

令和元年5月31日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11241

研究課題名(和文) ヒト乳頭腫ウイルス陽性中咽頭癌における高放射線感受性機構の解明

研究課題名(英文) Explaining the mechanism of high sensitivity for radiotherapy in human papilloma related oropharyngeal cancer.

研究代表者

西村 剛志 (Nishimura, Goshi)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：30381510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HPV関連頭頸部癌の大部分がHPV16型によること、HPV16型感染ではp16タンパクが高発現となることからp16、cyclin D1発現を変化させる前段階としてHPVゲノムの組み込みによる部位および組み込みに伴うDNAメチル化の変化の解析した。組み込みは主に遺伝子間領域に生じ、個々のリード毎のヒトゲノムとHPVゲノムには有意な相関関係を認めた。隣接したヒトゲノムのメチル化レベルが高い部位に組み込まれたHPVゲノムは高度にメチル化され、ヒトゲノムのメチル化レベルが低い場所ではHPVゲノムのメチル化レベルも低い傾向が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV陽性中咽頭癌は飲酒・喫煙歴のない若年者層で増加傾向にある一方、放射線治療への反応は良好である。放射線への感受性が良好な機序を解明することで治療後の長期に亘る晩期有害事象を軽減できる可能性が期待される。ヒトゲノムと取り込まれたHPVゲノムのメチル化の程度に関する傾向が示されたことで、今後は遺伝子発現やシグナル伝達との関連性の解明につなげたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Most of the HPV-related head and neck cancer patients are infected by HPV 16. According to HPV 16 infection produces p16 protein, we analyzed the installed location and the alteration of methylation prior to p16 and cyclin D1 proteins production. Integration loci were located predominantly in the intergenic region, with a significant enrichment of the microhomologous sequences between the human and HPV 16 genomes at the integration breakpoints. The HPV 16 integrants remained hypomethylated when the flanking host genome was hypomethylated. After integration into highly methylated human genome regions, however, the HPV 16 DNA became methylated.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：中咽頭癌 ヒト乳頭腫ウイルス 放射線感受性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

禁酒・禁煙の普及により頭頸部癌の発症率が低下しているなかで、中咽頭癌の発症率は増加傾向にあり、これはヒト乳頭腫ウイルス(Human papilloma virus: HPV)陽性中咽頭癌の増加による(Moor KA, et al. JABFM 2015)。HPV 陽性中咽頭癌は放射線感受性が良く、予後が良好な特徴があるがその詳細な機序は不明である。HPV 陽性中咽頭癌では p16 の過剰発現が予後良好因子として、また HPV 陰性中咽頭癌では cyclin D1 の発現が予後不良因子として指標となる。いずれも細胞周期の制御に関連するタンパクであり他癌腫でも同様に報告される(Peurala E, et al. Breast Cancer Res 2013)。研究代表者および分担者らも下咽頭癌の予後不良因子として cyclin D1 発現が関与すること(Nishimura G, et al. J Laryngol Otol 1998)や頭頸部癌細胞で cyclin D1 発現を抑制すると増殖能とコロニー形成能が低下すること(Sakashita T, et al. Acta Otolaryngol 2013)を報告しているが、p16 発現と cyclin D1 発現の直接的な関連性は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は HPV 陽性中咽頭癌の放射線への感受性が高いことの機序を解明するため、細胞周期に関連する 2 つのタンパク、p16 と cyclin D1 に注目し、その発現を解析することである。

3. 研究の方法

1) p16 mRNA をターゲットとした sgRNA による TRUE gene silencing 法が頭頸部癌細胞で機能するかを分子生物学的手法(*in vitro* RNA cleavage assay)により検証

cyclin D1 については TRUE gene silencing 法によるヒト細胞内での発現抑制を確認しているため、p16 mRNA をターゲットとした sgRNA による TRUE gene silencing 法が頭頸部癌細胞で機能するかを分子生物学的手法(*in vitro* RNA cleavage assay)により検証する。

MicroRNA の一種、miR-24-2 が p16 タンパクの発現を減少させることがすでに報告されている(Giglio S, et al. J Cell Physiol 2013)。この miR-24-2 と p16 mRNA の相補的配列をもつ sgRNA を数種類デザインし、化学合成する。これらの候補 RNA に対してそれぞれ対照実験用のコントロール RNA を合成する。また、Fluorescein でラベルされた p16 mRNA 内の標的 RNA をデザインし、合成する。

頭頸部癌細胞から tRNase ZL を含有していると考えられる cell lysate を抽出し、sgRNA と標的 Fluorescein ラベル標的 RNA を混合して *in vitro* RNA cleavage assay を行う。

