

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K18289  
研究課題名(和文) Novel viral noncoding RNAs in head and neck cancers

研究課題名(英文) Novel viral noncoding RNAs in head and neck cancers

## 研究代表者

小杉 隆誠 (Kosugi, Takayoshi)

琉球大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10867047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HPV由来アンチセンスRNAは一部のHPV関連癌において発現していることが少数報告されている。しかしながらこのRNAの詳細な構造および機能については現在まで不明である。そこで本研究はHPV由来アンチセンスRNAの構造的機能的同定を目的として行われた。PCR法およびバイオインフォマティクス解析において決定された構造から、このHPV由来アンチセンスRNAはlncRNAであることが判明した(HPV-AS lncRNAと命名)。培養細胞を用いたRNAノックダウン解析の結果、このHPV-AS lncRNAはある種のHPV関連癌細胞の種々の核内RNA発現の調節に関与することが示唆される。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトパピローマウイルス(HPV)の16型および18型は一部の頭頸部がんや子宮頸がんの主な原因因子となっている。これらHPVの有するE6およびE7はがん誘導因子であることから、E6/E7はHPV関連がんの予防及び治療において最も重要な標的と考えられている。しかしながら、E6/E7を含めたがんに関連する細胞内分子群の総体的挙動と、放射線治療・化学療法などのHPV関連がんの治療における異なる治療効果との関連については不明な点が多い。こうした点を科学的に明らかにすることは、HPV関連がんのより良い治療法を確立するために重要であり、本研究はそのための新たな基礎生物学的知見を得ることを目的としている。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNA (lncRNA) has been a prominent molecule in cancer biology but the significant knowledge in HPV-associated cancers has been less established. There have been few reports about human papillomavirus (HPV)-derived antisense RNAs expressed in HPV-associated cancers but their detailed structures and functions have been unknown. This study thus aims to identify the HPV antisense RNAs. PCR cloning and bioinformatic analysis revealed that one of the HPV antisense RNAs is a type of lncRNA and thus named HPV-AS lncRNA. Further expression analysis demonstrated that HPV-AS lncRNA is exclusively localized in the nucleus, suggesting it may play roles as an epigenetic modifier of oncogenes such as HPV E6 and E7. However, the results of knockdown experiments showed downregulation of several nuclear RNAs rather than that of HPV E6 and E7. In summary, HPV-AS lncRNA is expressed in certain types of HPV-associated cancer cells to maintain integrated nuclear RNA expression machineries

研究分野：Cancer biology

キーワード：head and neck cancer HPV16 lncRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス(HPV)の16型および18型はハイリスク型 HPV(HR-HPV)と呼ばれ、一部の頭頸部がんや子宮頸がんの主な原因因子となっている。これら HPV はがんを生じるタンパク質である E6 および E7 を有しており、そのことから E6/E7 は HPV 関連がんの予防及び治療法において最も重要な標的と考えられている。しかしながら、これらがん細胞中のがんに関連する細胞内分子群の総体的振る舞いが、どのように HPV 関連がんの悪性度や放射線治療及び化学療法に対する異なる治療効果と関連があるのかは、不明な点が多い。こうした点を明らかにすることは、将来的に HPV 関連がんのより良い治療法(優れた治療薬の開発、治療による副作用を抑えるためにどの程度治療強度を弱められるか等)を確立するために重要であり、本研究はそうした目標を達成するための新たな基礎生物学的知見を得ることを目的としている。近年細胞生物学の分野において、がん細胞における非コード RNA (タンパク質の情報を有さない RNA) の重要性が明らかになってきている。しかし HPV 関連がんにおける知見はまだ少ない。一方で HPV 関連がんにおいて HPV 由来のアンチセンス RNA (タンパク質の情報を有するセンス RNA に対し、センス RNA に相補的な配列を持つ RNA で、多くはタンパク質の情報を有さない)の存在は古くから報告されているが、構造及び細胞内における機能的役割についての詳細な報告はない。そこで本研究は HPV 関連がんにおける HPV 由来アンチセンス RNA の同定を目的とした。

(英文)

High-risk types of human papillomaviruses (HR-HPVs) such as HPV16 and HPV18, are a significant causing agent of oropharyngeal and cervical cancers. Therefore, understanding how their oncoproteins E6/E7 control multiple intracellular molecules in cancer cells is vitally important. In short, the viral gene expression is the central trait of HPV-positive squamous cell carcinomas (SCCs) and therapeutic targeting of E6/E7 has primarily been pursued. However, what specific intracellular contexts represent distinctive cancer phenotypes (such as cancer aggressiveness and chemo/radiotherapy resistances) within HPV-positive SCCs remain largely undefined. To unravel this issue will be demanded for developing more effective therapies for HPV-related SCCs. Long non-coding RNA (lncRNA) has been a prominent molecule in cancer biology but the significant knowledge in HPV-associated cancers has been less established. There have been few reports about human papillomavirus (HPV)-derived antisense RNAs expressed in HPV-associated cancers but their detailed structures and functions have been unknown.

