

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17274

研究課題名(和文) 口腔癌の細胞外環境応答性エピゲノム解析に基づく新規診断法とエピゲノム治療法の創出

研究課題名(英文) Creation of new diagnostic methods and epigenome therapy for oral cancer based on extracellular environment responsive epigenome analysis

研究代表者

中元 雅史(Nakamoto, Masafumi)

熊本大学・医学部附属病院・診療助手

研究者番号：90779175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：様々な癌腫でANGPTL4の高発現は予後不良因子として知られている。口腔癌においても、その高発現は予後との相関性が報告されているが、低酸素環境下でのANGPTL4の発現制御の機構については明らかではない。低酸素環境下で培養した口腔癌細胞株を用いて実験を行い、ANGPTL4の発現上昇を確認した。ANGPTL4遺伝子座における低酸素誘導因子であるHIF-1の結合を確認した。同部位では転写活性化のマークであるH3K27Ac(ヒストンH3リジン27のアセチル化)の結合上昇を確認した。ANGPTL4の遺伝子発現制御に、HIF-1がエピジェネティックな機序を介して関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同じ転写のアウトプットでも、そのアウトプットにまで至る過程は一つではなく、転写因子の結合や高次クロマチン構造の状態によって様々である。ANGPTL4は脂質代謝やインスリン抵抗性といった生物の恒常性維持の観点からも重要な因子であるため、治療標的として考えた際に単純にANGPTL4の発現を低下させてやれば良いわけではない。悪性基質を獲得した癌細胞特異的に起こっているANGPTL4遺伝子のエピゲノムを介した転写制御のメカニズムを解明することで、より特異性のある治療標的としての因子を抽出することができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：High expression of ANGPTL4 is known as a poor prognostic factor in various carcinomas. Also in oral cancer, its high expression has been reported to have a correlation with poor prognosis, but the mechanism of regulation of ANGPTL4 expression in a hypoxic environment is unclear. I performed the experiment using an oral cancer cell line cultured in a hypoxic environment to confirm the increase in the expression of ANGPTL4. I confirmed the HIF-1 binding site at the ANGPTL4 gene locus. At the same site, increased binding of H3K27Ac (acetylation of histone H3 lysine 27), a mark of transcriptional activation, was confirmed. It is suggested HIF-1 is involved in the gene expression regulation of ANGPTL4 via an epigenetic mechanism.

研究分野：外科系歯学

キーワード：ANGPTL4 エピジェネティクス HIF-1

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

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部癌の約 60% を占める疾患であり、その 90% 以上を口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma: OSCC) が占めている。近年、頭頸部癌の診断法の向上および治療法の選択肢が広がっているにも関わらず、治療成績に劇的な向上は見られない (Forastiere et al. *New Engl. J. Med.* 2003)。その原因のひとつとして、高転移性の癌の存在が挙げられる。所属リンパ節および遠隔組織への転移の有無は、予後規定因子として重要であり、転移リスクを評価、制御し得る新たな診断法および治療法が期待される。その診断法のひとつとしてのエピジェネティクス異常の検出は新たな診断マーカーとして期待されている (Laird et al. *Nat. Rev. Cancer* 2003)。

