

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861352

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるcyclin D1標的sgRNAによる新規遺伝子標的治療の開発

研究課題名(英文) The gene targeting therapy with the use of sgRNA targeting cyclin D1 for head and neck cancer

研究代表者

坂下 智博 (Sakashita, Tomohiro)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：30455654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：新たな遺伝子発現抑制法であるTRUE gene silencing法によってcyclin D1 mRNAを標的としたsgRNAを用い、頭頸部扁平上皮癌細胞のcyclin D1の発現抑制を介して癌細胞の増殖を抑制できることを培養細胞で明らかにすることができた。臨床場においてcyclin D1強発現を有する頭頸部癌患者さんに対し、cyclin D1 mRNAを標的としたsgRNAの投与を行うことで腫瘍の縮小・生存率の向上を確認することができれば、これら遺伝子標的治療が革新的な治療手段のひとつとして加えられる可能性を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I proved that the efficacy of the gene targeting therapy with the use of the sg RNA targeting cyclin D1 mRNA. It was confirmed that the depression of cyclin D1 expression reduced the proliferating potential of tumor cells. The clinical use of the gene targeting therapy with the use of the sg RNA targeting cyclin D1 mRNA may improve the prognosis of patients with cyclin D1 highly expressive head and neck cancer. It may be possible that this treatment be one of the novel therapies against head and neck cancer.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：頭頸部癌 cyclin D1 遺伝子標的治療

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌に対して手術治療は主要な根治治療のひとつであり、その治療効果を高める補助療法の整備は医療者サイドからも患者サイドからも強く望まれるものであり、低侵襲・低コスト・高効率の補助療法を供する可能性を探求する意義がある。cyclin D1 高発現断端粘膜においては、近年再発のリスクが高いことが明らかにされており、cyclin D1 断端陽性例に対して cyclin D1 を標的とした遺伝子標的治療が確立されれば、いままで困難であった予後不良群に対する有用性の高い術後治療が実現可能であると考えられた。この観点からアプローチした遺伝子標的治療の開発に関する報告は現在までのところみられておらず、成果が得られれば革新的な研究として世界的に受け入れられる可能性を有する。

2. 研究の目的

頭頸部癌術後の局所再発リスクである cyclin D1 高発現群に対する新規追加治療を開発するため、

(1) cyclin D1 を標的とした small guide RNA (以下 sgRNA) の付加により頭頸部癌細胞株の cyclin D1 遺伝子 mRNA の標的塩基配列を切断すること、cyclin D1 蛋白量を現象させることを確認し遺伝子標的治療としての妥当性を確認

(2) sgRNA 付加による頭頸部癌細胞の増殖抑制による治療効果を確認

以上を目的とした。

3. 研究の方法

(1) sgRNA による TRUE gene silencing 法が頭頸部癌細胞において機能するか、すなわち sgRNA が cyclin D1 遺伝子 mRNA の標的塩基配列を特異的に切断するかを分子生物学的手法 (*in vitro* RNA cleavage assay) により検証する。

(2) 最も効果的な cyclin D1 遺伝子の標的領域・sgRNA の型を RT-PCR 法による cyclin D1 遺伝子 mRNA 発現低下量の定量により比較し検討する。

(3) cyclin D1 を標的とした sgRNA の導入により cyclin D1 蛋白量の減少を確認し、頭頸部癌細胞に対する増殖抑制効果を示すかを検討する。

4. 研究成果

新たな遺伝子発現抑制法である TRUE gene silencing 法によって cyclin D1 mRNA を標的とした sgRNA を用い、頭頸部扁平上皮癌細胞の cyclin D1 の発現抑制を介して癌細胞の増殖を抑制できることを培養細胞で明らかにすることができた。臨床の場において cyclin D1 強発現を有する頭頸部癌患者さんに対し、cyclin D1 mRNA を標的とした

sgRNA の投与を行うことで腫瘍の縮小・生存率の向上を確認することができれば、これら遺伝子標的治療が革新的な治療手段のひとつとして加えられる可能性を有していると考えられる。

