

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890176

研究課題名(和文) 口腔癌における INK4 / ARF 遺伝子座の高次エピゲノムの解析と新規診断法の開発

研究課題名(英文) Higher-order epigenetic analysis of the INK4/ARF locus in oral cancer and development of novel diagnostic methods

研究代表者

廣末 晃之 (Hirosue, Akiyuki)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00638182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：INK4/ARF遺伝子座の3つの抑制遺伝子(p15/ARF/p16)は癌化において重要な因子あり、本研究ではINK4/ARF遺伝子座の高次エピゲノムの解析と口腔扁平上皮癌の病態と関連するエピジェネティクス・プロファイルに基づいた新たな診断法を確立することを目的とし、エピゲノムの解析を行った。3Cアッセイにより、口腔扁平上皮癌細胞株ではINK4/ARF遺伝子座のクロマチン高次構造がダイナミックに変化していることが分かった。また、DNAメチル化解析からはMGMT、TFAP2EのDNAメチル化は術前治療の治療効果との相関が見られ、OSCCの薬剤感受性を予測するマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Three critical tumor suppressors (p15/ARF /p16) encoded by the INK4/ARF locus are key regulators of tumorigenesis. In this study, to elucidate a higher-ordered epigenetic regulation of the locus in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and to develop novel diagnostic methods based on epigenetic profile, we investigated the relevance between clinical effect and epigenetic alterations in OSCC. Chromosome conformation capture assay revealed that higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus dynamically changed in OSCC cell line. DNA methylation analysis demonstrated that hypermethylation of MGMT and TFAP2E genes were associated with pathological response to 5-FU-based chemoradiotherapy. These results suggest that methylation status of these genes may provide the prediction of drug sensitivity in OSCC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：INK4/ARF遺伝子座 高次エピゲノム DNAメチル化 口腔扁平上皮癌 薬剤耐性

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 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、その 5 年生存率は過去 30 年間ほとんど変化していない (Forastiere et al. *New Engl. J. Med.* 2003)。その原因としては、再発・転移の非制御症例や治療抵抗性の症例といった難治性の癌の問題が挙げられる。よって再発・転移のリスクアセスメントおよび治療反応性の予測は予後を向上させる重要な因子となり得ると考えられる。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)。

エピジェネティクスの機構は DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化・メチル化等の翻訳後修飾、DNA とタンパク質の複合体であるクロマチンで成り立っており、このように修飾されたゲノムはエピゲノムと呼ばれている (Wolffe et al. *Science* 1999)。近年では、DNA メチル化やヒストン修飾などの 1 次構造体のエピゲノムに加え、3 次元的なクロマチンループ構造による高次元のエピゲノム機構を介した遺伝子発現制御のメカニズムが解明されてきており、これらのエピゲノムが総合して、癌化や老化といった生命現象に関与していると考えられている (Gondor et al. *Nature* 2009)。

ヒト 9 番染色体上に位置する INK4/ARF 遺伝子座は 3 つの癌抑制遺伝子 (p15/ARF/p16) をコードし、癌化、老化、幹細胞の維持などの多くの生命現象に関与している (Gil et al. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006)。INK4/ARF 遺伝子座は様々な癌で DNA メチル化によるサイレンシングの報告がある。特に大腸癌では DNA メチル化が高度に蓄積した CpG island methylator phenotype: CIMP がマーカーのひとつとして解析が進められており、CIMP 症例は特異的な臨床像を示すことも分かっている (Toyota et al. *PNAS* 1999)。しかしながら、OSCC ではこのような CIMP の報告は少なく、その臨床病理学的背景との関連性は解析されていない。さらに INK4/ARF 遺伝子座は OSCC を含む様々な癌でエピジェネティックな制御を受けているが、より高次のエピジェネティック制御機構についてはほとんど分かっていない。

研究代表者は過去に INK4/ARF 遺伝子座の高次エピジェネティック制御機構について体細胞 (線維芽細胞) とリプログラム細胞 (セネッセンス細胞、iPS 細胞) を用いてクロマチン構造変換の観点から CCCTC-binding factor (CTCF) に着目し、Chromosome conformation capture (3C) アッセイ等を用いた解析を進め、論文報告を行った (Hirosue et al. *Aging Cell* 2012)。CTCF は 11 個の zinc-finger モチーフを持つタンパク質であり、転写調節、クロマチン境界形成、クロマ

