

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11403

研究課題名(和文) 脱リン酸化機構を応用した頭頸部癌に対する新規遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel gene therapy for head and neck cancer applying demethylation mechanism

研究代表者

金澤 丈治 (Kanazawa, Takeharu)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20336374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌(NHSCC)：細胞株でTET familyの有意なメチル化が認められた。更に、そのメチル化はNHSCC患者の生存率期間を有意に抑制した。また、TET familyとの関連が強いGALRの機能を再確認しGALR導入細胞株のTET familyのメチル化を確認できた。唾液腺導管癌(SDC)：SDCのGALR1とGALR2のメチル化率は、正常組織に比べ有意に増加し生存率の低下と有意に相関した。また、TET2、TET2のDNAメチル化は正常組織と比べ有意に高かった。外部データベースの検討：TCGCのデータではGAL/GALR2の高メチル化でNHSCCの生存期間は有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌治療では新たな治療法の開発が望まれている。DNAメチル化は、エピジェネティクスとして知られる普遍的な遺伝子制御機構の1つであり、癌抑制遺伝子はDNAメチル化によりその機能を抑制されている。TET familyは、DNA脱メチル化を促進する因子でありTET2 family と関連する癌抑制遺伝子のDNAメチル化が今後の頭頸部癌診療において重要な意味を持つことが予想される。このため、頭頸部癌でのこれらのDNAメチル化およびDNA脱メチル化機構を解明することは新規遺伝子治療薬の開発を促進および既知の頭頸部癌化学療法の進歩に大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Head and neck squamous cell carcinoma (NHSCC): Significant methylation of the TET family was observed in the cell lines. In addition, its methylation significantly suppressed the survival time in NHSCC patients. We also reconfirmed the function of GALR, which is strongly associated with the TET family, and confirmed the methylation of the TET family in GALR-transduced cell lines. Salivary duct carcinoma (SDC): The methylation rates of GALR1 and GALR2 in SDC were significantly increased compared to normal tissue and significantly correlated with decreased survival. In addition, DNA methylation of TET2 and TET2 was significantly higher than that of normal tissues. Examination of external database: Hypermethylation of GAL / GALR2 significantly suppressed the survival time of NHSCC.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：頭頸部癌 唾液腺導管癌 DNAメチル化 エピジェネティクス 遺伝子導入

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療は、現在、外科的治療を中心に放射線治療・化学療法が行われているが、進行例や再発例も多いため十分な治療効果を挙げるに至ってはいない。このため新たな治療法の開発が望まれている。このような治療法の1つとして分子標的治療薬の開発が著しい。分子標的治療薬は乳癌に対するトラスツズマブや悪性リンパ腫に対するリツキシマブのように著明な効果が認められるものもある一方で、頭頸部癌においては、セツキシマブが保険適応となったものの未だ主要な治療とはなっていない。このように分子標的治療薬が十分な効果を上げにくい理由の1つとして、頭頸部癌の発癌が主に飲酒や喫煙といった外因によるものであり、ゲノムの障害部位が多数に亘ることが挙げられる。これまでの分子標的薬は上皮成長因子受容体を唯一の標的とするものであるが、頭頸部癌治療では、複数の癌シグナルを同時に抑制することが必要である。DNAメチル化は、エピジェネティクスとして知られる普遍的な遺伝子制御機構の1つである。申請者は、これまで頭頸部癌では多くの癌抑制遺伝子がDNAメチル化によりその機能を抑制されていることを報告してきた。この一方で、癌遺伝子はDNAメチル化の影響が少ない。このためゲノムDNAの脱メチル化は強力な癌抑制因子となり得る。Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase (TET) familyは、DNA脱メチル化を促進する因子であり、TET遺伝子の欠損は小児の骨髄腫や成人の白血病患者の予後不良因子であること、前立腺癌のホルモン治療抵抗性はマイクロRNAを介したTET遺伝子の抑制により引き起こされることなど、様々な悪性腫瘍で癌抑制遺伝子として働くことが知られるようになってきた。更に、癌抑制遺伝子の脱メチル化は、放射線や化学療法に対する感受性を上昇させることが知られている。頭頸部癌は時空間的に不均一な細胞集団であり細胞ごとに化学療法感受性が異なる。この化学療法感受性の相違は各細胞のDNAメチル化の程度により生じる。このようにTET2 family および関連する癌抑制遺伝子のDNAメチル化が今後の頭頸部癌診療において重要な意味を持つことが予想されるようになってきた。このため、頭頸部癌でのこれらのDNAメチル化およびDNA脱メチル化機構を解明することは新規遺伝子治療薬の開発を促進および既知の分子標的治療薬や抗癌剤を含めた頭頸部癌化学療法の進歩に大きく寄与するものと考え、これらを背景に今回の研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は、TET2を治療遺伝子とする頭頸部癌への新規遺伝子治療の基礎研究として、頭頸部癌におけるTET2およびそれに関連する癌抑制遺伝子の知識を蓄積することを目的とした。申請者はこれまで、頭頸部癌の癌抑制遺伝子に関する研究から多くの癌抑制遺伝子のDNAメチル化による不活化が頭頸部癌の発癌に関わっていることを確認した。現在の分子標的治療薬であるセツキシマブは、上皮性増殖因子受容体を唯一の標的とする。しかしながら、頭頸部癌は多数の遺伝子変異を伴っており治療のためには複数の癌シグナルを同時に抑制する必要がある。TET2は脱メチル化酵素でありメチル化で不活化した癌抑制遺伝子を同時に複数活性化できるため頭頸部癌には適した治療遺伝子である。TET2遺伝子による遺伝子治療の開発は新たな頭頸部癌治療の進歩に大きく寄与するものと思われる。

