

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20524

研究課題名(和文) 口腔がんにおけるTERT抑制遺伝子の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification of hTERT suppressor genes located on human chromosome 3

研究代表者

西尾 幸与 (Nishio, Sachiyo)

鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：80726737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：テロメラーゼは多くの癌細胞で活性が認められ、無限増殖性の獲得に強く関与している。本研究では、口腔がん由来細胞株HSC3細胞への正常ヒト3番染色体導入(HSC3#3)は、テロメラーゼの酵素活性サブユニットであるTERT発現抑制を誘導することを明らかにした。加えて、ヒト3番染色体上のTERT抑制遺伝子を明らかにすることを目的とし、HSC3#3を長期培養し、TERTの発現を再び獲得するリバータント細胞(HSC3#R)の樹立、RNAシーケンス解析によって各細胞の遺伝子発現比較を行い候補遺伝子の探索を行った。その結果、新規のTERT抑制遺伝子として11種類の候補遺伝子まで絞り込むことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Telomerase is crucial of cellular immortalization and cancer progression. Telomerase activity is primarily regulated by the expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) which is a protein catalytic subunit of telomerase. In this study, we performed that introduction of a normal human chromosome 3 into OSCC cell line, HSC3, using microcell-mediated chromosome transfer (MMCT). As results, these hybrid clones also showed remarkable transcriptional suppression of TERT expression compared with parental HSC3 cells. To identify the gene responsible for the regulation of TERT transcription, we performed RNA-sequence analysis using parental HSC3 cells, telomerase negative HSC3 microcell hybrids with a chromosome 3 (HSC3#3) and its revertant clones (HSC3#3R) with reactivated telomerase. As a result, we identification of 11 candidate genes which as novel TERT suppressor genes.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：テロメラーゼ 口腔がん 染色体 TERT

1. 研究開始当初の背景

化学療法にて制御しうるがん・悪性腫瘍はおよそ 10%程度で、そのほとんどは白血病や悪性リンパ腫など造血器系腫瘍や性ホルモン感受性の生殖器癌に限られ、口腔がんを初めとする頭頸部腫瘍の大部分を占める扁平上皮癌など、多くの固形がんで完全寛解を得る例は少なく、標準的な治療はない。化学療法は機能保存や治療後 QOL からの期待は高いが、頭頸部悪性腫瘍に対する手術・放射線治療の補助療法や延命のための姑息療法に留まっており、生存期間の延長に対する効果が低いのが現状である。そのため新規の分子標的薬や早期診断法の開発によって、より効率的な治療法を確立することが急務とされている。

これまで、がんの発生においてがん抑制遺伝子の機能異常が重要な要因であることが明らかとされてきた。多くのがん抑制遺伝子は、ヘテロ接合性の喪失(LOH)の解析を通してポジショナルクローニングにより同定されてきた。3番染色体の短腕(3p)のLOHは、ヒト腎細胞がん(96%)や口腔がん(71%)、肺がん(90%)において高頻度に認められる。このことから、3p領域中に存在するがん抑制遺伝子の欠損・変異はがんの発生過程において重要であると考えられる。事実、VHL(3p25)、FHIT(3p14.2)、RASSF1(3p21.3)、遺伝子など、すでに複数のがん抑制遺伝子が同定されている。これらの遺伝子機能として、VHL遺伝子は正常では細胞の増殖を抑制する機能をもつが、変異が起こると腫瘍血管の増殖を促す VEGF 遺伝子の転写が促進され、がんの発生や増悪の原因になることが明らかにされている。FHITは、アポトーシスを誘導することでがんを抑制することが知られており、VHL/FHIT両方をノックアウトさせたモデルマウスでは、100%で肺がんを発症する。また、RASSF1は癌遺伝子であるRASを抑制するがん抑制遺伝子として報告されている。一方、染色体工学技術である微小核融合法を用いた腎がん細胞株RCC23への正常ヒト3番染色体の導入により、テロメラーゼ活性が抑制されることが報告された。テロメラーゼは、がんに無限の増殖性すなわち不死化形質と造腫瘍性を与える酵素であり、その酵素活性中心タンパクであるTERT(Telomerase reverse transcriptase)の発現により制御されていることが知られている。そこで、申請者は先行研究として、Oral squamous cell carcinomas(OSCC)の細胞株であるHSC3に正常ヒト3番染色体を導入した細胞(HSC3 #3)を樹立し、親株とTERTの発現量をリアルタイムPCR法で比較した結果、解析したすべてのHSC3 #3クローンでTERT遺伝子が抑制されていることを見出した。さらに、それは細胞の形態変化を伴うものであった。

