

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670713

研究課題名(和文) 遺伝子マスターレギュレーターSATB1の頭頸部癌遺伝子発現制御機構

研究課題名(英文) A master regulator, SATB1, regulates genes expressions in head and neck cancers

研究代表者

近藤 悟 (Satoru, Kondo)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：70436822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： SATB1は、ゲノムのマスターレギュレーターとして1000種類以上の遺伝子発現の上流に位置する。SATB1発現により、乳癌では癌の増殖・浸潤・転移に関する多数の遺伝子を活性化する。しかし、頭頸部癌におけるSATB1発現は研究されていない。

本研究では、上咽頭癌組織において、SATB1の発現が高いと高転移性となる事が判明した。また、EBウイルスLMP1導入した細胞ではSATB1が誘導され、形質転換とアポトーシス抵抗性に関与していた。上咽頭癌以外の頭頸部癌組織の解析では、中咽頭癌でSATB1発現が亢進していた。これらから、SATB1は頭頸部癌で癌の増殖・浸潤・転移に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： SATB1 is a master regulator that regulates thousand kinds of gene expressions. SATB1 associates cancer progression, invasion, and metastasis in mammalian cancer. SATB1 activates various gene expressions in mammalian cancer. However, there has been no reports that examine SATB1 expression in head and neck cancer.

In this study, we found that Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (EBV-LMP1) expression correlates with SATB1 expression in sample tissues with nasopharyngeal carcinoma. Moreover, we found EBV-LMP1 induces SATB1 expression in epithelial cell lines. In addition, SATB1 induced by EBV-LMP1 correlates transformation and anti-apoptosis. Finally, we also examined that SATB1 expression in other head and neck cancers and we found that SATB1 expression level of oropharyngeal cancer (OPC) is higher than that of other cancers. These finding suggest SATB1 associates cancer progression, invasion, and metastasis in head and neck cancers.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：SATB1 LMP1 EBV 上咽頭癌 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

SATB1 (special AT-rich sequence binding 1)は、多数の遺伝子発現を同時に調節する乳癌における独立した予後因子である。SATB1 は、発癌や転移促進に関与する多数の遺伝子発現を変化させる癌の増殖と転移を促進するゲノムオーガナイザーとして働いている。

我々は、EB ウイルス癌遺伝子 LMP1 は、上咽頭癌幹細胞誘導に関与することを報告した。この報告を元に幹細胞・前駆細胞に関与する因子、癌マスターレギュレーターの SATB1 に着目し、我々は、予備実験として、免疫組織化学法により上咽頭癌組織において、EB ウイルス LMP1 と SATB1 発現が相関する傾向にあることを見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 上咽頭癌における SATB1 発現の臨床的意義の解明、2) EB ウイルス LMP1 による SATB1 誘導機構の解明、3) 各種頭頸部癌における SATB1 発現の臨床的意義についての解析を目的とする。

3. 研究の方法

1) 上咽頭癌における SATB1 発現と予後に与える影響の解析

当教室で診断加療した 75 例の上咽頭癌症例について、予後を中心とした臨床パラメーターと SATB1 発現の関連について Kaplan-Meier 法・ログランク検定により解析した。

2) EB ウイルス LMP1 発現細胞における SATB1 誘導機構の解明

EB ウイルス LMP1 発現細胞における SATB1 発現に一致するという予備実験結果をもとに、LMP1 による SATB1 誘導の分子機構について解析を行った。

SATB1 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼの上流に組み込んだベクター LMP1 をはじめとする各種 EB ウイルス遺

伝子発現ベクターを、EB ウイルス陰性アデノイド由来培養細胞 Ad-AH に形質導入して、ルシフェラーゼアッセイによりどの EB ウイルス遺伝子が SATB1 を誘導するかを解析した。

また、各種 EB ウイルス感染細胞株を用い、SATB1 発現をウエスタンブロットおよび RT-PCR 法により検討した。

また、EB ウイルス感染細胞株において、LMP1 発現を阻害する siRNA を遺伝子導入することにより SATB1 発現が抑制されるかを検討し、LMP1 による SATB1 誘導を分子レベルで検証した。