### 2. 研究の目的

本研究は HPV 由来アンチセンス RNA の構造を明らかにし、HPV 関連がん細胞中の機能的役割を明らかにすることを端緒として始められた。PCR クローニング (DNA や RNA といった核酸の構造を決定するための手法) 及びバイオインフォマティクス解析 (生物学的情報を統計学的および情報科学的な論理でデータ解析する手法) によって種々の HPV 由来アンチセンス RNA の中から非コード RNA に分類される特徴的な RNA を同定し、HPV-AS lncRNA と命名した。そこで具体的にこの HPV-AS lncRNA の生物学的重要性を評価するために、(1)構造決定、(2) RNA 発現の機能的特徴の同定、(3) HPV 関連がん細胞中の機能的役割の同定、を目的とした。

(英文)

This study aims to identify the HPV antisense RNAs. PCR cloning and bioinformatic analysis revealed that one of the HPV antisense RNAs is a type of lncRNA and thus named HPV-AS lncRNA. Therefore, in order to reveal biological significance of HPV-AS lncRNA, three primary goals were set as follows: (1) structural identification of the viral ncRNAs, (2) functional characterization of the viral ncRNA expression, and (3) determination of functional roles of the viral ncRNAs in cancers (SCCs).

### 3. 研究の方法

#### (1) 構造決定

RACE-PCR 法 (核酸の末端配列を決定するための PCR 法) により HPV-AS lncRNA の末端配列を決定した。得られた配列は HPV16 のゲノム DNA (HPV に由来する全ての RNA の元) と配列比較し、全体の配列を把握した。

(英文)

RACE PCRs were performed to identify the structure of HPV-AS lncRNA. Cloned sequences were aligned to the HPV16 genomic DNA sequence.

## (2) RNA 発現の機能的特徴の同定

HPV 関連がんの患者検体および培養細胞中から総 RNA を抽出し、cDNA (RNA の実験解析のために、化学的に不安定な RNA を実験に適した安定な DNA に人工的に変換・合成したもの) を作成した。この cDNA を用いた定量 PCR (RNA の存在量を定量する手法) によって HPV 関連がんの患者検体および培養細胞中の HPV-AS lncRNA の発現量を調べた。

( 英文 )

Total RNAs were extracted from HPV-positive SCC cell lines and cancer patient tissues to synthesize cDNAs. Subsequent RT-PCR and RT-qPCR experiments were applied to determine HPV-AS lncRNA expression levels in patient tissues and SCC cell lines to estimate their cellular and physiological functions.

## (3) HPV 関連がん細胞中の機能的役割の同定

HPV-AS lncRNA を発現する培養細胞においてアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたノックダウン法 (細胞中の標的 RNA を特異的に分解する手法) を行い、様々な培養条件下における細胞の変化および種々の遺伝子発現の変化を調べた。

( 英文 )

In order to evaluate functional roles of HPV-AS lncRNA in SCCs, antisense oligonucleotide (ASO)-mediated knockdown experiments were performed.

## 4 . 研究成果

### 構造決定

RACE-PCR 法により HPV 関連がんにおいて発現している HPV 由来アンチセンス RNA には、長さおよび配列の異なる種々の末端配列があることがわかった (Fig.1)。これらアンチセンス RNA の中には HPV16 ゲノム配列のほぼ全長と一致する特徴的な配列があり、バイオインフォマティクス解析の結果からタンパク質の情報を有さない RNA であることも分かった。さらにこのユニークな RNA は細胞の細胞質ではなく核内に隔たって局在していることも分かった (タンパク質が合成されるのは細胞質)。以上のことから、この RNA は一部の HPV 関連がんにおいて発現している長鎖非コード RNA であることが分かった。

( 英文 )

Several different 3' ends of HPV16 antisense RNAs were identified by RACE-PCRs and one of them encodes an almost full HPV16 antisense sequence (Fig.1). This prominent sequence had low coding potential based on the results of *in silico* analysis such as Coding Potential Calculator (CPC). In addition, the antisense RNA was exclusively localized in the nucleus. The results demonstrate that this unique HPV antisense RNA is a type of lncRNA expressed in certain HPV-positive SCCs.

