

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：87102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18300

研究課題名（和文）頭頸部扁平上皮癌の浸潤・転移に関わる転写リプログラミング機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of transcriptional reprogramming mechanisms involved in invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

佐藤 晋彰 (Sato, Kuniaki)

独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・頭頸科医師

研究者番号：10859622

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）：頭頸部扁平上皮癌（頭頸部癌）の進展に寄与すると考えられる転写調節機構（転写リプログラミング機構）の異常を解明することを目的としたマルチオミクス解析を行った。根治手術を行った頭頸部癌症例の原発巣、頸部リンパ節転移巣、非腫瘍組織を用いてRNAシーケンス、ChIPシーケンスを施行した結果、転写調節因子YAP1と転写因子PITX2がこの機構に関与していることが示唆された。YAP1とPITX2の高発現は共に頭頸部癌患者の予後不良因子であった。またPITX2をノックダウンすると頭頸部癌細胞株の増殖能が有意に抑制された。今後、YAP1/PITX2に対する阻害薬開発を目標に機能解析を進めたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌の遺伝子変異はTP53などががん抑制遺伝子の機能喪失変異が主体であり、直接の治療標的となり得る遺伝子異常がほとんどない。これに対し我々は、頭頸部癌は転写リプログラミング機構に強く依存する悪性腫瘍であると仮説を立てた。今回、実際の頭頸部癌患者から得られた検体を用いたマルチオミクス解析によりYAP1とPITX2が協調して転写リプログラミング機構に関与する可能性を示した。本研究のような臨床検体を用いた頭頸部癌のマルチオミクス解析は前例がなく、学術的意義が高いと考えられる。また、本研究成果によりYAP1/PITX2が治療標的となる可能性が示唆され、今後の頭頸部癌治療の発展に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：To reveal the transcriptional reprogramming mechanisms which contribute to the progression and evolution of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), we performed multi-omics analysis using surgically-resected primary tumors, lymph node metastasis and non-cancerous tissue samples of HNSCC patients. Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) and RNA sequencing (RNA-seq) followed by bioinformatics analysis indicated that transcriptional co-factor Yes-associated protein 1 (YAP1) and transcription factor Paired-like homeodomain 2 (PITX2) cooperatively induce transcriptional reprogramming in HNSCC. Immunohistochemical staining of YAP1 and PITX2 in primary HNSCC tissues showed that both YAP1 and PITX2 predict poor prognosis of HNSCC patients. Furthermore, knockdown of PITX2 significantly reduced proliferation abilities of HNSCC-derived cells. Further analyses are needed to conclude our findings and to develop novel therapeutic strategies targeting YAP1/PITX2 in HNSCC.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：頭頸部癌 扁平上皮癌 バイオインフォマティクス エピジェネティクス RNAシーケンシング ChIPシーケンシング

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌（以下頭頸部癌）は、嚥下や発声に重要な口腔、咽頭、喉頭等に発生し患者の QOL を著しく損なう。更に、高率に認められる頸部リンパ節転移巣、遠隔転移巣は治療抵抗性を示すため、患者の予後は不良である。頭頸部癌患者の臓器温存と治療予後改善のためには、分子生物学的特徴に基づく新たな治療標的の同定が喫緊の課題である。