チンループ形成などの多様な役割が判明してきており、高次クロマチン形成を制御する重要な因子である。OSCC においても過去に報告した INK4/ARF 遺伝子座での 3 カ所の CTCF 集積部位 (IC 部位) での結合性の変化が起きていることや INK4/ARF 遺伝子座の高次クロマチン構造がダイナミックに変化していることが予想される。INK4/ARF 遺伝子座の高次エピゲノムの特性は細胞の個性を特徴づけるため、OSCC においてもその特徴を解明することで、OSCC の病態に基づく新たな診断法のひとつとしての応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では OSCC における INK4/ARF 遺伝子座の高次エピゲノムの特性や OSCC に特異的な DNA メチル化状態を解明し、OSCC の病態に関連するエピジェネティクス・プロファイルに基づいた新たな診断・治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) OSCC 細胞株における INK4/ARF 遺伝子座の高次エピゲノムの解析

(a) OSCC における INK4/ARF 遺伝子座の 3 つの遺伝子 (p15、ARF、p16) と CTCF の発現
OSCC 細胞株 (SAS, Ca9-22) および非悪性上皮細胞 (HaCaT 細胞) より mRNA を抽出し、定量的 RT-PCR にて p15、ARF、p16、CTCF の発現変化について解析した。

(b) OSCC における INK4/ARF 遺伝子座での CTCF 結合量の変化

OSCC 細胞株 (SAS, Ca9-22) を用いてクロマチン免疫沈降-定量的 PCR (ChIP-qPCR) 法にて IC 部位での CTCF 結合量の変化を解析した。

(c) OSCC における INK4/ARF 遺伝子座における DNA メチル化状態の解析

OSCC 細胞株より DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った後に INK4/ARF 遺伝子プロモーターでの DNA メチル化状態を定量的 methylation specific PCR (MSP) 法にて解析した。また、当所属分野では 5FU-耐性の口腔扁平上皮癌株 (SAS/FR2) (Nagata et al. *Br. J. Cancer* 2011) を樹立しており、同細胞株を用いて同様の実験を行った。

(d) OSCC における INK4/ARF 遺伝子座の高次クロマチン構造の解析

OSCC 細胞株 (SAS) および線維芽細胞 (IMR90 細胞) を用いて、Chromosome conformation capture (3C) アッセイ (Dekker et al. *Science* 2002) を行い、INK4/ARF 遺伝子領域における高次クロマチン構造を解析した。3C アッセイ後のサンプルの検出には定量的 PCR を用い、クロマチンの相互作用の程度を定量解析し、各細胞株ごとに比較を行った。

(2) OSCC における INK4/ARF 遺伝子座のエピジェネティクス・プロファイルとその臨床的意義の解析

OSCC 組織の解析として研究代表者の所属分

野である熊本大学大学院歯科口腔外科学分野に保管している臨床検体のうち、治療前の生検時のサンプルを用いた。

・OSCC 組織における INK4/ARF 遺伝子座および他の遺伝子領域の DNA メチル化解析
OSCC 組織より DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った後、p16 のプロモーター領域における DNA メチル化状態をバイサルファイトシークエンス法もしくは定量的 MSP 法にて解析した。併せて癌抑制遺伝子である Death-associated protein kinase1:DAPK1、DNA 修復酵素である O-6-methylguanine-DNA methyltransferase :MGMT、5-FU の抗癌剤耐性との関与が報告されている Transcription factor AP-2, epsilon (TFAP2E) のプロモーター領域の DNA メチル化についても解析を行った。

DNA メチル化結果と臨床病理学的特徴とを比較し、その臨床学的意義を解析した。臨床病理学的特徴としては、TNM 分類、Stage 分類、浸潤様式、再発・後発転移の有無、生存、術前治療の治療効果（抗癌剤、放射線感受性）等の項目について検討を行った。

(3)脱メチル化剤による抗癌剤感受性の変化
5-FU 耐性 OSCC 細胞株(SAS/FR2、Ca9-22/FR2)を用いて、脱メチル化剤である 5-aza-deoxycytidine(5-aza-dC)の処理の有無における 5-FU の薬剤感受性について、薬剤感受性試験を行った。