## 3. 研究の方法

(1) 頭頸部扁平上皮癌におけるTET family およびGALR familyの意義  
頭頸部癌におけるTET familyとこれに関連する頭頸部扁平上皮癌の癌抑制遺伝子であるGalanin Receptor 1(GALR1)および2(GALR2)のDNAメチル化の頻度と年齢、性別、腫瘍部位、喫

煙習慣，飲酒，腫瘍サイズ，リンパ節の状態，病期分類などの臨床情報との関連を検討するために，手術中に採取した頭頸部扁平上皮癌の組織および正常組織よりゲノム DNA を採取しバイサルファイト処理を行った後，メチル化特異的プライマーを用いた定量的 PCR 法により TET2 遺伝子のプロモーターにおける CpG アイランドのメチル化レベルを決定した．更に，頭頸部扁平上皮癌細胞株および線維芽細胞株より抽出した mRNA の発現量および CpG アイランドのメチル化レベルを決定した．更に，GALR1 や GALR2 は TET family と関連して癌抑制遺伝子としての役割を示すといわれている．今回，頭頸部癌細胞に GALR1 および GALR2 発現プラスミドを遺伝子導入したデータを再検証し情報伝達系や機能を更に明らかにした．

## (2) 唾液腺導管癌

唾液腺導管癌は，扁平上皮癌が大多数を占める頭頸部癌において組織型も多様で特異な地位を占めている．特に，唾液腺導管癌は，非常に悪性度の強い癌であると同時に乳腺癌と類似の組織を示すため細胞生物学的な関心を集めている．今回，Galanin, GALR1 および GALR2 のプロモーターにおける CpG アイランドのメチル化レベルの臨床的意義を検討するために，これまでパラフィン包埋されたがん組織よりゲノム DNA を抽出し，頭頸部扁平上皮癌の場合と同様に，バイサルファイト処理を行った後，メチル化特異的プライマーを用いた定量的 PCR 法により TET2 遺伝子のプロモーターにおける CpG アイランドのメチル化レベルを決定した．また，唾液腺導管癌の予後因子を確認するために症例ごとの性別，年齢，TNM 分類，病期，術式，術後照射の有無および脈管浸潤や節外浸潤などの病理所見を抽出した．更に，臨床病理学的検討として，Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), human epidermal growth factor receptor (HER2), Androgen receptor (AR), Estrogen Receptor (ER), p27, p57 および Cyclin D1 の発現を免疫組織学的に検討し有無と予後との関係を検討した．

## (3) 外部データベースにより検討

The Cancer Genome Atlas (TCGA) で利用可能な頭頸部扁平上皮癌に対する DNA メチル化データベース (<http://methhc.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) を介して症例ごとの  $\beta$  値を得た．