次世代シーケンサーによる癌の遺伝子変異解析が各癌種で盛んに行われ、これらの知見をもとに分子標的薬開発と臨床使用が進みつつある一方、頭頸部癌に特徴的な遺伝子変異の殆どが *TP53* や *CDKN2A* と言った癌抑制遺伝子の機能失活型変異であることが報告されており (*Nature*, 2015)、これらの遺伝子変異を直接の治療標的とすることは困難である。近年、癌遺伝子の活性化変異ではなく遺伝子転写調節機構（転写リプログラミング機構）の異常が癌の浸潤や転移に大きく寄与していることが判明し (*Cell*, 2017)、癌特有の異常な転写リプログラミング機構が治療標的となる可能性が示唆された。以上のことから、頭頸部癌は癌遺伝子の活性化変異ではなく、癌抑制遺伝子の失活や周囲微小環境からのストレスに応じて標的遺伝子の転写と発現を変化させることで環境に適応し、浸潤、転移を生じる悪性度の高いクローンへと進化すると推測される。即ち、頭頸部癌は転写リプログラミング機構に強く依存する悪性腫瘍であると考えられる。頭頸部癌が進展していく過程における転写リプログラミング機構の本態に迫った研究は過去になく、この転写リプログラミング機構の解明は頭頸部癌の新たな治療標的の同定に大きく貢献しうると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、患者より手術で摘出した頭頸部癌原発巣、頸部リンパ節転移巣、非腫瘍組織を用いて次世代シーケンサーによる RNA シーケンシング (RNA-seq)、クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq) を行い、転写調節領域の活性化部位の同定、標的遺伝子群の同定、クロマチン構造変化の推定を行う。これらの網羅的解析によって、頭頸部癌の進展・転移に寄与する転写リプログラミング機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、手術治療を行なった頭頸部癌患者より摘出した組織から抽出したクロマチン及び核酸を用いて次世代シーケンサーを用いた RNA-seq、ChIP-seq を行い、統合比較解析を行った。当初併施を計画していた全ゲノムシーケンシングは予算及び解析に要する労力と解析結果から得られるベネフィットのバランスを考慮した結果再検討の余地があると判断し、RNA-seq と ChIP-seq に加えて免疫組織学的染色と *in vitro* での機能解析を追加することとした。また、ChIP-seq に関しては凍結検体を株式会社 Active Motif に送付しシーケンシングを依頼することとした。これにより細胞固定やクロマチン抽出などの時間と労力を要する手順を簡略化し得た。

以下に研究計画の各段階①～④の方法について述べる。

### ① 検体の採取、核酸抽出

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター（以下、九州がんセンター）頭頸科にて、患者より手術によって摘出した手術検体から頭頸部癌原発巣、頸部リンパ節転移巣、非腫瘍組織の一部を検体として採取した。RNA-seq に供する検体に関しては九州がんセンター内で RNA を抽出し、

ChIP-seq に供する検体は速やかに凍結保存した。

## ② RNA シーケンシング (RNA-seq)

上記①で検体から抽出した RNA を株式会社 BGI JAPAN に送付し、RNA-seq を行った。各検体における遺伝子発現を明らかにし、発現変動遺伝子を同定した。

## ③ ChIP シーケンシング (ChIP-seq)

上記①で採取した検体を、株式会社 Active Motif に送付し、転写調節領域のヒストンマーカである H3K27ac 及び H3K9me3、申請者らが頭頸部癌の転写リプログラミングに重要と考えている転写調節因子 Yes-associated protein 1 (YAP1) に結合する抗体を用いた ChIP-seq を行った。

## ④ バイオインフォマティクス解析、機能解析及び臨床病理学的検討

東京大学医科学研究所のスーパーコンピューターShirokane5 を用いたバイオインフォマティクス解析パイプラインを使用し、上記②及び③で得られたデータの統合比較解析を行った。以下の解析によって原発巣検体、リンパ節転移巣検体、非腫瘍検体を比較し、データを得た。

発現変動遺伝子同定、パスウェイ解析、ゲノムワイドな転写調節領域の分布と活性化部位の同定、クロマチン構造変化の推定、転写因子結合部位の同定、転写調節領域の標的遺伝子群の同定。

この解析結果を解釈することで以下の2点について明らかにし、頭頸部癌の浸潤、転移過程において重要な転写リプログラミング機構の同定を試みた。

1. 非腫瘍部→原発巣→リンパ節転移巣と、癌が発生、浸潤、転移していく過程において、増殖と転移に有利な癌細胞はどのような標的遺伝子の転写を制御し、進化するのか？
  2. またこのような転写リプログラミング機構を制御する転写因子や転写調節因子は何か？
- これらの解析結果から同定した転写因子に対する抗体を用いて九州がんセンターで手術を行った症例の免疫組織学的染色、予後解析を行った。さらに、頭頸部癌細胞株を用いてこの転写因子に対するノックダウン実験を行い、表現形に及ぼす影響と機能解析を行った。

