

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10146

研究課題名（和文）口腔がん組織において予後マーカーとなりうるPRC2構成蛋白質の機能探索

研究課題名（英文）Functional exploration of PRC2 component proteins as potential prognostic markers in oral cancer

研究代表者

丹下 正一郎（Tange, Shoichiro）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40571211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、遺伝子の転写抑制に寄与するPolycomb蛋白質複合体のうち、酵素活性を持たない蛋白質を対象とした研究である。臨床検体のデータベースであるTCGAの口腔がんの発現情報を解析した結果、本研究対象の遺伝子のうち一つにおいて、高発現群の無再発生存期間は低発現群に対して有意に長いことが示された。口腔がん細胞株において、この遺伝子をノックダウンする実験を行い、トランスクリプトーム情報の解析を行った。この結果、同遺伝子のノックダウンによって、運動能の増加や薬剤抵抗性の獲得などと相関する腫瘍の悪性化の兆候の一つである上皮間葉転換に寄与する遺伝子群の発現レベルが上昇することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子の転写抑制に寄与するPolycomb蛋白質複合体は、発がんや腫瘍の悪性化に寄与するという趣旨の報告が多くなされてきている。しかしながら本研究では、従来の報告とは逆に腫瘍の悪性化を阻害する形での関与を示唆する結果が得られた。この知見は、PRC2阻害薬等、将来的に薬剤を臨床的に導入する際の患者の投与適合性の是非を判断するための指標という形で社会に貢献をしよう可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study targets proteins without enzymatic activity among the Polycomb repressive complex (PRC) that contribute to transcriptional repression of target genes. Analysis of expression information on oral cancer in TCGA, a database of clinical specimens, showed that for one of the genes in this study, the recurrence-free survival of the high-expression group was significantly longer than that of the low-expression group. We performed knockdown experiments of this gene in oral cancer cell lines and analyzed the transcriptome information. The results showed that knockdown of the gene increased the expression level of a group of genes that contribute to epithelial-mesenchymal transition, one of the signs of tumor malignancy, which correlates with increased motility and acquisition of drug resistance.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：口腔がん 腫瘍マーカー ヒストン修飾

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポリコーム複合体(PCR2)は、ヒストンの修飾を介して遺伝子の転写抑制に寄与する。腫瘍においては、PCR2 複合体を構成するヒストンメチル化酵素 EZH2 の過剰発現をはじめとして同蛋白質の腫瘍悪性化へ寄与することが研究されてきていた。一方、研究開始当初までに、PCR2 複合体を形成する非酵素蛋白質をコードする遺伝子(以下、対象遺伝子)の腫瘍における機能を報告したものは申請者の報告を含めても少数であり、申請者の研究テーマには独自性があった。

### 2. 研究の目的

今回の研究の目的を図1 および下記に記す。

(1)腫瘍、とりわけ予後の不良なものにおいて対象遺伝子の発現が亢進するような条件を明らかにする。

(2)腫瘍における対象遺伝子の機能を解析することによって、腫瘍の悪性化過程の未知の調節機構を解明することで、この遺伝子の悪性腫瘍における機能を解明する。

(3)対象遺伝子の発現レベル、および蛋白質レベル等が腫瘍の悪性度マーカーとして有用であるかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1)癌細胞株の悪性化誘導過程における同遺伝子由来の蛋白質の機能の検証: 口腔癌由来の培養細胞株を用いた対象遺伝子の強制発現系、または、ノックダウン細胞の悪性化誘導処理を通じて、対象遺伝子由来の蛋白質の機能の要求性を調べる。また、各実験系において同遺伝子由来の蛋白質の機能によって発現が変動する遺伝子群を次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析によって検出する。質量分析法によって癌細胞内において結合するパートナー分子を検索し、作用機序の解明につなげる(図2)。

(2)ゲノムの変異情報等を統合した対象遺伝子発現誘導機序の解析: TCGA を始めとする公共データベースに収録されている癌患者のゲノム DNA の変異情報やメチローム情報、及び米国国立衛生研究所(NIH)が保有する癌細胞株データベース(CCLE)のゲノム変異情報、RNA-Seq 情報とを統合し、対象遺伝子の発現が亢進している癌患者における発現誘導メカニズム、及び異常を持つ分子機序、未報告の遺伝子変異等の解明を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 臨床の乳癌検体における、発現量と予後の相関性の検討

