

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20567

研究課題名(和文) DNA脱メチル化を指標とした口腔がん新規エピゲノム治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel epigenome therapy for oral cancer based on DNA demethylation

研究代表者

市村 典久 (ICHIMURA, NORIHISA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90770280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：2011年に発表された全エキソーム解析から、口腔がんでは予想を超えたゲノム・エピゲノム異常の集積が明らかとなった。Ten-eleven translocation 1 (TET1)はDNAの脱メチル化を介してがん化に関与するエピゲノム関連遺伝子として近年注目されているが、口腔がんにおいては未だTET1の報告はなく、その機能は未知である。本研究では口腔がん細胞株および公共データベースを利用した詳細な遺伝子解析を行い、TET1が口腔がんにおいてoncogeneとしての機能を有することを見出した。今後本研究をさらに発展させることで、TET1が口腔がんの新規治療標的と成り得る可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Whole exome sequencing announced in 2011 revealed accumulation of genetic and epigenetic alterations in oral cancer. Ten-eleven translocation 1 (TET1) has attracted attention in recent years as epigenome related genes involved in tumorigenesis via DNA demethylation, but TET 1 has not been reported yet in oral cancer and its function is unknown. In this study, detailed genetic and epigenetic analysis using oral cancer cell line and public database was carried out, and it was found that TET1 has function as oncogene in oral cancer. By further developing this research in the future, it is expected that TET 1 can be a novel therapeutic target for oral cancer.

研究分野：口腔がん

キーワード：エピジェネティクス DNA脱メチル化 TET1

1. 研究開始当初の背景

がんの発生にはゲノム異常に加えて、DNAメチル化、ヒストン修飾、ヌクレオソーム調整因子、非翻訳 RNA のすべてのエピゲノム機構に制御異常があることが明らかとなった。とりわけ、DNAメチル化(5mC)はがん抑制遺伝子の発現を負に制御する修飾として、がん細胞の増殖や生存に寄与することが分かっている。口腔がんは早期発見により根治を望める一方で、浸潤・転移の比較的早いがんであり、発見時にはすでに頸部リンパ節転移を認めることも多い。転移を認める症例では頸部郭清術を行い、周囲の脂肪組織、神経、筋肉を含めた切除が必要となるが、術後の機能障害の大きさが問題となっている。これらの観点からも、がんの早期発見、新規治療法の開発が喫緊の課題となっている。DNAメチル化はがん化の比較的早期から認める現象として、診断マーカー、治療標的としての可能性が期待されている。

Ten-eleven translocation (TET)ファミリー蛋白(TET1/2/3)はDNAの5メチルシトシン(5mC)を5ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)へ変換するメチルシトシン水酸化酵素として作用する。とりわけTET1はDNAの脱メチル化を介してがん化に関与するエピゲノム関連遺伝子として近年注目されているが、口腔がんにおいては未だTET1の報告はなくその機能は未知である。本研究は口腔がん細胞株および公共データベースを利用し、口腔がんにおけるTET1の機能解明及び治療標的としての可能性につき検討を行った。

2. 研究の目的

我々の最終的な目的は、脱メチル化を介したエピゲノム異常を標的とした新規治療法の開発である。この目的の達成のために、本研究ではまず口腔がんにおけるTET1の機能を解析することからはじめ、治療標的としての可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)6種類の口腔がん細胞株(HSC-2, HCS-3, HSC-4, SAS, Ca9-22, Sa3)を用いTET1の発現をRT-PCR法にて解析し、Bisulfite-pyrosequencing法にてTET1遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化レベルを解析した。

(2)細胞実験の結果を基に、公共データベース(The Cancer Genome Atlas : TCGA)に登録されたRNA-seqのデータを用いて、口腔がん患者の正常組織及びがん組織におけるTET1の発現について解析を行った。またマイクロアレイのデータを組み合わせ、口腔がん患者298例におけるがん組織のTET1メチル化の頻度およびTET1メチル化と発現の関係を解析した。