4. 研究成果

(1)OSCC 細胞株における INK4/ARF 遺伝子座の発現および CTCF の発現変化
OSCC 細胞株 (SAS、Ca9-22) にて CTCF および INK4/ARF 遺伝子座の3つの遺伝子(p15、ARF、p16)の発現変化を定量的 RT-PCR 法にて調べた。OSCC 細胞株では非悪性上皮細胞 (HaCaT 細胞)と比較して、CTCF の発現はやや上昇を認めた。一方、p15、ARF、p16 の発現変化においては、ARF は HaCaT 細胞と比較し、発現がやや上昇していたが、p15、p16 に関しては著明な発現抑制を認めていた。

(2) OSCC 細胞株における INK4/ARF 遺伝子座の CTCF 結合の変化
次に OSCC 細胞株 (SAS、Ca9-22) にて過去に報告した INK4/ARF 遺伝子座での3カ所の CTCF 集積部位 (IC 部位)での結合性の変化を調べるために、クロマチン免疫沈降-定量的 PCR 法 (ChIP-qPCR)を行った。その結果、SAS 細胞、Ca9-22 細胞とも、IC1、IC2 に関しては CTCF の結合が保たれていたが、IC3 では著明な結合量の低下を認めた。

(3)OSCC 細胞株における p16 プロモーター領域の DNA メチル化の解析
OSCC 細胞株 (SAS、Ca9-22) 5-FU 耐性 OSCC

株 (SAS/FR2、Ca9-22/FR2) を用いて p16 プロモーター領域での DNA メチル化状態の解析を定量的 MSP 法にて行った。その結果、p16 プロモーター領域では SAS 細胞、Ca9-22 細胞とも高度な DNA メチル化を認めた。また、5-FU 耐性 OSCC 細胞株においても同様に、高メチル化状態であった。

(4)OSCC 細胞株における INK4/ARF 遺伝子座の高次クロマチン構造の変化
OSCC 細胞株における INK4/ARF 遺伝子座の高次クロマチン構造を調べるために、SAS 細胞を用いて 3C アッセイを行った。比較として、IMR90 細胞(線維芽細胞)も同時に解析した。3つのリファレンス (IC1、IC2、IC3) それぞれで相互作用を検出したところ、IMR90 細胞においては3カ所の IC 部位と p16 プロモーター領域が近接した構造を呈していた。しかし、SAS 細胞において同様な解析を行ったところ、IC1/p15 と IC3、IC1/p15 と p16 領域の相互作用は IMR90 細胞と比較して低下していた。SAS 細胞においては IC3 の CTCF 結合量の著明な低下が認められていたため、その結果がクロマチンの相互作用に関係していると考えられた。また、p16 のプロモーター領域では DNA の高メチル化が認められていたため、IC 部位と同様に相互作用の低下に関与していると考えられた。これらの結果より、OSCC 細胞ではクロマチンループ構造がダイナミックに変化している可能性が示唆された。

(5)OSCC 組織における DNA メチル化の変化
治療前の生検時のサンプルから抽出した DNA をバイサルファイト処置し、定量的 MSP 法にて DNA メチル化状態の解析を行った。対象とした遺伝子は p16 に加え、癌抑制遺伝子の DAPK1、DNA 修復酵素の MGMT 5-FU の抗癌剤耐性と関連が報告されている TFAP2E の遺伝子を同時に解析した。正常組織と比較し、p16、MGMT、DAPK1、TFAP2E のプロモーター領域とも癌組織においては有意に DNA メチル化が高くなっていた。

(6)DNA メチル化の変化と臨床病理学的特徴との関連

上記4つの遺伝子を対象として、当科にて5-FUの経口抗癌剤であるS-1を併用した術前の化学放射線療法を施行した患者50例について、DNAメチル化状態と臨床病理学的特徴 (TNM 分類、Stage 分類、浸潤様式、再発・後発転移の有無、生存、術前治療の治療効果)との関連性について解析を行った。その結果、術前治療の治療効果とDNAメチル化との比較において、p16 遺伝子に関しては有意な関連は認めなかったが、MGMT 遺伝子の高メチル化症例においては、有意に術前治療の治療効果が乏しかった。また、DAPK1、TFAP2E の高DNAメチル化症例においても治療効果が乏しくなる傾向が得られた。また、5年生存率にお