$\beta$  値は，0 (メチル化されていない) から 1 (完全にメチル化されている) までの数値であり，全体的な強度に対するメチル化された対立遺伝子の強度の比率を示している．この  $\beta$  値を基に，TCGA の生存期間を Subio platform (株式会社 Subio, 春日井市) を用いて，GALR1 および GALR2 のメチル化と生存率との関連を検討した．

## 4. 研究成果

### (1) 頭頸部扁平上皮癌における TET family および GALR family の意義

頭頸部扁平上皮癌より樹立した 11 種の細胞株の TET1, TET2, TET3 では TET1 で 10 種，TET2 で 6 種，TET3 では 9 種で有意な DNA メチル化が認められた．頭頸部扁平上皮癌における TET family の DNA メチル化の腫瘍形成のメカニズムと頭頸部扁平上皮癌における疾患再発のリスクに対する意義を確認するために，頭頸部扁平上皮癌の 233 人の患者から得られた腫瘍サンプルで TET1, TET2, TET3 遺伝子のメチル化プロファイルを生成した．これらには，下咽頭癌 57 例，喉頭癌 44 例，口腔癌 69 例および中咽頭癌 63 例の合計 233 例が含まれている．プロモーター領域の DNA メチル化を検討すると TET 遺伝子の mRNA 発現とプロモーター DNA メチル化は，アルコール消費量，高リスクのヒトパピローマウイルス (HPV) 状態および疾患の再発と有意に正の相関を認めた．更に，TET family 遺伝子の同時メチル化は，頭頸部扁平上皮癌の無病生存率の低下と有意に相関した．多変量解析では，T1 および T2 腫瘍ステージ，中咽頭癌および口腔癌患者における TET3 の DNA メチル化は生存率の低下と高い関連性を示した．GALR1 および GALR2 を含む癌抑制遺伝子のメチル化指数の共同分析

は、これらのリスクを更に高めることが明らかになった。TET3 の DNA メチルの頻度は、頭頸部扁平上皮癌の再発率と有意な相関をした。また、TET family との関連が強く示唆されている GALR1 および GALR2 が頭頸部扁平上皮癌に与える影響を明らかにすると GALR1 は細胞周期停止を誘導することにより、GALR2 は細胞周期停止に加えてアポトーシスを誘導することにより頭頸部癌に対する殺細胞効果を示すことが再確認された(図1)。今後は、TET ファミリーとの情報伝達経路の解明を進める予定である。また、GALR1 および GALR2 を遺伝子導入した頭頸部癌細胞の TET family のメチル化率を測定すると TET1 および TET2 ではメチル化率の抑制が認められたが、TET3 では有意な変化は認められなかった(図2)。