LMP1 発現は抑制せず、SATB1 に対する siRNA を作製し、LMP1 発現抑制により SATB1 発現を抑制した場合と LMP1 発現はそのまま SATB1 を特異的に抑制した場合の細胞形質について比較検討し、EB ウイルス陽性細胞における SATB1 の生物学的役割について解析した。具体的には足場非依存性の細胞増殖能など悪性腫瘍の形質変化をソフトアガー内に 3D 培養することで検討し、無血清培養条件下のアポトーシス抵抗性について検討した。

3) 各種頭頸部癌の SATB1 発現と予後解析

上咽頭における SATB1 の臨床的意義の研究・EB ウイルスによる SATB1 誘導の分子機構に関する研究に続き、他の頭頸部癌についても SATB1 発現が予後を含めた臨床データとの関連性について解析を行った。免疫組織化学的に SATB1 発現を評価し、症例の病期・粗生存率・局所制御率・遠隔転移制御率などとの関連を統計学的に解析した。

4. 研究成果

1) 上咽頭癌における SATB1 発現と予後に与える影響の解析

上咽頭癌組織における EBV 遺伝子産物と SATB1 の発現解析について検討した。

LMP1 と SATB1 の免疫組織学的検討から、SATB1 の発現が高いと高転移性となることがわかった。LMP1 発現が高いと長期予後に良い傾向を認めたが、SATB1 発現と予後の間には統計学的な有意差は認めなかった。

2) EB ウイルス LMP1 発現細胞における SATB1 誘導機構の解明

SATB1 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼの上流に組み込んだベクター LMP1 をはじめとする各種 EB ウイルス遺伝子発現ベクターを、EB ウイルス陰性アデノイド由来培養細胞 Ad-AH に形質導入して、ルシフェラーゼアッセイを行った。LMP1 発現によって、SATB1 の転写活性が高くなることが判明し、NF- κ B の転写抑制ベクターを共発現させると、その活性が低下したことから、LMP1 による転写活性には NF- κ B が関与していることが判明した。また、EBV 陽性細胞を用いた実験では、LMP1 発現が高いと SATB1 の発現が淡白レベルでも mRNA レベルでも高くなることが判明した。

LMP1 を導入した細胞は SATB1 の発現が高くなり、寒天培地上で多数のコロニーを形成することがわかった。また SATB1 の siRNA によって、SATB1 の機能を抑制するとこれらのコロニー形成能は低下した。

また、SATB1 の下流にある分子についても検討を行った。検討の中でいくつかの分子が高く発現しており、LMP1 による高転移性に関与していることが推察された。LMP1 発現細胞では、無血清培地上でもコロニー形成があり、SATB1 を抑制することで形成能が低下したことから、SATB1 はアポトーシス抵抗性に関係していることも判明した。

3) 各種頭頸部癌の SATB1 発現と予後解析

上咽頭癌以外の他の頭頸部癌における SATB1 発現の解析を行った。中咽頭癌をはじめとした癌種では SATB1 の発現が高いことが判明したが、予後や転移率などの臨床的因子とは相関性は認めなかった。

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 19 件)

- 1) Wakae K, Aoyama S, Kondo S. (他 16 名, 12 番目) Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by Next-Generation Sequencing. **Virology** 485:460-466, 2015. 査読有.
- 2) Ahasan MM, Wakae K, Kondo S. (他 14 名, 12 番目) APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. **Biochem Biophys Res Commun.** 457:295-299. 2015. 査読有.
- 3) Komori T, Kondo S, Wakisaka N. (他 6 名, 2 番目) IL-18 is highly expressed in inflammatory infiltrates of submandibular glands in patients with IgG4-related disease. **Hum Pathol.** 46:1850-8, 2015. 査読有.
- 4) Endo K, Tsuji A, Kondo S. (他 3 名, 3 番目) Carnitine is associated with fatigue following chemoradiotherapy for head and neck cancer. **Acta Otolaryngol.** 135:846-852, 2015. 査読有.
- 5) Yoshizaki T, Kondo S. (他 9 名, 2 番目) Progress and controversy for the role of chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma. **Jpn J Clin Oncol.** 45:244-247, 2015 査読有.
- 6) Endo K, Masatani T, Tsuji A, Kondo S. (他 3 名, 4 番目) Thyroid dysfunction after intra-arterial chemotherapy for hypopharyngeal and laryngeal cancer. **Auris Nasus Larynx** 42:231-234. 2015. 査読有.
- 7) Kanda T, Miyata M, Kano M, Kondo S, Yoshizaki T. (他 2 名, 4 番目) Clustered microRNAs of the Epstein-Barr virus cooperatively downregulate an epithelial cell-specific metastasis suppressor. **J Virol.** 89:2684-2697. 2015. 査読有.
- 8) Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, Yoshizaki T. (他 6 名, 3 番目) HPV Status Determines the Efficacy of Adjuvant Chemotherapy With S-1, an Oral Fluorouracil Prodrug, in Oropharyngeal Cancer. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 124:400-406, 2015. 査読有.
- 9) Murono S, Tsuji A, Endo K, Kondo S, Yoshizaki T. (他 2 名, 4 番目) Factors associated with gastrostomy tube dependence after concurrent

