

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462691

研究課題名(和文) バイオマーカーとしての頭頸部癌関連スモールRNA

研究課題名(英文) cancer-related small RNA as a biomarker for head and neck cancer

研究代表者

齋藤 康一郎 (Saito, Koichiro)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：40296679

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)：頭頸部癌のなかでも頻度の高い喉頭癌において、将来的にバイオマーカーとなり得るスモールRNAとして、miR-196aを見出した。miR-196aに関しては、マウスモデルを用い、その阻害剤を投与することで、新たな治療標的となる可能性を示唆する結果も得ることができた。さらに、近年注目されているヒトパピローマウイルス(HPV)関連の頭頸部腫瘍のなかでも、再発・多発を繰り返す、臨床的悪性と称される、喉頭乳頭腫に注目した。我々はこの疾患に関与するHPVの遺伝子型の解析を行い、従来から報告のあるHPVの6型、11型以外の遺伝子も検出し、その臨床的背景と比較検討した結果を、国内外で報告することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have found that miR-196a could be a potential diagnostic biomarker for laryngeal cancer. Furthermore, results of our study suggested that this miR could be a promising future diagnostic target to treat laryngeal cancer. Furthermore, we have investigated the human papillomavirus (HPV) expression in laryngeal papilloma. We found expressions of several unique HPV subtypes in laryngeal papilloma tissues. We further assessed the HPV subtypes combined with our abundant clinical background data of the patients, and found several promising findings. These unique and promising results offered multiple opportunities for us to present our data in Japan and US.

研究分野：喉頭科学

キーワード：頭頸部癌 診断 治療

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は、手術・放射線・抗癌剤を組み合わせた集学的治療を行っても、その根治性はとくに進行癌では 30%程度に留まっている (Jemal, A. et al. CA Cancer J Clin. 57, 2007.)。また、治療が奏功して根治を得られたとしても、整容面の著しい障害や、発声・嚥下機能不全など、QOL の低下を伴い、患者・家族に苦痛を強いることとなる点が、頭頸部癌の悲惨な一面である。近年、新規治療戦略のひとつとして分子標的治療が注目され、固形腫瘍においては上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR)、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)/血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGF receptor: VEGFR) がそのターゲットとして研究されてきた。これらを分子標的としたモノクローナル抗体や、チロシンキナーゼ (TK) 阻害薬が臨床現場で使用されてきてはいるものの、薬剤への耐性化や効果の人種差、さらには強い副作用など、解決すべき点が山積している。頭頸部癌でも、その 90%以上で過剰発現されている EGFR をターゲットとし、その TK 阻害薬の臨床試験 (Cohen EEW. J Clin Oncol. 24, 2006.) や、抗 EGFR 抗体 (セツキシマブ, Cmax) と放射線治療の併用 (Bonner JA, et al. N Engl J Med. 354, 2006) といった試みがなされてきたものの、局所制御率は 15 ヶ月程度、3 年生存率も 55% に留まり、決定的な治療とは言い難い状況であった。頭頸部癌で最も使用が一般化してきている Cmax でも、頭頸部癌への作用機序が明らかでなく、単剤での使用効果も疑問の余地があり、その適応基準は明文化されておらず、使用は医師個人個人の裁量に任されている。このような状況のなかで、これまでの抗体医薬品あるいは低分子合成医薬品などの医薬品の約 90% は主にタンパク質への作用を標的として設計されてきたのに対し、近年明らかにされている生体内の RNA 機能解明と相まって、RNA 医薬を含めた核酸医薬に関心が高まってきていた。

2. 研究の目的

本研究は、我々が独自に突き止めた頭頸部癌に特徴的な miRNAs 発現プロファイルに基づき、将来的に診断や治療の標的となり得る、疾患に特徴的な small RNA の発現プロファイルの検討と、その治療標的としての可能性の検討を目的とした。さらに、近年中咽頭などで増加傾向にあることから注目を集めている、ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染を含め、頭頸部癌や前癌病変の背景因子を、臨床面を含めて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者が喉頭科学を専門としていることから、頭頸部癌のなかでもとくに喉頭癌を中心とし、臨床検体を用いた解析を行った。これまでの我々の解析に基づき、喉頭癌に特徴的な発現上昇を認める miRNAs 6 種 (miR-21, miR-130b*, miR-196a, miR-455-3p,

miR-455-5p, miR-801) と、特徴的な発現低下を認める miRNAs 3 種 (miR-133b, miR-145, miR-375) に絞って解析を進めた。さらに、喉頭癌組織で顕著な発現を認めた miR-196a に関しては、バイオマーカーとしてのポテンシャルを検証するため、良性疾患、前癌病変、早期癌、進行癌それぞれ多数の臨床検体を用い、その発現傾向の差異を検討した。加えて、マイクロ RNA には遺伝子配列レベルで細かいバリエーション (isomiR) が存在するが、miR-196a に関してそのバリエーションの分布も検討した。