以上で TRUE gene silencing 法が機能することが確認されない場合には研究分担者の助言を得て標的配列や実験条件の見直しを行う。なお、どうしても機能させられない場合には、siRNA による発現抑制を代用する。始めから siRNA を用いないのは、臨床応用の可能性が低くなってしまうためである。

2) p16 を標的とした sgRNA の導入により p16 タンパク量が減少するかを免疫ブロット法により検討する。

1)の in vitro RNA cleavage assay において機能することが確認された sgRNA を、p16 が高発現している HPV 陽性中咽頭癌細胞株に導入し、p16 発現の抑制効果を免疫プロット法で確認する。

3) sgRNA の導入により p16、cyclin D1 発現を減少させることで各々のタンパク発現が相反的に増加するかを免疫プロット法により検討する。

sgRNA の導入により p16、cyclin D1 発現を減少させることで各々のタンパク発現が相反的に増加するかを免疫プロット法により検討する。

2)で p16 の発現抑制が確認された sgRNA、および研究分担者が cyclin D1 の発現抑制効果を確認した sgHT5(Iizuka S, et al. PLoS One 2014)を p16 高発現 HPV 陽性中咽頭癌細胞株、cyclin D1 高発現 HPV 陰性中咽頭癌細胞株に導入し、それぞれの発現の変化を比較検討する。

4) p16、cyclin D1 タンパク発現が変化することで細胞の放射線感受性に変化をもたらすかを clonogenic survival assay 法を用いて検討する。

i) p16 高発現 HPV 陽性中咽頭癌細胞株

ii) 3)で sgRNA により p16 発現抑制が確認された HPV 陽性中咽頭癌細胞株

iii) cyclin D1 高発現 HPV 陰性中咽頭癌細胞株

iv) 3)で sgRNA により cyclin D1 発現抑制が確認された HPV 陰性中咽頭癌細胞株

v) cyclin D1 高発現 HPV 陰性中咽頭癌細胞株に p16 を強制発現させた細胞株

で放射線感受性の変化の有無を確認する。

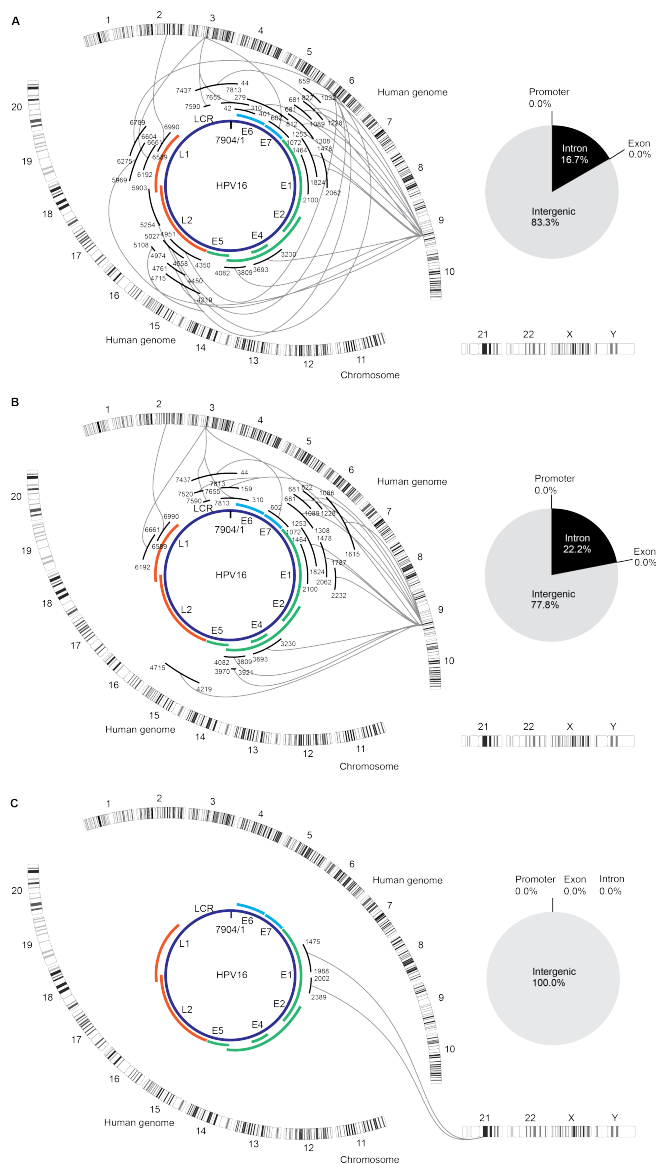
p16 の強制発現は既存の p16 発現アデノウイルスベクター - (Ad5CMV-p16)を用いて細胞株に p16 遺伝子を導入することによる。放射線感受性は clonogenic survival assay 法を用い、感受性に変化が確認された場合は細胞増殖能の変化、細胞周期解析、アポトーシス解析などをフローサイトメトリーにより追加検討する。