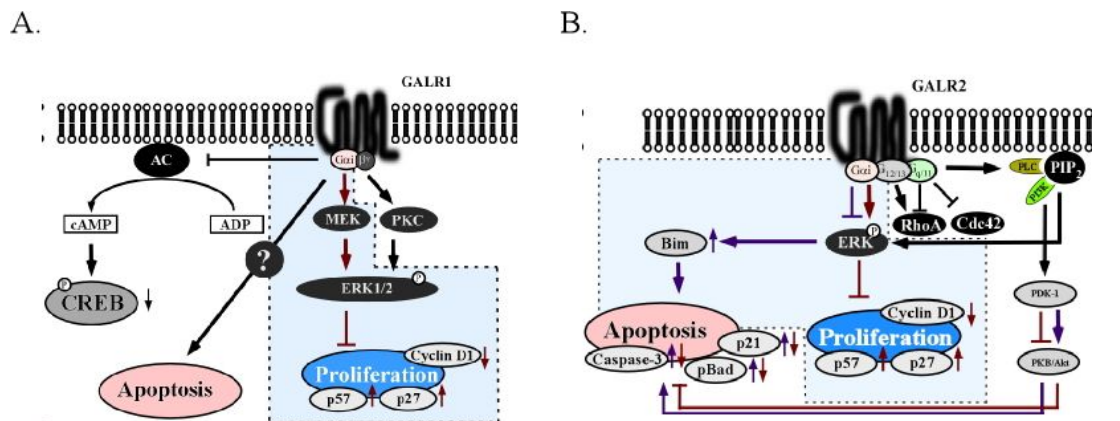


図 1. GALR1(A)および GALR2(B)の情報伝達経路

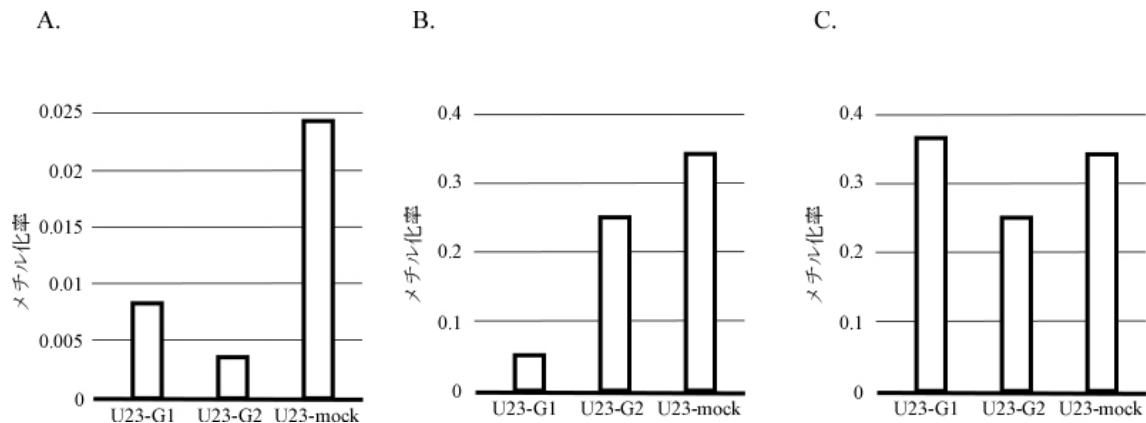


図 2. TET family と GALR family の相互作用 . GALR 導入細胞の TET1 (A), TET2 (B) および TET3 (C) の相対的メチル化率 . U23: 頭頸部扁平上皮癌細胞株

## (2) 唾液腺導管癌

頭頸部扁平上皮癌と並んで唾液腺導管癌 (SDC) は、唾液腺で最も進悪性度の高い癌である。本研究では、SDC 患者の臨床病理学的特徴と、Galanin および GALR 遺伝子のメチル化状態を調査して、この疾患の予後因子としての価値を検討した。その結果、全生存期間の中央値は 37.2 ヶ月であった。T 期, N 期, 病期, 腫瘍サイズ, および術前の顔面神経麻痺は全生存期間と有意に関連していたが、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) の過剰発現は関連していなかった。腫瘍組織における GALR1 および GALR2 のメチル化率は、正常組織と比較して有意に増加し、それぞれ 9.85 倍および 4.49 倍に増加した。p27kip1 および p57kip2 の

発現は，GALR1 および GALR2 のメチル化率と有意に逆相関した．更に，観察された GALR1 および/または GALR2 のメチル化率は，全生存期間の低下と有意に相関した（図 3）．これらの結果は，GALR1 および GALR2 が SDC の潜在的な予後因子および治療標的として役立つ可能性があることを示唆している．また，TET2， TET3 の DNA メチル化に関しても同様に解析すると，正常組織では TET2 および TET3 認められなかったのにも関わらず唾液腺導管癌組織では有意に DNA メチル化が認められた（図 4）．