(2) miR-196a の、頭頸部癌治療標的としての可能性を探索するため、その阻害剤を細胞レベル (in vitro) ならびに動物レベル (in vivo) で用い、抗腫瘍効果を検討した。

(3) 喉頭癌は、臨床的に白板症と称される前癌病変の一部が癌化すると考えられている。この白板症のうち、前癌病変に留まっているものと、癌化しているものの違いが検出できれば、早期発見と低侵襲な治療が可能となる。そこで、声帯白板症の患者の臨床的因子と、その病理組織像の比較検討を行った。

(4) さらに、近年増えてきている頭頸部の HPV 感染関連疾患のうち、喉頭乳頭腫は、再発・多発を繰り返す、臨床的には悪性の腫瘍である。我々はこの疾患に注目し、腫瘍に感染している HPV の遺伝子型を解析し、同時にその病理学的所見との比較検討も行った。

4. 研究成果

(1) 組織検体でのスクリーニング結果をもとに、標的とするマイクロ RNA を疾患特異的に上昇していた miR-130b-5p, miR-196a, miR-455-5p、ならびに減少していた miR-133b の 4 つに絞り込んだ。とくに喉頭の前癌組織、喉頭の前癌病変である白板症、喉頭癌と段階的な上昇を認めた miR-196a に関しては検体数を増やし、早期癌と進行癌、あるいは良性疾患と前癌病変の間でも発現量に差異があることを突き止めた。さらに、この miR-196a は、喉頭癌の前癌部分の扁平上皮では発現を認めず、癌組織ならびにその周囲の間質で発現していることも、組織学的検討により確認した。

(2) miR-196a の阻害剤により、頭頸部癌細胞の増殖を細胞レベル (in vitro) ならびに動物レベル (in vivo) で抑制することも突き止めた。すなわち、miR-196a が頭頸部癌の新たな治療標的となる可能性も示唆する結果を得たこれら (1)(2) の結果については、"MicroRNA-196a Is a Putative Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target for Laryngeal Cancer" として PLoS One. 2013 Aug 14; 8(8): e71480. 誌上に発表した。さらに、miR-196a の isomiR に関してそのバリエーションの分布を検討した結果、喉頭癌と喉頭の前癌組織で、あるいは喉頭癌と癌ではないが腫瘍の代表である喉頭乳頭腫の間でもその分布が異なることも突き止めた。これらの事実は癌化のメカニズムに参与している可能

性があり、臨床的には喫煙というリスクファクターを持たない非喫煙者でも喉頭癌を発生する症例や、喉頭乳頭腫のなかでも癌化（悪性転化）する症例の背景因子の一端を担っている可能性があることを示唆した。

(3) 非喫煙者で癌化した白板症の臨床的な背景の解析を行った結果、自然消退した白板症はその多くが3ヶ月程度の期間に所見が変化していたことや、白板症でも音声の嚙声度や発声時の声門閉鎖、声帯振動の障害といった項目と観察期間を組み合わせることで、ある程度臨床所見から病理組織の推察が可能であることを突き止めた。結果は国内外の学会で発表した。

(4) 近年悪性腫瘍との関連が注目されているヒト乳頭腫ウイルス感染症のひとつである喉頭乳頭腫に関しても外科的・薬物的治療といった臨床面ならびに関連しているヒトパピロームウイルスのタイプと臨床的な悪性度の関連などについての基礎的研究をすすめた。40検体以上の組織を用いて解析したが、そのほとんどにHPVウイルスが検出された。従来報告では、喉頭乳頭腫に感染しているHPVの遺伝子型は、6型と11型がほとんどとされてきた。我々の検討でも、同様に6型単独の感染例が3/4程度を占めた一方で、11型単独の感染は1/6程度、その他6型と11型の混合感染、さらには66型、39型、82型といった、これまでほとんど報告のないウイルス型の感染も検出することができた。これらの検討結果に関しては、日本耳鼻咽喉科学会総会のシンポジウムにおいて講演し、複数の論文として発表した。

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 8 件)

1. 大久保 啓介, 齋藤 康一郎. 【小児耳鼻咽喉科診療における論点】喉頭乳頭腫はどのように治療するか? 手術的治療の立場から. *JOHNS* 31:1783-1786, 2015. (査読無)
2. 齋藤 康一郎. 【耳鼻咽喉科薬物療法2015】耳鼻咽喉科の疾患・症候別薬物療法 喉頭乳頭腫. *JOHNS* 3: 1346-1348, 2015. (査読無)
3. 齋藤 康一郎. 喉頭良性疾患の診断と治療. *耳鼻咽喉科学会会報* 118: 894-897, 2015. (査読無)
4. 齋藤 康一郎. 【長引く咳を診る】疾患別 咳の診かた 喉頭疾患による咳. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 87: 798-801, 2015. (査読無)
5. 齋藤 康一郎, 宇野 光祐. 【咽喉頭異常感の疑問に答える】咽喉頭異常感をきたす機序を教えてください. *JOHNS* 31: 5-10, 2015. (査読無)
6. 齋藤 康一郎. ヒト乳頭腫ウイルス感染の現状と新しい展開 喉頭乳頭腫を巡る