(3) siRNAにてTET1をknockdownした口腔がん細胞株に対して、5mC量および5hmC量をドットプロット法にて解析した。さらにMTT assayにて細胞増殖能を解析し、細胞増殖関連遺伝子の発現をRT-PCR法にて解析した。またTUNEL染色によりアポトーシス細胞の検出を行った。

(4) TET1の臨床における意義については、TCGAのRNA-seqのデータを用いて、口腔がん患者のがん組織におけるTET1の発現を解析し、患者背景および臨床病期との相関を検討した。

4. 研究成果

(1)6種類の口腔がん細胞株(HSC-2, HCS-3, HSC-4, SAS, Ca9-22, Sa3)のうち、Ca9-22においてTET1の高度な発現低下を認めた。またBisulfite-pyrosequencing法を用いたDNAメチル化解析にて、TET1遺伝子のプロモーター領域に存在するCpG islandのメチル化レベルを解析した結果、TET1の高度な発現低下を認めたCa9-22において、TET1のメチル化レベルが85%と高値を認めた。さらにDNAメチル化酵素阻害剤で処理した結果、Ca9-22のTET1発現レベルは未処理の細胞と比較して25倍程度上昇したことから、Ca9-22ではTET1はDNAメチル化の機構により高度な発現抑制を受けていることが明らかとなった。しかしこの現象を認めたのはCa9-22のみであり、他の5種類の細胞においてはTET1は一定値以上の発現を認め、DNAメチル化レベルもすべての細胞で10%以下であった(図1)。

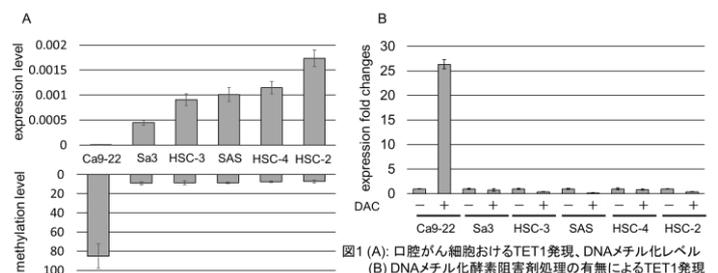


図1 (A): 口腔がん細胞におけるTET1発現、DNAメチル化レベル (B) DNAメチル化酵素阻害剤処理の有無によるTET1発現

(2) 細胞株の結果をもとに、TET1 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化レベルを TCGA に登録された 298 例の口腔がん患者を対象に解析した結果、TET1 の高メチル化を認める症例は 1.7% (5/298 例) のみであり、この 5 例ではメチル化レベルの低い他の症例と比較して有意に TET1 発現レベルが低値であった (図 2)。この結果および(1)の結果から、口腔がんでは TET1 は DNA メチル化により遺伝子発現抑制の影響を受ける症例は極めて少ないということが明らかとなった。

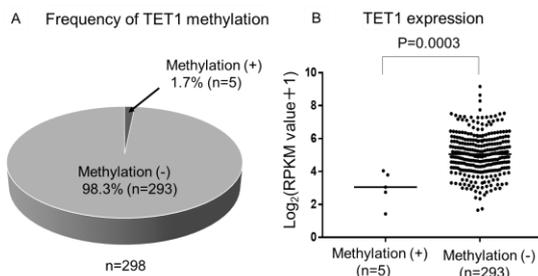


図2: 口腔がん組織におけるTET1メチル化の頻度(A)と発現(B)の関係

(3) SAS, HSC-4 細胞を対象として siRNA にて TET 1 を knock down したところ、癌細胞内の 5hmC 量の減少を認めた。また WST-8 assay にて細胞増殖能を解析したところ、control 群と比較し細胞増殖能の有意な減少を認めた (図 3)。さらに PCNA や TOPII α 等の細胞増殖関連遺伝子の発現の低下を認めた。