DNA のメチル化やヒストン修飾といった修飾をうけたゲノムはエピゲノムと称され (Wolffe et al. *Science* 1999)、同じゲノム情報であるにも関わらずエピゲノムが異なると、そのアウトプットである転写に劇的な変化を生み出している。癌の進行、転移に関しては、転写レベルでの制御が必要不可欠であるが、DNA のメチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな制御因子の変化が転移に関連する転写ネットワークに影響を与えている可能性が示唆されている (Brian Ell and Yibin Kang, *Trends in Cell Biol* 2013)。様々な癌腫において、ANGPTL4 の高発現は癌の進行、浸潤・転移、血管新生への関与が報告されている (Ming Jie Tan, Ziqiang Teo, Ming Keat Sng, *Mol Cancer Res* 2012)。ヒト 19 番染色体上に位置する ANGPTL4 遺伝子座は細胞種にもよるものの、基本的には転写因子が結合しやすいとされる DNase 高感受性部位 (DHS) に富んでいる (図 1)。DHS は細胞種特異的であるが、同じ細胞種でも例えば高転移性の癌細胞とそうでない癌細胞とを比較すると両者で異なっていることが予想される。DHS には転写因子が結合するが、その結合は細胞外の環境応答の結果もたらされ、細胞外環境が核内での転写制御とリンクしていることは癌の転移のメカニズムを考える際に重要であり、低酸素、低栄養環境下では悪性度を高めるような転写ネットワークを形成していると考えられる。ANGPTL4 遺伝子座には、低酸素誘導因子である HIF-1 の結合モチーフが同定されており、これらの細胞外の微小環境から誘導される転写因子の役割は欠かせない。しかしながら、DNA に結合した転写因子が実際に転写に働きかけるためには、転写因子が結合するだけでは不十分で、Enhancer と Promoter の相互作用が必要である。

CCCTC-binding factor (CTCF) は転写調節、および Enhancer と Promoter といった転写制御エレメントが相互作用するための高次クロマチン形成を制御する重要な因子である。この CTCF の結合モチーフが ANGPTL4 遺伝子座には複数個存在しており、その転写制御に何らかの働きを行っている可能性が考えられる。同じ転写のアウトプットでも、そのアウトプットにまで至る過程は一つではなく、転写因子の結合や高次クロマチン構造の状態によって様々である。ANGPTL4 は脂質代謝やインスリン抵抗性といった生物の恒常性維持の観点からも重要な因子であるため、治療標的として考えた際に単純に ANGPTL4 の発現を低下させてやれば良いわけではない。悪性基質を獲得した癌細胞特異的に起こっている ANGPTL4 遺伝子のエピゲノムを介した転写制御のメカニズムを解明することで、より特異性のある治療標的としての可能性を有する因子を抽出することができる。本研究では、OSCC における新たな診断・治療そして個別化治療への応用を目的として ANGPTL4 遺伝子座のエピゲノム特性を解明することを目的とする。

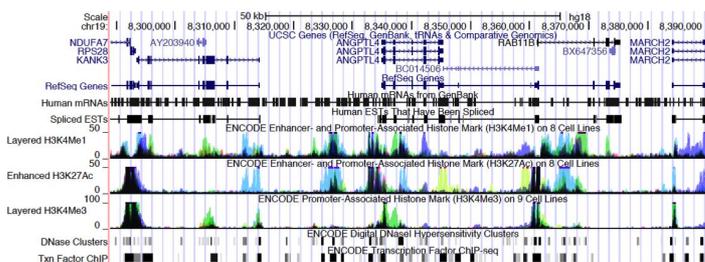


図 1. ANGPTL4 遺伝子座における DHS およびヒストン修飾

(UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu> より)

### 2. 研究の目的

OSCC は口腔癌の 80% を占める疾患である。近年、診断法および治療法の質が向上しているにも関わらず、5 年生存率は過去 30 年間、明らかな改善を認めていない。その原因として、同じ組織の癌であっても全てが同じ挙動を示すわけではなく、個々の癌細胞ごとにその浸潤能や転移能について多様性があることが挙げられる。申請者は、過去にヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞を用いて、癌の浸潤・転移に関与している ANGPTL4 遺伝子座の転写制御のメカニズムに関して様々な転写因子の結合と高次クロマチン構造についてエピジェネティックな観点から研究を行ってきたが、ヒト口腔癌由来細胞株での制御機構に関してはその制御機構は明らかにされていない。そこで、本研究では、OSCC における ANGPTL4 遺伝子座のエピゲノム特性を解明することで診断・治療そして個別化治療への応用を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 低酸素環境下培養 OSCC 細胞株における *ANGPTL4* 遺伝子の発現機構の解明