以上により p16 が cyclin D1/CDK4/6 複合体形成を抑制することで、放射線により断裂された癌細胞の DNA 修復を阻害し感受性が向上する機序が説明可能と考えられる。

4 . 研究成果

本研究では頭頸部癌細胞における p16、cyclin D1 発現を変化させ、両者の発現量の関係から相互作用の有無を確認することを基本とする。HPV 関連悪性腫瘍として研究が盛んな子宮頸癌においては癌化の過程でヒトゲノムおよび HPV ゲノムにおけるエピゲノム変化が複数報告されているが、頭頸部癌 では HPV ゲノムの DNA メチル化レベル の変化の役割は不明である。HPV 関連頭頸部癌の大部分が HPV16 型によること、HPV16 型感染では p16 タンパクが高発現となることから p16、cyclin D1 発現を変化させる前段階として HPV ゲノムの組み込みによる部位および組み込みに伴う DNA メチル化の変化の解析を行った。3 種の HPV 関連頭頸部癌細胞株(UPCI:SCC090、UPCI:SCC152、UPCI:SCC154)に対し次世代シーケンサーによる解析に HPV16 の全長をカバーする 120bp の RNA プローブを計 427 個作製しターゲット濃縮手

法を組み合わせることで、HPV16 陽性頭頸部癌細胞株において効率的に組み込み部位の同定を行った。続いて、組み込まれた HPV ゲノム及びその近傍のヒトゲノムの DNA メチル化レベルの変化についてバイサルファイトパイロシーケンス法を用いて解析し、組み込まれた HPV ゲノムのメチル化パターンを同定した。次世代シーケンサーによる解析結果の平均リード長は 418.18bp、平均リード精度は 31.30 (>99.9%の精度)であった。UPCI:SCC090 では染色体 2q23,3p12,6p21,9q22 (図 A) に、UPCI:SCC152 では染色体 2q23,3p12,9q22,9q31 (図 B) に、UPCI:SCC154 では染色体 21q21 (図 C) にそれぞれ組み込みを認めた。今回解析した細胞株では組み込みは主に遺伝子間領域(intergenic regions)に生じており、エクソン領域やプロモーター領域への組み込みは存在していなかった。続いて組み込まれた HPV ゲノムと隣接したヒトゲノムのエピゲノム変化をバイサルファイトパイロシーケンスにより測定した。その結果、個々のリード毎のヒトゲノムと HPV ゲノムには有意な相関関係を認めた。続いて組み込まれた HPV ゲノムのメチル化レベルと隣接したヒトゲノムのメチル化レベルの関係をアレル特異的メチル化解析により検証した。組み込まれた HPV ゲノムおよび隣接部位のヒトゲノムのメチル化レベルをより詳細に解析した結果、隣接したヒトゲノムのメチル化レベルが高い部位に組み込まれた HPV ゲノムは高度にメチル化されており、その反対に隣接したヒトゲノムのメチル化レベルが低い場所では組み込まれた HPV ゲノムのメチル化レベルも低い傾向を示していた。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Hatano T, Sano D, Takahashi H, Hyakusoku H, Isono Y, Shimada S, Sawakuma K, Takada K, oikawa R, Watanabe Y, Yamamoto H, Itoh F, Oridate N: Identification of human papillomavirus (HPV) 16 DNA integration and the ensuring patterns of methylation in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma cell lines. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, 2016. 10.

波多野 孝, 佐野大佑, 高橋秀聡, 百束 紘, 磯野泰大, 島田翔子, 澤熊香衣, 高田顕太郎, 折館伸彦: HPV 関連頭頸部扁平上皮癌細胞株における HPV16 型 DNA の取り込みとそれに伴う DNA メチル化の検討. 第 41 回日本頭頸部癌学会, 京都, 2017, 6.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐野 大佑

ローマ字氏名：Daisuke Sano

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 10620990

研究分担者氏名：高橋 秀聡

ローマ字氏名：Hideaki Takahashi

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：客員研究員

研究者番号 (8 桁): 50727196

研究分担者氏名：折館 伸彦

ローマ字氏名：Nobuhiko Oridate

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 90312355

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。