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 11 件)

1. Morita S, Nakamaru Y, Homma A, Sakashita T, Hatakeyama H, Masuya M, Fukuda S. Comparison of Hearing outcomes after treatment for early -stage external auditory canal cancer. Head Neck 38 Suppl 1, E1110-E1116, 2016. doi: 10.1002/hed.24168. 査読有
2. Suzuki T, Sakashita T, Homma A, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Yoshida D, Fujima N, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Suzuki F, Fukuda S. Effectiveness of superselective intra-arterial chemoradiotherapy targeting retropharyngeal lymph node metastasis. Eur Arch Otorhinolaryngol 273, 3331-3336. 2016. doi: 10.1007/s00405-016-3933-5. 査読有
3. Tsushima N, Sakashita T, Homma A, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Kakizaki T, Suzuki T, Fukuda S. The role of prophylactic neck dissection and tumor thickness evaluation for patients with cN0 tongue squamous cell carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol 273, 3987-3992. 2016. doi: 10.1007/s00405-016-4077-3 査読有
4. Morita S, Homma A, Nakamaru Y, Sakashita T, Hatakeyama H, Kano S, Fukuda A, Fukuda S. The outcomes of Surgery and Chemoradiotherapy for Temporal Bone Cancer. Otol Neurotol 37, 1174-1182. 2016. doi: 10.1097/MAO.0000000000001152. 査読有

- 有
5. Fujima N, Sakashita T, Homma A, Hirata K, Shiga T, Kudo K, Shirato H. Glucose Metabolism and Its Complicated Relationship with Tumor Growth and Perfusion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 11, e01666236. 2016. doi:10.1371/journal.pone.01611734. 査読有
 6. Homma A, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Sakashita T, Kuramoto R, Nakamaru Y, Onimaru R, Tsuchiya K, Yoshida D, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S. A Retrospective Study of G-Tube Use in Japanese Patients Treated with Concurrent Chemoradiotherapy for Hypopharyngeal Cancer. *PLoS One* 11, e0161734. 2016. doi:10.1371/journal.pone.01611734. 査読有
 7. Sakashita T, Homma A, Hatakeyama H, Furusawa J, Kano S, Mizumachi T, Iizuka S, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S. Comparison of acute toxicities associated with cetuximab-based bioradiotherapy and platinum-based chemoradiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: A single-institution retrospective study in Japan. *Acta Otolaryngologica* 135, 853-858, 2015. doi:10.3109/00016489.2015.1030772. 査読有
 8. Sakashita T, Homma A, Hatakeyama H, Furusawa J, Kano S, Mizumachi T, Iizuka S, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S. Clinical outcomes of weekly cisplatin chemoradiotherapy for patients with pyriform sinus cancer. *Int J Clin Oncol*.20,1081-1085,2015. doi: 10.1007/s10147-015-0821-8 査読有
 9. Sakashita T, Homma A, Hayashi R, Kawabata K, Yoshino K, Iwae S, Hasegawa Y, Nibu K, Kato T, Shiga K, Matsuura K, Monden N, Fujii M. The role of initial neck dissection for patients with node-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*.50, 657-661, 2014. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.03.003 査読有
 10. Sakashita T, Homma A, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Furusawa J, Iizuka S, Hoshino K, Hatanaka K, Oba K, Fukuda S. The potential diagnostic role of the number of ultrasonographic characteristics for patients with thyroid nodules evaluated as Bethesda I-V. *Frontiers in Oncology*.23, 261, 2014. doi: 10.3389/fonc.2014.00261. 査読有
 11. Sakashita T, Homma A, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Furusawa J, Yoshida D, Fujima N, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Suzuki F, Fukuda S. Salvage operations for patients with persistent or recurrent cancer of the maxillary sinus after superselective intra-arterial infusion of cisplatin with concurrent radiotherapy. *Br J Oral Maxillofac Surg*.52, 323-328, 2014. doi: 10.1016/j.bjoms.2014.01.018. 査読有
- [学会発表](計 9 件)
1. 坂下智博、林隆一、本間明宏、松浦一登、加藤健吾、川端一嘉、松塚崇、岩江信法、大上研二、藤井正人、眼窩骨壁浸潤を伴う進行上顎洞癌における治療別生存率比較～眼窩内容温存全摘術の妥当性について～, 第 38 回日本頭頸部癌学会総会, 2014 年 6 月 12 日～2014 年 6 月 13 日, 東京ファッションタウンビル(東京