このことから、腎細胞がん、口腔がんで共通の3番染色体上にコードされるTERT抑制遺伝子あるいは抑制遺伝子群の存在が示唆

された。

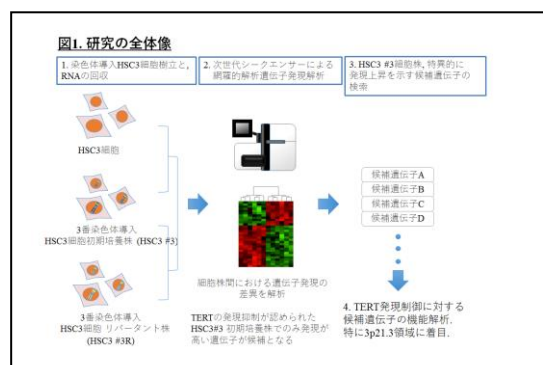
2. 研究の目的

口腔がんは、根治手術による組織喪失に伴い咀嚼・嚥下・構音機能といった口腔機能の低下から、患者のQOL(Quality of Life)を著しく損なわせるという点で特異的である。さらに進行口腔がんにおいて化学療法・放射線療法といった保存療法のみでの根治治療は未だ確立されていない。本研究では染色体工学技術を用いた独自のアプローチにより、口腔がんにおける新規のテロメラーゼ抑制遺伝子を同定し、その機能解析を通して、分子標的治療薬や早期診断法の開発に向けた学術的基盤を確立する。

3. 研究の方法

我々はこれまで微小核細胞融合法(MMCT)を用いて、正常ヒト3番染色体を2つの腎細胞癌細胞株RCC23、KC12細胞に導入した結果、細胞老化が誘導されることを見出した。さらに、それはTERT発現低下を伴うものだった。加えて、RCC23細胞において、染色体工学技術を応用したテロメアトランスフェクション法による断片化染色体導入の実験において、TERT抑制遺伝子が染色体3p21.3上の7Mbの領域内に存在することを明らかにした。一方、3番染色体短腕のLOHが腎細胞癌と同様に、口腔扁平上皮癌(OSCC)においてもしばしばみられる。そこで、我々はOSCCの細胞株であるHSC3へもMMCTを用いて正常ヒト3番染色体を導入する実験を行ったところ、腫瘍形成能の抑制と形態変化が確認され、やはりTERT発現低下を伴うものであった。しかし、具体的にどの遺伝子が重要な分子なのかその決定にまで至っておらず、大きな課題であった。

本研究では、次世代シーケンサーを用いたRNA-seqにより、①HSC3(親株)、②HSC3#3および③HSC3#3R(長期培養により再びTERT発現を呈するリバータントクローン)の3種類の細胞間における網羅的な遺伝子の発現比較解析を行い、導入した正常ヒト3番染色体上特異的な遺伝子プロファイリングの組合せからTERT抑制に関わる遺伝子の同定を試みた(図1)。

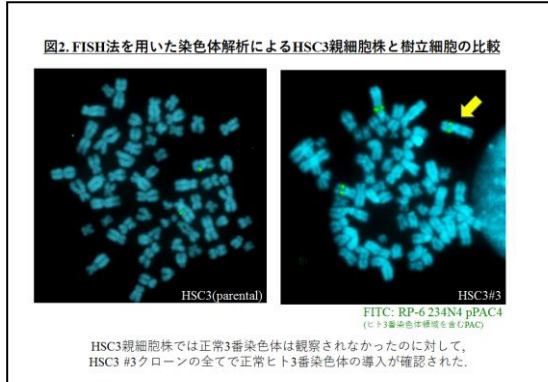


された。

4. 研究成果

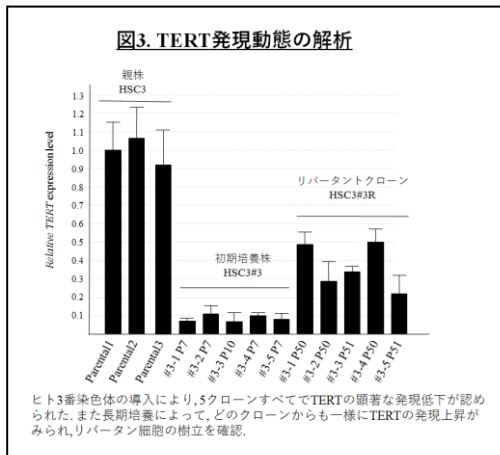
(1) ヒト口腔扁平上皮がん細胞株 HSC3 への正常ヒト3番染色体の導入

RNA-seq における実験の再現性を確保するために、HSC3 へヒト3番染色体を導入した HSC3#3 細胞株を5クローン樹立し、TERTの抑制効果を検討した。その結果、5クローンすべてにおいてFISH解析(図2)によるヒト3番染色体の導入とqRT-PCR解析によるTERTの抑制効果を確認した(図3)。