## 4. 研究成果

### ① 頭頸部癌原発巣、リンパ節転移巣、非腫瘍組織の遺伝子発現プロファイル

九州がんセンターで手術を行った頭頸部癌患者6症例から原発巣組織、リンパ節転移巣組織、非腫瘍組織合計24検体を採取し、RNA-seq を行った。

原発巣と非腫瘍組織は明確に別クラスターにクラスタリングされた一方で、リンパ節転移巣と原発巣の間では顕著な変化は見られなかった (図1A および B)。非腫瘍組織と比較して原発巣組織で有意に発現が上昇している発現変動遺伝子群の遺伝子オンロジー解析を行うと、細胞周期進行、細胞外マトリックスリモデリング、上皮間葉転換に関与する遺伝子群の濃縮が見られた (図1C)。

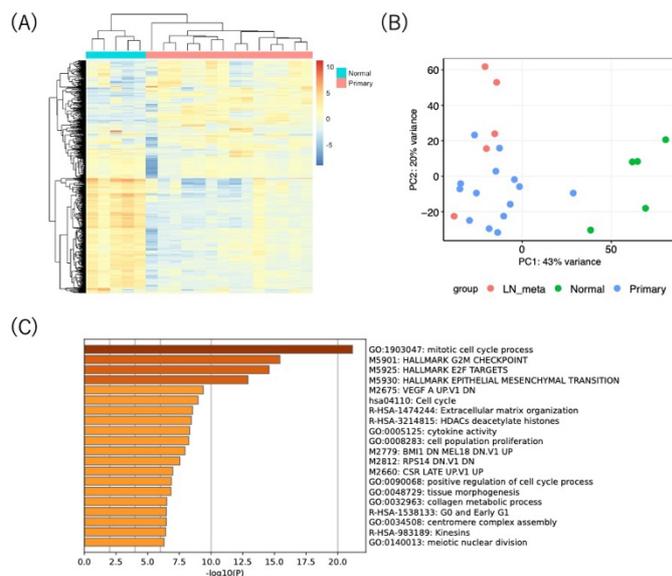


図1. 頭頸部癌組織の遺伝子発現プロファイル

## ② ChIP-seq によって同定された頭頸部癌に特徴的な転写調節領域の異常

続いて、原発巣組織 2 検体、リンパ節組織 1 検体、非腫瘍組織 1 検体を用いて H3K27Ac, H3K9me3, YAP1 に対する抗体を用いた ChIP-seq を行った。H3K27Ac や H3K9me3 といったヒストンマーカータンの変化はゲノムワイドには認められず、クロマチン構造の大規模な変化を示唆する所見は見られなかった一方、YAP1 の結合分布は非腫瘍組織と腫瘍組織の間で変化が見られた (図 2 A)。また、H3K27Ac のピークコールデータから強力な転写調節領域であるスーパーエンハンサーを同定したが、その数には大きな変化は見られなかった (図 2 B)。

