

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861528

研究課題名(和文) 唾液腺導管癌新規治療法開発に向けた機能性RNA分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Identification of microRNA-mediated networks in salivary duct carcinoma

研究代表者

木下 崇 (Kinoshita, Takashi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00648462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺に発生する唾液腺導管癌は、局所再発や遠隔転移を高頻度に起こすため極めて予後不良な癌であるが、唾液腺導管癌臨床検体を用いたゲノム解析研究は殆ど行われていない。本研究では、唾液腺導管癌臨床検体を用いた蛋白コード遺伝子と蛋白非コード遺伝子であるマイクロRNAの発現プロファイルを作成し、本疾患に特徴的な分経路の探索を行った。その結果、唾液腺導管癌において、細胞外マトリックスに機能分類される遺伝子群が高発現している事が判明した。また、マイクロRNA発現プロファイルから、唾液腺導管癌において発現が抑制されていたmicroRNA-29bは、細胞外マトリックス遺伝子群を抑制する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salivary duct carcinoma (SDC) is an aggressive disease with poor prognosis. Despite of multimodal therapies (surgical resection with neck dissection, radiation and chemotherapy), SDC frequently occurs local recurrence, and metastasizes to distant organs, such as lung, bone and liver. Most patients die within four years of diagnosis. There is no established treatment protocol for this disease even now. In this study, we constructed gene expression signatures (messenger RNA and microRNA) of SDC and tried to identify the molecular mechanisms that characterize of the disease. Our expression data revealed that ECM-related genes were significantly upregulated in SDC specimens. Moreover, microRNA-29b was significantly reduced in SDC and this microRNA act as a tumor suppressor in cancer cells. Interestingly, microRNA-29b regulates ECM-related genes by in silico analysis. Identification of novel mRNA/microRNA networks could provide new insights into underlying molecular mechanisms of SDC.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：マイクロRNA 頭頸部癌

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、ヒトゲノム中には数多くの蛋白非コード遺伝子が存在しており、実際に転写されている事が明らかとなった。その中で、19塩基~21塩基の1本鎖RNAであるマイクロRNAは、蛋白コード遺伝子の発現を負に調節している事から注目されている分子である。現在、2500種類程度のマイクロRNAがヒトゲノム中に存在している事が示されている。また、1種類のマイクロRNAが数10から数百程度の蛋白コード遺伝子を制御している事から、ゲノム中に存在する殆どの蛋白コード遺伝子はマイクロRNAの制御を受ける事になる。この事は、マイクロRNAの発現異常は、多くの蛋白コード遺伝子の発現を攪乱し、細胞の正常な機能を損なう事が予想される。このような背景の基、癌細胞におけるマイクロRNAの発現異常を調べる研究が精力的に行われ、数多くの癌種において発現低下や高発現するマイクロRNAが見出されている。更に、これらマイクロRNAの機能解析も行われ、「癌促進型」や「癌抑制型」のマイクロRNAが次ぐ次と報告されている。我々研究グループにおいても、上顎癌、下咽頭癌などの頭頸部扁平上皮癌におけるマイクロRNA発現プロファイルを作成し、癌細胞で発現変動するマイクロRNAの探索を行っている。また、発現変動するマイクロRNAを指標とした機能解析から、頭頸部扁平上皮癌・癌抑制型マイクロRNAを明らかにしてきた。唾液腺に発生する唾液腺導管癌は、遠隔転移を高頻度に来たし極めて予後不良な癌である。5年生存率は、早期症例においても40%であり、進行症例では30%以下である。現在においても確固たる治療プロトコルは存在せず、未だ十分な治療戦略も検討されていない。その背景には、唾液腺導管癌を対象としたゲノム解析研究がなされていない事が挙げられる。唾液腺導管は外科的手術が殆ど成されないため、臨床検体を用いた研究報告が殆ど見受けられない。我々は、数年を費やして4例の臨床検体を得る事が出来た。そこで本研究では、唾液腺導管癌臨床検体を用いた蛋白コード遺伝子・マイクロRNA発現プロファイルを作成し、唾液腺導管癌の分子ネットワークの解析を行う事を立案した。