(2) リバータント細胞の樹立

親株であるHSC3とHSC3#3細胞での遺伝子比較では、導入したヒト3番染色体上のすべての遺伝子がTERT抑制遺伝子としての候補となってしまうため、より候補遺伝子を絞り込むために、リバータント細胞の樹立を行った。リバータントとは1度失ったがん形質が長期的な培養等によって、再びその形質が現れることを言い、本実験ではTERTの再発現を意味する。樹立したHSC3#3細胞を50PDL (population doubling level) 以上培養後に、qRT-PCRによってTERTのmRNAレベルを解析した結果、初期培養株に比べて長期培養株ではTERTの発現上昇が認められ、リバータント細胞(HSC3#3R)の出現を確認した(図3)。

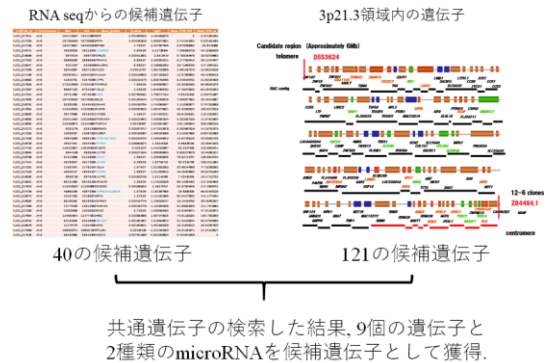


(3) RNA-seq 法による TERT 抑制遺伝子の同定

①親株のHSC3を3クローン、②TERTが抑制された初期培養のHSC3#3を5クローン、③長期培養によりTERTが再発現したHSC3#3R

を5クローン用意し、RNA-seqにより各クローンについて網羅的に発現遺伝子をプロファイリング、3番染色体上にコードされた遺伝子でかつ、TERTと逆の相関性を示す遺伝子がTERT抑制遺伝子としての可能性が高いと考え、TERTの発現が高い親株のHSC3およびリバータントのHSC3Rでは発現が低、HSC3#3で発現が高い遺伝子を解析した。その結果、40個の候補遺伝子を獲得した。さらに、過去の実験から3p21.3領域内にTERT抑制遺伝子の存在が示唆されていたことから、今回得られた40個の中から、3p21.3領域内にコードされている遺伝子に着目した結果、興味あることに、9種類のタンパクをコードする遺伝子と2種類のmicroRNAが3p21.3領域にコードされていることを明らかにした(図4)。

図4. TERT抑制候補遺伝子の決定



現在、候補遺伝子の発現動態解析を行っており、特に親株とリバータントで発現が低い遺伝子のスクリーニングを行っている。また、候補遺伝子のノックダウン(KD)実験を実施予定であり、HSC3#3細胞を用いてsiRNAで、9個の遺伝子全てについてKDを行い、TERT発現動態に与える影響を解析から、TERT抑制に関わる新規のテロメラーゼ制御機構の解明に繋げていきたいと考えている。

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1件)

著者: S. Nishio, T. Ohira, N. Sunamura, M. Oshimura, K. Ryoke, H. Kugoh.

題名: Repression of hTERT transcription by the introduction of chromosome 3 into human oral squamous cell carcinoma.

掲載雑誌: Biochemical and Biophysical Research Communication

巻号: 466 ページ: 755-759

発行年: 2015

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.119.

査読あり

〔学会発表〕（計 2 件）

1) 著者： **S. Nishio**, T. Ohira, K. Kasuga, M. Oshimura, K. Kidani, H. Kugoh
題名：染色体工学技術を用いた口腔癌細胞における TERT 発現抑制因子の探索
学会名：第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 場所：福岡国際会議場（福岡県福岡市）
月・年：1 月 2017 年 （ポスター発表）

1) 著者： **S. Nishio**, T. Ohira, N. Sunamura, M. Oshimura, K. Ryoke, H. Kugoh
題名：ヒト口腔がん細胞株（HSC3）への正常 3 番染色体導入による TERT 発現抑制
学会名：第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会 場所：名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
月・年：9 月 2015 年 （ポスター発表）

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
鳥取大学医学部口腔顎顔面病態外科学 HP
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/oralsurg/>

鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子工学部門 HP
<https://saiboukougaku.jimdo.c>

鳥取大学染色体工学センターHP
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 西尾 幸与 (Sachiyo Nishio)
鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員
研究者番号：80726737

研究協力者

久郷 裕之 (Hiroyuki Kugoh)
大平 崇人 (Takahito Ohira)