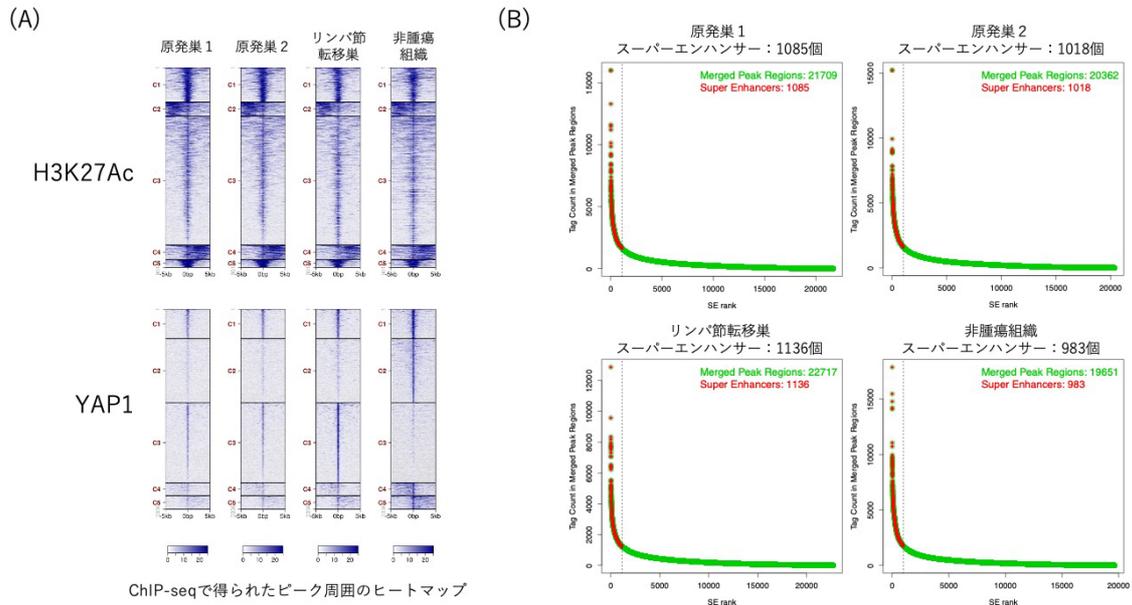


図 2. ChIP-seq によって得られた腫瘍特異的な YAP1 の結合パターン

## ③ RNA-seq、ChIP-seq の比較統合解析

上記①及び②の結果を用いた比較統合解析を行った。

1)RNA-seq で同定された腫瘍特異的な発現上昇遺伝子群、2)ChIP-seq で同定された腫瘍組織特異的に YAP1 が結合するスーパーエンハンサーの転写標的遺伝子群を同定し、1)と 2)の両方の条件を満たす遺伝子を抽出した。また、これらのスーパーエンハンサー領域に存在する転写因子結合モチーフ解析を行った (図 3 A)。この結果、63 遺伝子が頭頸部癌特異的な YAP1 関連スーパーエンハンサーの標的遺伝子として同定された。モチーフ解析の結果、YAP1 のパートナー転写因子として報告がある TEAD、AP-1、p63 に加えて転写因子 PITX2 を同定した (図 3 B)。PITX2 は幹細胞能や心筋の再生に関与するとされ、マウスモデルではこれらのメカニズムに *Yap1* と *Pitx2* が協調して作用すると報告されている (*Nature*. 2016)。また、頭頸部癌と組織学的、分子生物学的バックグラウンドが近い食道扁平上皮癌においては癌遺伝子である可能性を示唆する報告がある (*Clin Cancer Res*. 2017)。以上から、YAP1 と PITX2 が関与する異常な転写プログラミング機構が頭頸部癌の進展において重要な役割を担っている可能性があると考えられた。

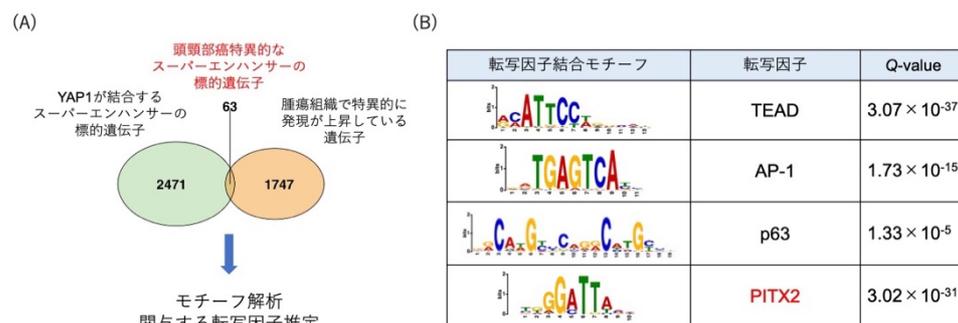


図 3. RNA-seq と ChIP-seq の統合解析

⑤ YAP1、PITX2 は頭頸部癌患者の予後不良因子である

九州がんセンター頭頸科で手術を行った、頭頸部癌の一種である口腔扁平上皮癌患者 86 名の原発巣組織を用いて、YAP1 及び PITX2 の免疫染色と予後解析を行った。我々は口腔癌患者において YAP1 の高発現は予後不良因子であることを先行研究で報告したが (*Sci Adv.* 2020)、PITX2 の高発現もまた口腔癌患者の予後不良因子であり、YAP1 と PITX2 の共発現は予後不良因子であることが判明した(図 4)。