2. 研究の目的

組織学的に乳腺の浸潤性乳管癌に類似した組織像を呈する唾液腺導管癌は、主に耳下腺に発生する極めて予後不良な癌である。当科において、1991年~2010年に、唾液腺導管癌と診断された症例は24例であり、進行症例16例の5年累積生存率は23%であった。進行症例の6割に遠隔転移が観察され、遠隔転移の制御が本疾患の重要な課題である事が改めて示された。しかしながら、唾液腺導管癌の治療のプロトコルは確定しておらず、治療戦略の早急な検討が重要課題である。

治療戦略を考える上で、唾液腺導管・臨床検体を用いたゲノム解析研究は不可欠である。近年、ヒトゲノム中には多くの蛋白非コード遺伝子が存在する事が判明した。その中で、マイクロRNAと定義される低分子RNA核酸は、蛋白コード遺伝子の発現を負に制御する事から注目されている分子である。癌研究において、マイクロRNAの発現異常が、癌細胞の発生・進展・転移に関与する報告が相次いでなされ、マイクロRNAの重要性が示されている。今後の癌研究においては、蛋白コード遺伝子と蛋白非コード遺伝子の双方を解析し、癌細胞におけるRNA分子ネットワークを解明する事が求められている。そこで本研究では、唾液腺導管癌臨床検体より抽出したRNAを基に、蛋白非コード遺伝子および蛋白非コード遺伝子であるマイクロRNAの発現プロファイルを作成し、唾液腺導管における新規分子ネットワーク探索を行う事を目的とした。特に、唾液腺導管癌の特徴である遠隔転移に関わる分子経路を明らかにしたい。

3. 研究の方法

外科的手術を施行した唾液腺導管癌患者(4名)の臨床検体からRNAを抽出し、蛋白コード遺伝子およびマイクロRNA発現解析を行い、唾液腺導管癌RNA発現プロファイルを作成した。マイクロRNAは蛋白コード遺伝子を負に制御している事から、癌細胞で発現低下をしているマイクロRNA(癌抑制型マイクロRNA)の標的遺伝子(癌促進型遺伝子)は、癌細胞で発現が上昇している事が予想される。この事を検証し、新たな唾液腺導管癌のRNAネットワークを探索するため、作成した発現プロファイルを用いて以下の解析を施行した。(1)蛋白コード遺伝子の発現解析から、発現が上昇している遺伝子を選択し、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)を用いて遺伝子の機能分類を行った。(2)マイクロRNA発現解析から、発現抑制されているマイクロRNA(癌抑制型マイクロRNA)を選択し、(1)のプロファイルと比較する事で、癌抑制型マイクロRNAが制御する分子ネットワークを明らかにした。(3)発現抑制されているマイクロRNA(癌抑制型マイクロRNA)の機能解析、および標的となる遺伝子(癌促進型遺伝子)の機能解析を施行し、唾液腺導管癌の遠隔転移の分子メカニズムを明らかにした。

4. 研究成果

(1)唾液腺導管癌・蛋白コード遺伝子発現プロファイルの作成と、唾液腺導管癌分子経路の探索マイクロアレイを用いた解析から、唾液腺導管癌で高発現している遺伝子を探索した。これら遺伝子群の機能を明らかにする目的で、KEGG pathwayを用いて遺伝子の機能分類を行った。その結果、Focal adhesion、ECM-receptor interaction、

Regulation of actin cytoskeletonなどの細胞の遊走や浸潤に關与する分子経路が唾液腺導管癌で活性化している事が判明した。特に、細胞外マトリックスの構成要素であるcollagen や fibronectin、matrix metalloproteinaseの高発現が認められた。また、これら細胞外マトリックスの受容体であるインテグリンも高発現している事が判明した。細胞外マトリックスは、細胞の構造蛋白のみならず、インテグリンを介して細胞内にシグナルを伝達するリガンドとして機能している。細胞の遊走・浸潤には細胞外マトリックス-インテグリンのシグナル伝達機構が重要であり、癌細胞の転移にはこれら遺伝子の高発現が關与している事が報告されている。唾液腺導管癌では、この経路の活性化が起こっている事が明らかとなった。この事は、本疾患が高頻度に遠隔転移を起こす要因となっている可能性が示唆された。