ける解析から、MGMT、TFAP2Eとも高メチル化されている症例では生存率が低くなる傾向も得られた。

(7)脱メチル化剤による5-FU耐性の緩和
脱メチル化剤である5-aza-dCを5-FU耐性細胞株(SAS/FR2)へ投与したところ、Cell proliferation assayにおいては濃度依存的に細胞の増殖が抑制された。また薬剤感受性試験を施行したところ、5-FU耐性OSCC株は5-aza-dcにより、その耐性度が低くなり、薬剤感受性が改善を認めた。

今回の研究結果より、OSCCにおいてもINK4/ARF遺伝子座での3カ所のCTCF集積部位(IC部位)のうち、IC3にて結合性の変化が起こり、さらにp16プロモーター領域では高度にDNAメチル化されており、INK4/ARF遺伝子座の高次クロマチン構造がダイナミックに変化していた。INK4/ARF遺伝子座の高次エピゲノムの特性は細胞の個性を特徴づけるため、今後OSCCの病態に基づく高次クロマチン構造の変化についてもさらなる解析を行い、高次エピゲノムの特性からOSCCの病態を解明していきたいと考えている。また、臨床検体を用いたDNAメチル化解析によりMGMT、TFAP2EのDNAメチル化は術前治療の治療効果との相関が見られ、OSCCの薬剤感受性を予測するマーカーとなり得る可能性が示唆された。さらに、ヒストン修飾状態や他の遺伝子のDNAメチル化解析、高次エピゲノムの解析を加え、OSCCの総合的なエピジェネティクス・プロファイルを確立し、エピジェネティクス・プロファイルに基づく新たな診断法の確立を目指していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kawahara K, Nakayama H, Nagata M, Yoshida R, Hirosue A, Tanaka T, Nakagawa Y, Matsuoka Y, Kojima Taku, Takamune Y, Yoshitake Y, Hiraki A, Shinohara M: A low dicer expression is associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a shorter overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 査読有 2014, 43:350-356
Nakagawa Y, Nakayama H, Nagata M, Yoshida R, Hirosue A, Tanaka T, Kawahara K, Matsuoka Y, Kojima Taku, Takamune Y, Yoshitake Y, Hiraki A, Shinohara M: Overexpression of fibronectin confers cell adhesion-mediated drug resistance

(CAM-DR) against 5-FU in oral squamous cell carcinoma cells.

Int J Oncol. 査読有 2014, 44:1376-1384

[学会発表](計5件)

Nakamoto M, Hirosue A, Nakamura C, Kawahara K, Nakagawa Y, Yoshida R, Nagata M, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M: Epigenetic analysis of the drug resistance in oral squamous cell carcinoma.

21ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY.

2013年10月21-24日

Palau Congressos, Barcelona, Spain
廣末晃之、中山秀樹、中元雅史、中村智穂、川原健太、中川純泰、吉田遼司、永田将士、平木昭光、牧正啓、篠原正徳: 口腔扁平上皮癌の抗癌剤耐性に関するエピゲノム異常.

第58回日本口腔外科学会総会学術大会
2013年10月11-13日 福岡国際会議場 福岡

Hirosue A, Nakamoto M, Nakamura C, Kawahara K, Nakagawa Y, Yoshida R, Nagata M, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M: Epigenetic alterations in the drug resistance of oral squamous cell carcinoma.

第72回日本癌学会学術総会

2013年10月3-5日 パシフィコ横浜 神奈川

Hirosue A, Nakayama H, Ishihara K, Nakamoto M, Nagata M, Kawahara K, Yoshida R, Nakao M, Shinohara M: Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in reprogrammed human cells.

17th World Congress on Advances in Oncology and 15th International Symposium on Molecular Medicine
平成24年10月11-13日

Hotel Creta Maris Resort, Creta, Greece

Hirosue A, Nakamoto M, shihara K, Takehisa T, Narita M, Nakao M, Shinohara M: Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells.

第71回日本癌学会学術総会

2012年9月19-21日 ロイトン札幌 北海道

6. 研究組織

研究代表者

廣末 晃之 (HIROSUE, Akiyuki)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 00638182