##### 低酸素環境培養下 OSCC 細胞株 における *ANGPTL4* 遺伝子座での HIF-1 結合部位の同定

数種類の OSCC 細胞株 (Ca9-22, SAS) を用いて *ANGPTL4* 遺伝子座における HIF-1 と CTCF のそれぞれの結合モチーフをもとに、クロマチン免疫沈降-定量的 PCR (ChIP-qPCR) 法にて両者の結合部位を同定し、通常酸素環境下と低酸素環境下それぞれで培養した OSCC 細胞株での HIF-1 と CTCF の結合の変化および関係性について調べる。

#### 低酸素環境下培養 OSCC 細胞株における *ANGPTL4* 遺伝子の発現機構の解明

##### (a) 低酸素環境培養下 OSCC 細胞株における *ANGPTL4* 遺伝子座での HIF-1 結合部位の同定

数種類の OSCC 細胞株 (Ca9-22, SAS) を用いて *ANGPTL4* 遺伝子座における HIF-1 と CTCF のそれぞれの結合モチーフをもとに、クロマチン免疫沈降-定量的 PCR (ChIP-qPCR) 法にて両者の結合部位を同定し、通常酸素環境下と低酸素環境下それぞれで培養した OSCC 細胞株での HIF-1 と CTCF の結合の変化および関係性について調べる。

##### (b) 低酸素環境培養下 OSCC 細胞株における *ANGPTL4* 遺伝子座のヒストン修飾状態の解析

(a) で得られた *ANGPTL4* 遺伝子座における HIF-1 の結合部位でのヒストン修飾状態の変化を ChIP-qPCR 法を用いて解析する。対象とするヒストン修飾は活性化のマークであるヒストン H3 リジン 27 のアセチル化 (H3K27Ac) とする。

### 4. 研究成果

Ca9-22 細胞株、SAS 細胞株を O<sub>2</sub> 1%、CO<sub>2</sub> 5% の低酸素培養環境下で 24 時間培養した。同時に、Ca9-22 細胞株、SAS 細胞株を通常的环境下でも培養を行った。それぞれの mRNA を回収し、cDNA を作製して *ANGPTL4* の発現を Real time PCR にて調べた。Ca9-22 細胞株で *ANGPTL4* 遺伝子の発現の上昇を認めた (図 2)。

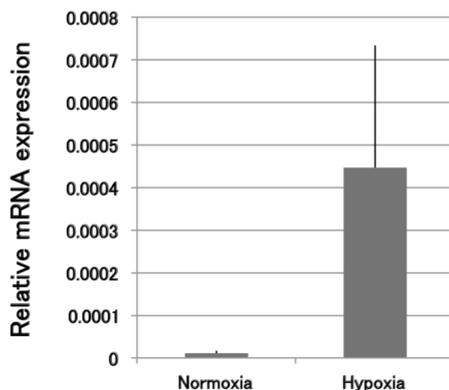


図 2. 低酸素環境下での *ANGPTL4* 遺伝子の発現変化

次に、すでに他の固形癌について ChIP-seq のデータを取得し、HIF-1 の結合領域候補を検索した。すると、*ANGPTL4* 遺伝子の転写開始点の約 2kb 上流に HIF-1 の結合領域を認めた (図 3)。



図 3. 低酸素環境下での *ANGPTL4* 遺伝子の発現変化

過去に同定していた CTCF 結合領域と HIF-1 の結合部位の位置関係を図 4 に示す。

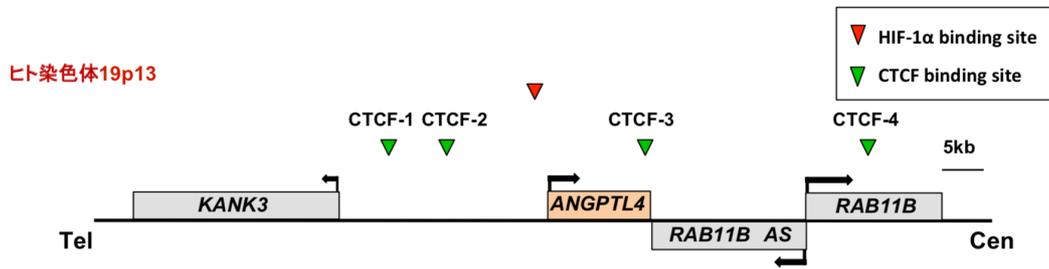


図4. *ANGPTL4* 遺伝子座での HIF-1 と CTCF 結合部位の位置関係

次に、Ca9-22 細胞株を用いて、低酸素環境下で HIF-1 の結合領域での HIF-1 の結合変化について ChIP-qPCR にて調べた。さらに、その時の H3K27Ac の変化についても調べた。低酸素環境下では、確かに HIF-1 の結合を認め、H3K27Ac の上昇を認めた (図5)。