TCGA に収録されている乳癌患者検体の発現情報、及びおよび米国国立生物工学情報センターに収録されている別の乳癌検体の遺伝子発現量解析データを用いた生存解析の結果、対象遺伝子の発現の高い患者群は、発現の低い群に比べて無再発生存期間が長いというデータが得られた。一方、EZH2 の発現と無再発生存期間には相関が確認されなかった。

#### (2) 乳癌検体の発現データを用いた検討

TCGA に収録されている乳癌検体の RNA-Seq データを元に発現レベルの検証を行った。口腔がん組織では非がん部組織と比較して対象遺伝子の発現量が高いとの結果が得られた。

#### (3) 口腔癌細胞株を用いた転写及び発現状況の検討

口腔癌由来の培養細胞株を用いて同遺伝子の発現量を quantitativePCR 法にて定量した結果、に(2)のデータ解析と同様、口腔がん由来の細胞株において非がん部の口内組織と比べて対象遺伝子の発現量が高いことが示された。

#### (4) 口腔癌細胞株を用いたノックダウン実験による検討

口腔癌由来細胞株 HSC-3 を用いたノックダウン実験によって細胞の増殖能力、および運動能、浸潤能を検討した。いずれにおいても、ノックダウンによってコントロール細胞に比較して有意に変化することが明らかとなった。なお、グローバルなヒストン修飾レベルには変化が認められなかった。

#### (5) ノックダウンによって発現に影響を受ける標的の検証

(4) で樹立したノックダウン細胞株から抽出した RNA を用いて RNA シーケンス (RNA-Seq) を行ってトランスクリプトーム情報を取得し、対象遺伝子をノックダウンした際に発現レベルが変動する遺伝子群を検証した。PCR2 とりわけ EZH2 は腫瘍の悪性化を促進するとの報告が多く、本研究では対象遺伝子のノックダウンによって悪性進展の抑制、および治療への貢献となりうるようなデータが得られることが期待された。しかしながら、対象遺伝子の中には、ノックダウンによってむしろ上皮間葉転換すなわち運動能、浸潤能の上昇関係する遺伝子群の発現のアップレギュレーションが認められるなど、ノックダウンが必ずしも悪性化の抑制には繋がらないというデータが得られた。

また、発現変動が確認された一部の遺伝子については、quantitativePCR 法によって別の口腔がん細胞株 (Ca9-22、HSC-2) でも再現性を確認した。また、ヒストン修飾を伴う PCR2 の直接の標的であるかは、PCR2 によってもたらされるヒストン修飾である H3Lys27me3 を認識する抗体を

用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法と quantitativePCR 法を併用することで確認を行った。

これにより、対象遺伝子のノックダウンによって PRC2 によるヒストンのメチル化修飾レベルが減少し、これによって抑制されていた悪性進展に寄与する一部遺伝子の転写が活性化されることが示唆された。

本研究からは、PRC2 の機能を一律に阻害することは必ずしも腫瘍の抑制には繋がらず、むしろ悪性化の原因ともなりかねないとかんがえられた。このため、PRC2 が標的とする遺伝子の転写制御の状態やヒストン修飾状態など、阻害剤を開発するにあたり個別に検証していくことが必要であることが示唆された。今後の研究方針として、この個別遺伝子のエピジェネティックな修飾状況のモニタリングとより包括的な PRC 標的遺伝子ヒストン修飾マップの構築を推進することで、口腔がんへの治療の一助となるような個別化医療の提案に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tange S, Hirano T, Idogawa M, Hirata E, Imoto I, Tokino T	4. 巻 23
2. 論文標題 MYEOV overexpression induced by demethylation of its promoter contributes to pancreatic cancer progression via activation of the folate cycle/c-Myc/mTORC1 pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-10433-6	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shoichiro Tange, Shoko Goto, Hideki Kawashima, Masashi Idogawa, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino
2. 発表標題 口腔がんにおけるClaudin-1発現抑制分子機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------