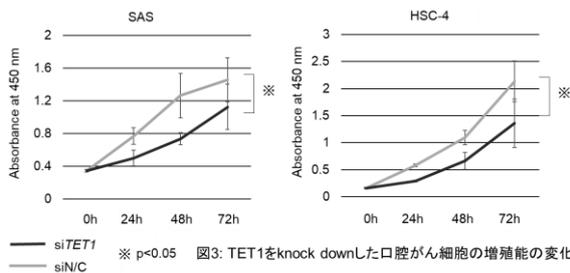


図3: TET1をknock downした口腔がん細胞の増殖能の変化

(4) TCGA の RNA-seq および臨床データより TET1 の発現と臨床病期の関連を検証したところ、TET1 の高発現を認めた症例では、有意に原発腫瘍の広がりが大きかった (図 4)。

| Characteristic | Total n=298 | TET1 high n=149 | TET1 low n=149 | P-value | Characteristic | Total n=298 | TET1 high n=149 | TET1 low n=149 | P-value |
|------------------|-------------|-----------------|----------------|---------|----------------|-------------|-----------------|----------------|---------|
| Age(yr) | | | | | T | | | | |
| Average | 61.6 | 62.6 | 60.6 | 0.21 | T1/2 | 116 | 49 | 67 | 0.0432 |
| Range | 19-90 | 19-90 | 24-87 | | T3/4 | 182 | 100 | 82 | |
| Gender | | | | | N ※ | | | | |
| Male | 200 | 104 | 96 | 0.388 | N0 | 162 | 82 | 80 | 0.9 |
| Female | 98 | 45 | 53 | | N1/2/3 | 132 | 65 | 67 | |
| Smoking ※ | | | | | M ※ | | | | |
| Yes | 208 | 109 | 99 | 0.2976 | M0 | 292 | 147 | 145 | 1 |
| No | 82 | 37 | 45 | | M1 | 0 | 0 | 0 | |
| Alcohol ※ | | | | | Stage | | | | |
| Yes | 194 | 100 | 94 | 0.4591 | I / II | 88 | 38 | 50 | 0.1623 |
| No | 99 | 46 | 53 | | III/IV | 210 | 111 | 99 | |

図4: TET1発現と口腔がん患者の臨床病期との関連

本研究結果より口腔がんにおいて TET1 は oncogene としての機能を有することが示唆された。今後さらに解析を進め、TET1 のターゲット遺伝子の同定やマウスモデルを用いた抗腫瘍効果の検討を通し、口腔がん新規治療標的の開発を進めていく必要がある。

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 4 件)

① Ichimura N, Yamamoto N, Nishikawa M, Furue H, Kondo Y, Hibi H. Notch3 is frequently downregulated in oral cancer. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology*, 29 (6): 504-510. 2017. 査読有.

② Dohi N, Shinjo K, Hatanaka A, Ichimura N, Katsushima K, Shimizu Y, Yutaka K. Aberrant activation pathway for EZH2 by IKK- ϵ -NF- κ B in colorectal cancer. *Nagoya Medical Journal*, 55 (3): 91-103. 2017. 査読有.

③ 市村典久, 山本憲幸, 西川雅也, 松下嘉泰, 山田博久, 日比英晴. HPV 感染陰茎癌を併発した下顎歯肉癌の 1 例. *Hospital Dentistry & Oral-Maxillofacial Surgery*, 28: 125-128. 2016. 査読有.

④ Katsushima K, Natsume A, Ohka F, Shinjo K, Hatanaka A, Ichimura N, Sato S, Takahashi S, Kimura H, Totoki Y, Shibata T, Naito M, Kim JH, Miyata K, Kataoka K, Kondo Y. Targeting the Notch-Regulated Non-coding RNA, TUG1, as an Effective Treatment in Glioma. *Nature Communications*, 7: 13616. 2016. 査読有.