## (2) RNA 発現の機能的特徴の同定

逆転写 PCR および定量 PCR 法を用いて、HPV 関連がん培養細胞中の HPV-AS lncRNA の量を測定した。さらに培養細胞を細胞分画法によって核内成分と細胞質成分に分け、各々の RNA 量を定量 PCR により測定した。これらの実験結果から HPV-AS lncRNA は核内に偏在する核内長鎖非コ

Fig.1 Cloning of HPV-AS lncRNA

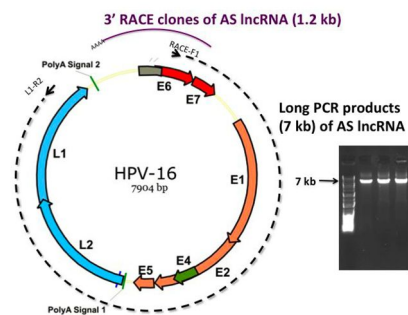
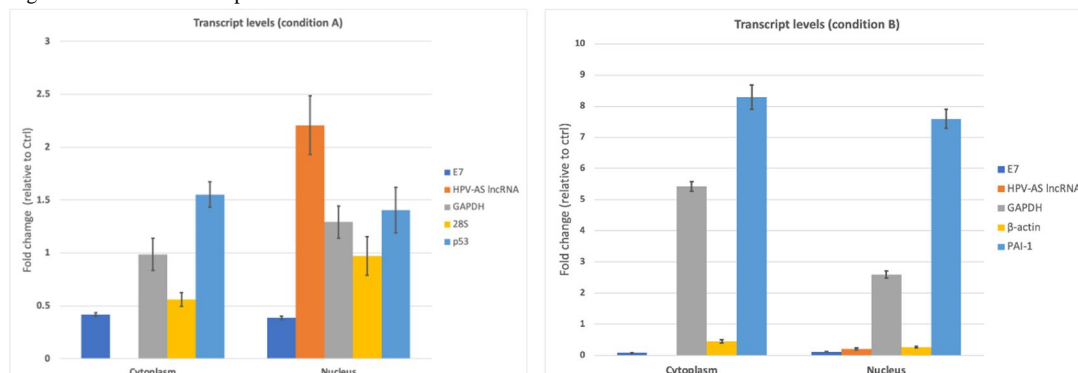


Fig.2 HPV-AS lncRNA expression in different culture conditions



ード RNA であることが判明した。次に HPV-AS lncRNA 発現の機能的意義を類推するため、細胞の培養条件を様々に変えた中で HPV-AS lncRNA と E6/E7(HPV 由来のがん誘導遺伝子)を含む種々の遺伝子発現の変化を定量した (Fig.2)。さらに、がん細胞を生体内環境により近い状態に再現するため、細胞の三次元培養を行ない、HPV-AS lncRNA と種々の遺伝子の発現量を通常の二次元培養のそれと定量比較した (Fig.3)。作成した三次元培養塊は少なくとも 13 日間生存状態を維持することができ、13 日培養後に通常の二次元培養下に戻した状態では再び接着増殖することを確認した (Fig.4)。これにより、この三次元培養法ががん転移を含む種々のがん悪性化のモデル実験に最適な手法であることが示唆された。以上の二次元および三次元培養における発現解析から、HPV-AS lncRNA が HPV の E6/E7 とは独立した固有の機能を持つことが示唆された。

Fig.3 HPV-AS lncRNA expression in SCC spheroids

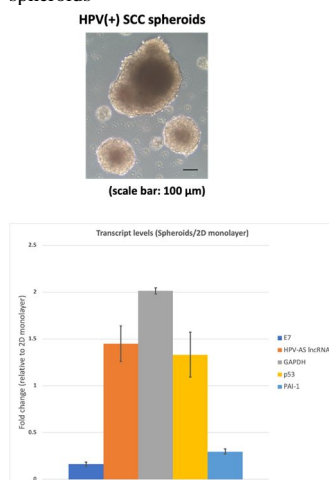
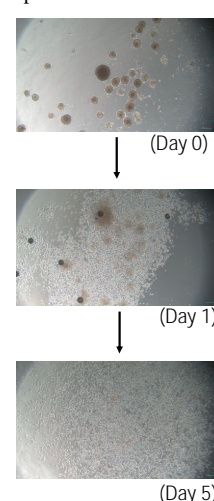