(2) 唾液腺導管癌・マイクロ RNA 発現プロファイルの作成と、マイクロ RNA が制御する唾液腺導管癌分子経路の探索唾液腺導管癌において発現が抑制されている「癌抑制型マイクロ RNA」を探索した結果、microRNA-29b が有意に発現抑制されている事が認められた。そこで、microRNA-29b が配列依存的に標的とする遺伝子群を TargetScan database から抽出し、KEGG pathway を用いて遺伝子の機能分類を行った。その結果、microRNA-29b は、Focal adhesion や ECM-receptor interaction に機能分類される遺伝子群を制御する事が予測された。この結果は、唾液腺導管癌で高発現する遺伝子群と一致しており、microRNA-29b の発現抑制の結果、細胞の遊走や浸潤に關わる Focal adhesion や ECM-receptor interaction 遺伝子群が高発現するという唾液腺導管癌の分子経路が明らかとなった。また、in silico 解析の結果、唾液腺導管癌細胞において、microRNA-29b が制御する可能性の高い癌遺伝子として、SPARC、LOXL2、COL5A2、COL4A1、COL3A1、COL1A2、COL1A1 が候補となった。

(3) microRNA-29b の機能解析
microRNA-29b の癌抑制機能を明らかにするために、成熟型の microRNA-29b (UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU) を癌細胞に核酸導入して、癌細胞の細胞増殖、遊走能、浸潤能について機能解析を行った。その結果、microRNA-29b を核酸導入すると癌細胞の遊走能、浸潤能が顕著に抑制された。この事から、microRNA-29b は、癌細胞の転移を抑制する「転移抑制型マイクロ RNA」である事が明らかとなった。

(4) microRNA-29b の標的候補
LOXL2 (lysyl oxidase-like-2) の機能解析
LOXL2 は、細胞外マトリックスであるコラーゲンとエラスチンの架橋反応を触媒する酵

素である。頭頸部癌由来の細胞株で高発現していたため、siRNA を用いて LOXL2 をノックダウンした。その結果、癌細胞の遊走能、浸潤能が顕著に抑制された。この事から、癌抑制型 microRNA-29b の発現抑制により、LOXL2 が高発現し、癌細胞の遊走・浸潤を促進する事が示唆された。

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4件)

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 Mar 3;112(5):891-900. doi: 10.1038/bjc.2015.19. Epub 2015 Feb 10. PubMed PMID: 25668004 (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 Jul 15;111(2):386-94. doi:10.1038/bjc.2014.293. Epub 2014 Jun 10. PubMed PMID: 24918822; PubMed Central PMCID: PMC4102946. (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 Jun;44(6):2085-92. doi:10.3892/ijo.2014.2349. Epub 2014 Mar 19. PubMed PMID: 24647829. (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 Nov 12;109(10):2636-45. doi: 10.1038/bjc.2013.607. Epub 2013 Oct 3. PMID: 24091622 (査読有)

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

[学会発表](計3件)

第 38 回日本頭頸部癌学会学術講演会
東京都江東区 東京ファッションタウンビル

2014年6月12日

下咽頭癌マイクロ RNA 発現プロファイルに基づく、癌抑制型マイクロ RNA の探索とマイクロ RNA が制御する標的癌遺伝子の同定

木下崇、福本一郎、吉川直子、花澤豊行、岡本美孝、関直彦

第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会

2014年5月16日福岡市ヒルトン福岡シーホーク

木下崇、花澤豊行、野畑二次郎、吉川直子、岡本美孝

頭頸部扁平上皮癌における microRNA-29s によるラミニン・インテグリンシグナル制御機構

AACR Annual Meeting 2014 (April 6 - 11, 2014, San Diego)

Takashi Kinoshita, Nijiro Nohata, Toyoyuki Hanazawa, Naoko Kikkawa, Noriko Yamamoto, Hirofumi Yoshino, Toshihiko Itesako, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa, Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki

Tumor suppressive microRNAs (miR-29s/miR-218) regulate laminin-integrin signaling in head and neck squamous cell carcinoma

[その他]

ホームページ等

千葉大学大学院医学研究院 先端応用医学講座 機能ゲノム学ホームページ

<http://genomejet.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 崇 (KINOSHITA Takashi)

千葉大学・医学部付属病院・医員

研究者番号 : 00648462

(2)研究分担者

()

研究者番号 :