[学会発表] (計 12 件)

① 市村典久, 山本憲幸, 西川雅也, 山口聡, 加納史也, 中道瑛司, 山田博久, 日比英晴. 脱メチル化関連遺伝子 TET1 に着目した口腔癌新規治療標的の検討. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 京都. 2017.

② 加納史也, 山本朗仁, 石川純, 市村典久, 日比英晴. MCP-1 と sSiglec-9 はマクロファージの極性変化を介して骨再生を促進する. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 京都. 2017.

③ 山本憲幸, 山口聡, 伊藤善之, 西川雅也, 市村典久, 加納史也, 日比英晴. 半導体レーザーを用いた扁平上皮癌の治療効果についての検討. 日本ハイパーサーミア学会 第 34 回大会. 京都. 2017.

- ④山口聡, 山本憲幸, 伊藤善之, 西川雅也, 市村典久, 加納史也, 日比英晴. 半導体レーザーを用いた扁平上皮癌の治療効果についての検討. 第 31 回東海ハイパーサーミア研究会. 名古屋. 2017.
- ⑤ Norihisa Ichimura, Noriyuki Yamamoto, Masaya Nishikawa, Hiroki Sakakura, Satoshi Yamaguchi and Hideharu Hibi. Notch Families are Frequently Dysregulated in Oral Cancer. 4th Annual World Congress of Oral & Dental Medicine-2017. シンガポール. 2017.
- ⑥市村典久, 山本憲幸, 西川雅也, 松下嘉泰, 山口聡, 中道瑛司, 山田博久, 日比英晴. HPV 感染陰茎癌を併発した下顎歯肉癌の 1 例. 第 71 回日本口腔科学会学術集会. 松山. 2017.
- ⑦ Norihisa Ichimura, Noriyuki Yamamoto, Masaya Nishikawa, Hiroki Furue, Yutaka Kondo, Hideharu Hibi. Notch3 is frequently downregulated in oral cancer. 23rd International Conference on Oral & Maxillofacial Surgery. 香港. 2017.
- ⑧市村典久, 山本憲幸, 西川雅也, 松下嘉泰, 山口聡, 日比英晴. 顎下腺に発生したびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫を含む MALT リンパ腫の 1 例. 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会. 福岡. 2017.
- ⑨松下嘉泰, 山本憲幸, 西川雅也, 市村典久, 渡邊純奈, 土屋周平, 日比英晴. 菌性感染に起因した深頸部膿瘍, 降下性壊死性縦隔炎の 1 例. 第 61 回日本口腔外科学会・学術大会. 千葉. 2016.
- ⑩加納史也, 山本朗仁, 石川純, 市村典久, 日比英晴. M2 マクロファージの Schwann 細胞に対する影響と神経再生療法の開発. 第 37 回日本炎症・再生医学会. 京都. 2016
- ⑪市村典久, 山本憲幸, 古江浩樹, 若山博隆, 山口聡, 石川純, 西川雅也, 日比英晴. エピゲノムに着目した口腔がんにおける Notch3 遺伝子解析. 第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会. 横浜. 2016.
- ⑫山口聡, 山本憲幸, 西川雅也, 市村典久, 玉利正之, 若山博隆, 石川純, 古江浩樹, 日比英晴. Stage I, II 口腔扁平上皮癌症例の臨床的検討. 第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会. 横浜. 2016.
- ⑬山本憲幸, 西川雅也, 市村典久, 山口聡, 若山博隆, 石川純, 古江浩樹, 日比英晴. ニ

ボルマブが有効であった口蓋悪性黒色腫頸部再発の一例. 第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会. 横浜. 2016.

- ⑭西川雅也, 山本憲幸, 山口聡, 市村典久, 石川純, 若山博隆, 古江浩樹, 日比英晴. 遠隔転移による口腔扁平上皮癌非制御例の検討. 第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会. 横浜. 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市村 典久 (ICHIMURA Norihisa)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 90770280