNA」である事が判明した。更に、miR-504 が制御する癌促進型遺伝子を探索した結果、細胞周期に参与する遺伝子 cyclin-dependent kinase 6 (CDK6)を見出した。CDK6 は、下咽頭癌組織において高発現し、

miR-504 の発現と逆相関を認めた。
下咽頭癌において癌抑制型 miR-504 は癌部で発現低下し細胞周期に関わる標的遺伝子 CDK6 が過剰発現している分子機構の一端が明らかとなった。
癌抑制型マイクロ RNA を起点とした機能性 RNA 分子ネットワークの探索は、下咽頭癌の病態解明に有効であり、新規治療法の開発へ向けて重要な知見を提供すると考えられる。

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6件)

Fukumoto I, Kikkawa N, Matsushita R, Kato M, Kurozumi A, Nishikawa R, Goto Y, Koshizuka K, Hanazawa T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Tumour-suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218) concertedly suppressed metastasis-promoting LOXL2 in head and neck squamous cell carcinoma. J Hum Genet. (2015) 61:109-118. 査読有

Fukumoto I, Hanazawa T, Kinoshita T, Kikkawa N, Koshizuka K, Goto Y, Nishikawa R, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N.

MicroRNA expression signature of oral squamous cell carcinoma: functional role of microRNA-26a/b in the modulation of novel cancer pathways.

Br J Cancer. (2015) 112:891-900. 査読有

Fukumoto I, Kinoshita T, Hanazawa T, Kikkawa N, Chiyomaru T, Enokida H, Yamamoto N, Goto Y, Nishikawa R, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N.

Identification of tumour suppressive microRNA-451a in hypopharyngeal squamous cell carcinoma based on microRNA expression signature.

Br J Cancer. (2014) 111:386-394. 査読有

Kikkawa N, Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T, Yamamoto N, Fukumoto I, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N.

microRNA-504 inhibits cancer cell proliferation via targeting CDK6 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. (2014) 44:2085-2092. 査読有

Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Yamamoto N, Yoshino H, Itesako T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N.

Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma. Br J Cancer. (2013) 109:2636-2645. 査読有

Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T,

Inamine A, Kikkawa N, Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N.

Tumour-suppressive microRNA-874 contributes to cell proliferation through targeting of histone deacetylase 1 in head and neck squamous cell carcinoma.

Br J Cancer. (2013) 108:1648-1658. 査読有

[学会発表](計4件)

吉川直子、蒔田勇治、大熊雄介、山崎一樹、茶園英明、花澤豊行、岡本美孝

当科における口腔がん症例の臨床的検討
第28回日本口腔・咽頭科学会 2015年9月10日11日 ホテル阪神(大阪府・大阪市)

吉川直子、木下崇、福本一郎、花澤豊行、岡本美孝、関直彦

下咽頭癌において miR-504 は CDK6 の制御を介して細胞増殖を抑制する

第38回日本頭頸部癌学会 2014年6月12日13日 東京ファッションタウンビル(東京都・江東区)

吉川直子、花澤豊行、木下崇、福本一郎、岡本美孝

下咽頭癌における癌抑制型 microRNA-504 の機能解析と標的分子の探索

第115回日本耳鼻咽喉科学会総会 2014年5月14日15日16日17日 ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡市)

吉川直子、花澤豊行、木下崇、野畑二次郎、茶園英明、岡本美孝、関直彦

頭頸部扁平上皮癌における microRNA-29-family の機能解析 細胞浸潤抑制に関わる分子ネットワークの解明

第37回日本頭頸部癌学会 2013年6月13日14日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

[その他]

ホームページ：<http://genomejet.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川直子 (KIKKAWA, Naoko)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50400924

(2) 研究分担者

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

関直彦 (SEKI, Naohiko)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50345013

(3) 研究連携者

なし