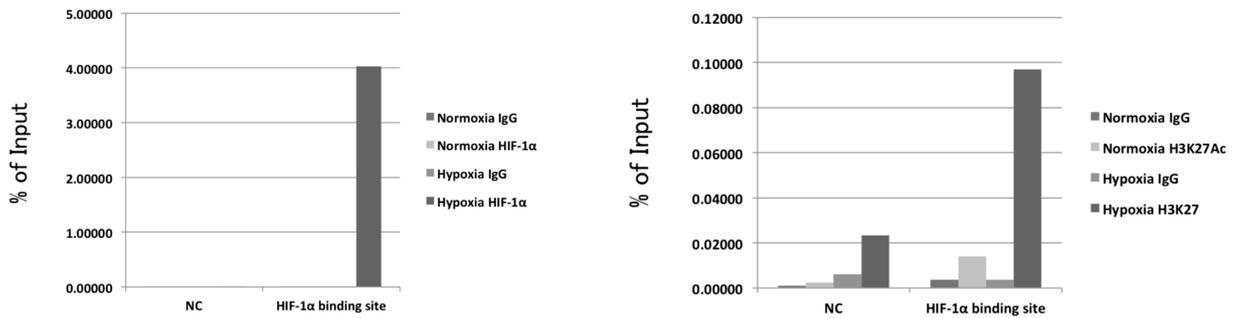


図5. 低酸素環境下における *ANGPTL4* 遺伝子座での HIF-1 と H3K27Ac 結合状態の変化

同様の条件下で、CTCF の結合状態についても ChIP-qPCR にて調べた。大変興味深いことに、低酸素環境下では CTCF 結合の上昇を認めた (図6)。

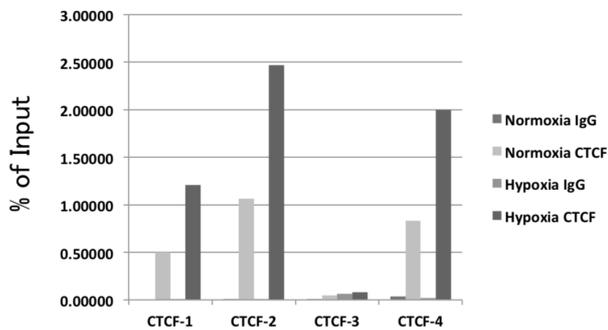


図6. 低酸素環境下における *ANGPTL4* 遺伝子座での CTCF 結合状態の変化

以上の結果から、低酸素環境下で *ANGPTL4* 遺伝子は、その転写開始点から約 2kb 上流に HIF-1 が結合し、H3K27Ac の上昇を伴って転写が活性化していることが示唆された。また、興味深い事に低酸素環境下では CTCF の結合状態にも変化が起きており、この結果は低酸素環境下で *ANGPTL4* 遺伝子座のクロマチン構造が変化している可能性を想起させるものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1件)

2型糖尿病を有する口腔扁平上皮癌患者の臨床統計学的・免疫組織学的検討  
中元雅史、永尾優果、中嶋光、吉田遼司、犬束憲史、廣末晃之、平木昭光、篠原正徳、中山秀樹  
第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2018年11月2-4日 幕張メッセ、千葉、ポスター

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：中山秀樹

ローマ字氏名：Nakayama Hideki

研究協力者氏名：廣末晃之

ローマ字氏名：Hirosue Akiyuki

研究協力者氏名：山本達郎

ローマ字氏名：Yamamoto Tatsurou

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。