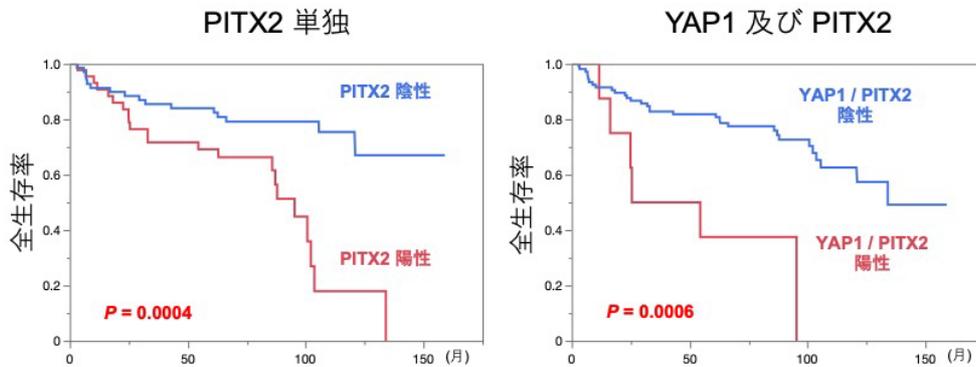


図4. 免疫染色と予後解析の結果

⑥ PITX2 のノックダウンは頭頸部癌細胞の増殖能を抑制する

頭頸部癌細胞株である HSC4 と SCC9 に対して siRNA を用いて PITX2 のノックダウンを行うと、いずれの細胞株も有意に増殖能が抑制された。

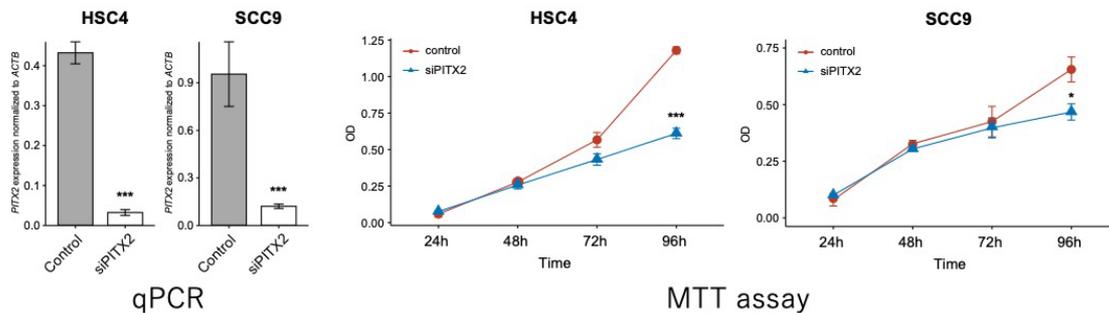


図5. PITX2 のノックダウン実験の結果

<今後の展望>

本研究成果は現在論文化を進めている。今後、頭頸部癌における PITX2 の癌遺伝子としての機能について、*in vitro* 及び *in vivo* での機能解析を計画している。特に YAP1 との結合や転写標的遺伝子の詳細な転写制御メカニズム、上皮間葉転換に関与するメカニズムについて免疫沈降やノックダウン細胞の RNA-seq 等によって明らかにしたい。本研究の成果と併せ論文化を予定している。また、本研究で同定した YAP1/PITX2 が関与する転写プログラミング機構が治療標的となり得るかを検証するため、阻害薬スクリーニングや *in silico* 解析によって阻害薬候補を同定し、*in vivo* での投与実験を計画したいと考えている。