- 都江東区)
2. 坂下智博、本間明宏、林隆一、岩江信法、藤井正人、頸部転移を有する中咽頭扁平上皮癌における初回頸部郭清術の意義、第 27 回日本口腔咽頭科学会総会、2014 年 09 月 11 日～2014 年 09 月 12 日、ホテルライフオート札幌 (北海道札幌市)
 3. 坂下智博、本間明宏、畠山博充、水町貴諭、加納里志、古沢純、飯塚さとし、干野季美子、畑中佳奈子、福田諭、術前細胞診にて悪性が確定しなかった甲状腺結節におけるエコー陽性所見の数と悪性リスクの関係について、第 47 回日本甲状腺外科学会、2014 年 10 月 30 日、ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市)
 4. 坂下智博、北海道大学における頭頸部癌治療の実際とセツキシマブ併用放射線治療の位置づけ、弘前頭頸部癌セミナー (招待講演)、2014 年 11 月 27 日、弘前大学医学部 (青森県弘前市)
 5. Tomohiro Sakashita, Akihiro Homma, Hiromitsu Hatakeyama, Satoshi Kano, Takatsugu Mizumachi, Tomohiko Kakizaki, Nayuta Tsushima, Takayoshi Suzuki, Rikiya Onimaru, Kazuhiko Tsuchiya, Koichi Yasuda, Hiroki Shirato, and Satoshi Fukuda. Acute toxicities associated with cetuximab-based bioradiotherapy and platinum-based chemoradiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas. 23rd Asia Pacific Cancer Conference.2015.8.20-2015.8.22. Grand Hyatt Hotel (Bali, Indonesia.)
 6. Tomohiro Sakashita, Nobuhiko Oridate, Akihiro Homma, Hiromitsu Hatakeyama, Satoshi Kano, Takatsugu Mizumachi, Satoshi Fukuda. The role of cyclin D1 in surgical margins as a potential prognostic indicator.4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology.2015.6.3-2015.6.6. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 7. Tomohiro Sakashita, Akihiro Homma, Hiromitsu Hatakeyama, Satoshi Kano, Takatsugu Mizumachi, Tomohiko Kakizaki, Nayuta Tsushima, Takayoshi Suzuki, Rikiya Onimaru, Kazuhiko Tsuchiya, Koichi Yasuda, Hiroki Shirato, and Satoshi Fukuda. The different nature of mucositis between cetuximab-based bioradiotherapy and platinum-based chemoradiotherapy in malignancies of the upper aerodigestive tracts. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery.2015.12.3-2015.12.4. 一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区)
 8. 坂下智博、本間明宏、対馬那由多、福田諭、舌癌 N0 症例における予防的頸部郭清術の役割と潜在的頸部転移陽性率に関する検討、第 29 回口腔咽頭科学会、2016 年 9 月 8 (日) -2016 年 9 月 9 日、松江テルサ (島根県松江市)
 9. Tomohiro Sakashita, Akihiro Homma, Rikiya Onimaru, Kazuto Matsuura, Hirotaka Shinomiya, Ryuichi Hayashi, Kiyoto Shiga, Hiroyuki Tachibana, Masato Fujii. The multi-institutional dose-finding trial of superselective intra-arterial infusion of cisplatin and concomitant radiotherapy for patients with locally advanced maxillary sinus cancer (JCOG1212, RADPLAT-MS).European society for medical oncology(ESMO) congress 2016. 2016.10.7-2016.10.11. Bella Center (Copenhagen, Denmark)

〔図書〕(計 0 件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 坂下 智博
(Sakashita Tomohiro)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30455654

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：