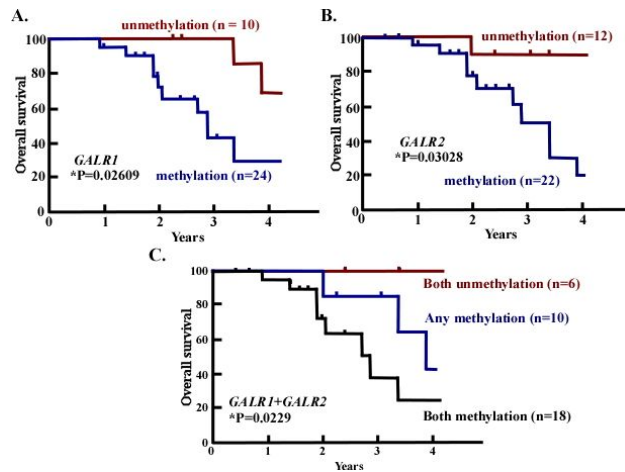


図 3. 唾液腺導管癌での GALR1 および GALR2 のメチル化と生存期間

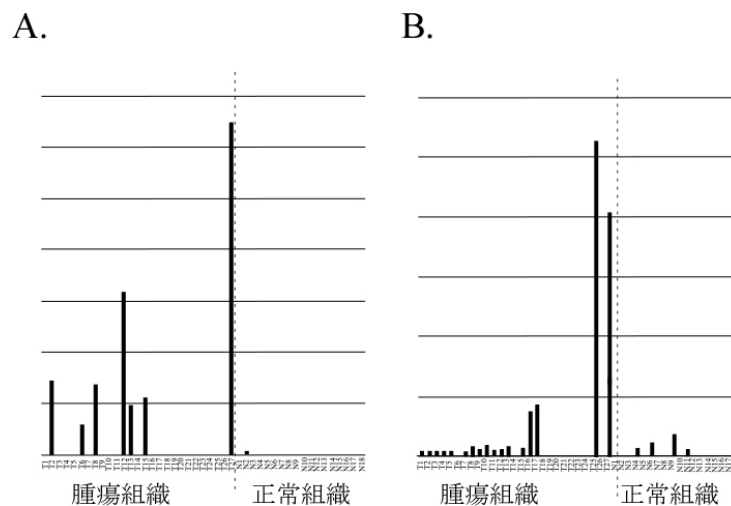


図 4. TET2 (A)と TET3 (B)の正常組織と唾液腺導管癌での相対的メチル化率

### (3) 外部データベースにより検討

GAL および GALR (GALR1, GALR2, および GALR3) のメチル化状態を低メチル化，中程度のメチル化，および高メチル化の 3 つのグループに分類した． GAL プロモーターの低メチル化患者の 50 か月の DFS 率は 50.5%であり，中程度のメチル化 40.2%および高メチル化，40.0%．高メチル化と低メチル化の患者は，DFS で有意に異なっていた．同様に，GALR2 低メチル化患者の 50 か月の DFS 率は 52.4%であり，中程度のメチル化で 43.2%および高メチル化で 39.8%であった．高メチル化と低メチル化の患者間で有意差が観察された． GALR1 と GALR3 のこれらのグループ間で DFS に有意差は観察されなかった．

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kanazawa Takeharu, Misawa Kiyoshi, Shinmura Kazuya, Misawa Yuki, Kusaka Gen, Maruta Mikiko, Sasaki Toru, Watanabe Yusuke, Carey Thomas E.	4. 巻 19
2. 論文標題 Promoter methylation of galanin receptors as epigenetic biomarkers for head and neck squamous cell carcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Expert Review of Molecular Diagnostics	6. 最初と最後の頁 137 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14737159.2019.1567334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanazawa T, Misawa K, Fukushima H, Misawa Y, Sato Y, Maruta M, Imayoshi S, Kusaka G, Kawabata K, Mineta H, Carey TE, Nishino H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Epigenetic inactivation of galanin receptors in salivary duct carcinoma of the parotid gland: potential utility as biomarkers for prognosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 9043-9050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8525.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kanazawa T, Misawa K, Shinmura K, Misawa Y, Kusaka G, Maruta M, Sasaki T, Watanabe Y, Carey TE	4. 巻 19
2. 論文標題 Promoter methylation of galanin receptors as epigenetic biomarkers for head and neck squamous cell carcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Expert Rev Mol Diagn	6. 最初と最後の頁 137-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14737159.2019.1567334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kanazawa T, Misawa K, Fukushima H, Misawa Y, Sato Y, Maruta M, Imayoshi S, Kusaka G, Kawabata K, Mineta H, Carey TE, Nishino H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Epigenetic inactivation of galanin receptors in salivary duct carcinoma of the parotid gland: potential utility as biomarkers for prognosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 9043-9050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kanazawa T, Kisawa K.
2. 発表標題 DNA methylation in Thyroid Cancer
3. 学会等名 2nd Congress of Asia-Pacific Society of Thyroid Surgery. (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今吉 正一郎  (Imayoshi Shoichiro)  (00570186)	自治医科大学・医学部・助教   (32202)	
研究分担者	水上 浩明  (Hiroaki Mizukami)  (20311938)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	
研究分担者	草鹿 元  (Gen Kusaka)  (00265258)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------