## 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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Kuniaki, Komune Noritaka, Hongo Takahiro, Koike Kensuke, Niida Atsushi, Uchi Ryutaro, Noda Teppei, Kogo Ryunosuke, Matsumoto Nozomu, Yamamoto Hidetaka, Masuda Muneyuki, Oda Yoshinao, Mimori Koshi, Nakagawa Takashi	4. 巻 111
2. 論文標題 Genetic landscape of external auditory canal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3010 ~ 3019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14515	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 Komune Noritaka, Miyazaki Masaru, Sato Kuniaki, Sagiyama Koji, Hiwatashi Akio, Hongo Takahiro, Koike Kensuke, Noda Teppei, Uchi Ryutaro, Kogo Ryunosuke, Akagi Tsuchihashi Nana, Masuda Shogo, Nakagawa Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Prognostic Impact of Tumor Extension in Patients With Advanced Temporal Bone Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	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) 10.3389/fonc.2020.01229	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 UCHI RYUTARO, JIROMARU RINA, YASUMATSU RYUJI, YAMAMOTO HIDETAKA, HONGO TAKAHIRO, MANAKO TOMOMI, SATO KUNIYAKI, HASHIMOTO KAZUKI, WAKASAKI TAKAHIRO, MATSUO MIOKO, NAKAGAWA TAKASHI	4. 巻 41
2. 論文標題 Genomic Sequencing of Cancer-related Genes in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Coexisting Inverted Papilloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 71 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14752	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 -

1. 著者名 Sato Kuniaki, Nishiyama Kazuo, Taguchi Kenichi, Jiromaru Rina, Yamamoto Hidetaka, Matsunaga Akihide, Nagata Ryozaaburo, Rikimaru Fumihide, Toh Satoshi, Higaki Yuichiro, Oda Shinya, Nakagawa Takashi, Masuda Muneyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Genetic and transcriptomic analyses in a rare case of human papillomavirus-related oropharyngeal squamous-cell carcinoma combined with small-cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Case Studies	6. 最初と最後の頁 a006102 ~ a006102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/mcs.a006102	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kuniaki Sato, Kensuke Koike, Takahiro Hongo, Ryutaro Uchi, Hidetaka Yamamoto, Muneyuki Masuda, Yoshinao Oda, Koshi Mimori, Takashi Nakagawa
2. 発表標題 The genetic landscape of external auditory canal squamous cell carcinoma (EACSCC).
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 晋彰, 小宗 徳孝, 内 龍太郎, 小池 健輔, 野田 哲平, 本郷 貴大, 安松 隆治, 益田 宗幸, 中川 尚志
2. 発表標題 外耳道扁平上皮癌における遺伝子変異およびコピー数解析
3. 学会等名 第44回日本頭頸部癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kuniaki Sato, Hirofumi Omori, Muneyuki Masuda, Takashi Nakagawa
2. 発表標題 Epigenetic reprogramming induced by YAP1 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 晋彰
2. 発表標題 頭頸部癌研究におけるバイオインフォマティクス解析の意義と実際
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 晋彰, 中野 貴史, 大森 裕文, 中川 尚志, 益田 宗幸
2. 発表標題 YAP1/PITX2によって誘導される頭頸部扁平上皮癌の転写リプログラミング機構の解明
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 益田 宗幸, 大森 裕文, 佐藤 晋彰, 中川 尚志
2. 発表標題 基礎研究会からの発表 頭頸部発癌進化はYAP1による組織再生プログラムに強く依存している
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究協力者	白髭 克彦  (Shirahige Katsuhiko)  (90273854)	東京大学・定量生命科学研究所・教授   (12601)	
研究協力者	新井田 厚司  (Niida Atsushi)  (00772493)	東京大学・医科学研究所・講師   (12601)	
連携研究者	益田 宗幸  (Masuda Muneyuki)  (90284504)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・統括診療部長   (87102)	

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