現状と現実的なアプローチ2013. *日本耳鼻咽喉科学会会報* 117: 614-630, 2014. (査読無)

7. 齋藤 康一郎. 喉頭乳頭腫の取り扱い. *日本耳鼻咽喉科学会会報* 116: 1342-1343, 2013. (査読無)
8. 齋藤 康一郎. ここに注目! 知っているようで知らない疾患のトリセツ (file_046) 喉頭がん. *Credentials* 64: 12-13, 2013. (査読無)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 齋藤康一郎. 喉頭乳頭腫の臨床的取扱い. *日本耳鼻咽喉科学会広島県地方部会研修会*. 2016.2.25. 広島. 招待講演
2. 齋藤康一郎. 喉頭乳頭腫の取り扱い. *東京都耳鼻咽喉科医会学術講演会*. 2015.12.5. 東京. 招待講演
3. 齋藤康一郎. 喉頭疾患の診断、治療に関する up-to date. *杉並区耳鼻咽喉科専門医会学術講演会*. 2015.11.27. 東京. 招待講演
4. 齋藤康一郎. 喉頭乳頭腫への関わり方. 第3回 Airway Club Tama (多摩地区鼻疾患研究会). 2015.10.31. 東京. 招待講演
5. Takeyuki Kono, Koichiro Saito, Haruna Yabe, Kosuke Uno, Kaoru Ogawa. Postoperative Glottal Function and Voice-Related QOL after Type 1 and Type 2 Cordectomy Against Laryngeal Leukoplakia. *American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Annual Meeting*. Orlando, FL, USA: Sep. 21-24. 2014. poster
6. Kosuke Uno, Koichiro Saito, Takeyuki Kono, Haruna Yabe, Kaoru Ogawa. Unique Clinical Findings in Laryngeal Leukoplakia to Predict Serious Histopathology in Low-Risk Non-Smokers. *American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Annual Meeting*. Orlando, FL, USA: Sep. 21-24. 2014. poster
7. Kosuke Uno, Koichiro Saito, Takeyuki Kono, Haruna Yage, Kaoru Ogawa. Demographic investigation of laryngeal leukoplakia in non-smokers -Predictors for serious pathology in the low-risk group-. 5th World Congress of IFHNOS (International Federation of Head and Neck Oncologic Societies) & Annual Meeting of the AHSN (American Head and Neck Society). New York City, NY, USA: Jul. 26-30. 2014. poster
8. 齋藤康一郎. シンポジウム 基礎「喉頭疾患とヒト乳頭腫ウイルス」喉頭乳頭腫に対する外科的治療での挑戦 ~精度・効果の向上と機能温存を目指して. 第26回日本喉頭科学会 2014.3.6-7 沖縄. シ

ンポジウム

9. 矢部はる奈, 齋藤康一郎, 宇野光祐, 甲能武幸, 小川郁. 喉頭乳頭腫症例の喉頭機能と音声に関するQOLの検討. 第65回日本気管食道科学会 2013.10.31-11.1 東京.
10. 宇野光祐, 齋藤康一郎, 甲能武幸, 矢部はる奈, 小川郁. 非喫煙者における声帯白色病変の臨床的検討. 第65回日本気管食道科学会 2013.10.31-11.1 東京.
11. 齋藤康一郎. シンポジウム1「人乳頭腫ウイルス感染の現状と新しい展開」喉頭乳頭腫と HPV -喉頭乳頭腫への効果的かつ現実的なアプローチ 2013-. 第114回日本耳鼻咽喉科学会 2013.5.15-18 札幌. シンポジウム
12. 矢部はる奈, 齋藤康一郎, 宇野光祐, 小川郁. 当科における喉頭乳頭腫の臨床的検討. 第114回日本耳鼻咽喉科学会 2013.5.15-18 札幌.

〔図書〕(計 2 件)

1. 塚崎朝子著. 喉頭がん担当 齋藤康一郎. 講談社. 慶應義塾大学病院の医師 100 人と学ぶ病気の予習帳. 130-131, 2015.
2. 久育男編. 第四章担当 齋藤康一郎. 中山書店. ENT 臨床フロンティア. 132-138, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤康一郎 (SAITO, Koichiro)
杏林大学医学部 耳鼻咽喉科学 教授
研究者番号：40296679

(2)研究分担者

岩丸有史 (IWAMARU, Arifumi)
慶應義塾大学 医学部 研究員
研究者番号：00296592
座間猛 (ZAMA, Takeru)
慶應義塾大学 医学部 特任講師
研究者番号：30296719

(3)連携研究者

()

研究者番号：