Fig.4 Reattachment of SCC spheroids



(英文)

RT-PCR and RT-qPCR assays were performed to evaluate HPV-AS lncRNA expression levels in different HPV-positive SCC cell cDNAs and subcellular fractionation/RT-qPCR analysis revealed that HPV-AS lncRNA is a nuclear lncRNA. Various different cell culture conditions to monitor changes in HPV-AS lncRNA expression were examined (Fig.2). Furthermore, not only conventional two-dimensional monolayer cell cultures but also three-dimensional spheroid cultures were conducted using HPV-positive SCC cell lines to evaluate HPV-AS lncRNA expression, since the 3D suspension culture can mimic significant *in vivo* cancer phenotypes such as anchorage-independent cell growth and metastasis (Fig.3). The established 3D suspension culture could maintain viable spheroids at least for 13 days such that the spheroids could reinitiate anchorage-dependent growth, demonstrating a model of cancer metastasis (Fig.4). Taken together, the results suggest that HPV-AS lncRNA may have unique functions independent of E6/E7.

Fig.5 Knockdown of HPV-AS lncRNA

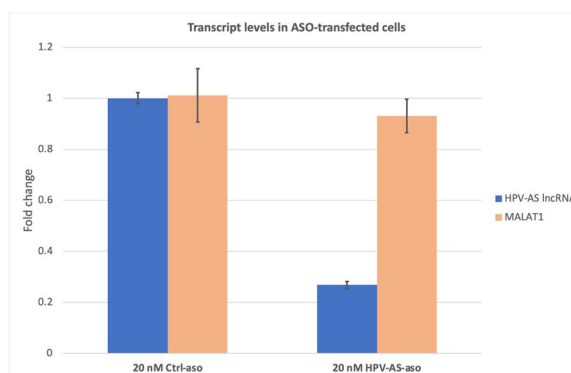
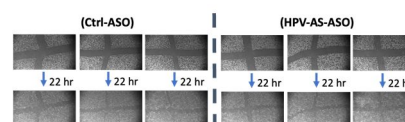


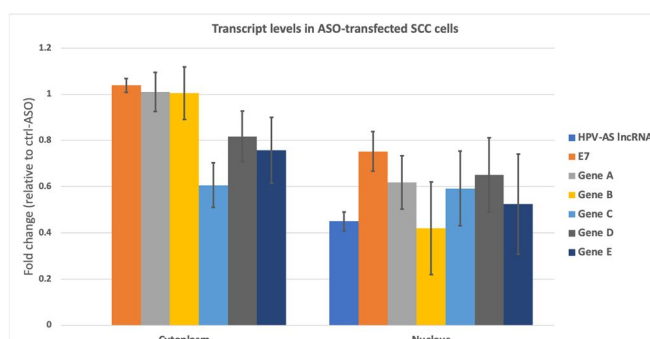
Fig.6 Wound healing assays



### (3) HPV 関連がん細胞中の機能的役割の同定

HPV-AS lncRNA の機能を知るために、HPV-AS lncRNA に特異的なノックダウン法を確立した (Fig.5)。確立したノックダウン法を用いて、がん細胞の転移能を評価する実験 (Fig.6) を含む種々の実験を行い、HPV-AS lncRNA が存在する細胞と意図的に減少させた (ノックダウンした) 細胞で、細胞の振る舞いにどのような違いが生じるかを比較検討した。並行して、ノックダウンした細胞における種々の遺伝子の核内および細胞質中の発現量を測定した (Fig.7)。これらの実験結果から、HPV-AS lncRNA が核内に

Fig.7 Cytoplasmic and nuclear transcripts in HPV-AS lncRNA knockdown cells



核内に

おける種々の RNA 調節機構に関わることが示唆された。

( 英文 )

In order to determine functional roles of HPV-AS lncRNA, antisense oligonucleotide (ASO)-mediated knockdown experiments were performed. The efficacy and specificity of knockdown were validated by RT-qPCR such that expression of HPV-AS lncRNA was efficiently decreased but a nuclear lncRNA MALAT1 was not (Fig.5). Using this technique, various cell-based assays such as wound healing assays to evaluate metastatic potentials (Fig.6) were performed. The results of subcellular fractionation and RT-qPCR assays demonstrated that HPV-AS lncRNA knockdown downregulate several nuclear transcripts (Fig.7). Therefore, HPV-AS lncRNA may participate in regulatory networks of nuclear RNAs.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------