- chemoradiotherapy for hypopharyngeal cancer. **Support Care Cancer** 23:457-462. 2015. 査読有.
- 10) Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S. (他 7 名、3 番目) Induction of epithelial-mesenchymal transition and loss of podoplanin expression are associated with progression of lymph node metastases in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. **Histopathology** 66:771-780. 2015. 査読有.
 - 11) Aga M, Betnz GL, Kondo S, Yoshizaki T. (他 6 名、5 番目) Exosomal HIF1 α supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. **Oncogene** 33:4613-4622. 2014. 査読有.
 - 12) Ueno T, Endo K, Kondo S, Yoshizaki T. (他 4 名、3 番目) Factors affecting outcomes of alternating chemoradiotherapy for nasopharyngeal cancer. **Ann Otol Rhinol Laryngol.** 123:509-516. 2014. 査読有.
 - 13) Aga M, Kondo S, Yamada K, Yoshizaki T. (他 9 名、2 番目) Immunoglobulin class switching to IgG4 in Warthin tumor and analysis of serum IgG4 levels and IgG4-positive plasma cells in the tumor. **Hum Pathol.** 45:793-801. 2014. 査読有.
 - 14) Yoshizaki T, Kondo S, Wakisaka N. (他 6 名、2 番目) Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett.** 337:1-7 2013. 査読有.
 - 15) Murono S, Tsuji A, Endo K, Kondo S. (他 2 名、4 番目) Immunohistochemical detection of SATB1 is independent of thyroid cancer differentiation. **Laryngoscope** 123:2909-2912. 2013. 査読有.
 - 16) Nakanishi Y, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T. (他 7 名、2 番目) Role of activation-induced cytidine deaminase in the development of oral squamous cell carcinoma. **PLoS One** 8:e62066. 2013. 査読有.
 - 17) Aga M, Kondo S, Yamada K, Yoshizaki T. (他 7 名、2 番目) Warthin's tumor associated with IgG4-related disease. **Auris Nasus Larynx** 40:514-517. 2013. 査読有.
 - 18) Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T. (他 6 名、2 番目) Expression of seven-in-absentia homologue 1 and hypoxia-inducible factor 1 alpha: novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett.** 331:52-57 2013. 査読有.
 - 19) Endo K, Ueno T, Kondo S. (他 6 名、3 番

目) Tumor-targeted chemotherapy with the nanopolymer-based drug NC-6004 for oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci.** 104:369-374. 2013. 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Kondo S, Kano M, Aga M, Wakisaka N, Yoshizaki T. The expression of Sparc in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma and its relation with cell competition. 7th International Nasopharyngeal Carcinoma Biannual Meeting Symposium. 2015 年 6 月 3 日-6 日、Yogyakarta (Indonesia)
- 2) Epstein-Barr ウィルス関連腫瘍上咽頭癌における Sparc 発現の検討-EBV による細胞競合現象の関連性-、近藤悟、小森岳、辻亮、遠藤一平、脇坂尚宏、室野重之、吉崎智一. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会 総会・学術講演会、2015 年 5 月 20 日-23 日、東京国際フォーラム(東京・東京都)
- 3) Relationship between APOBEC3 expression and viral genome hypermutation and integration in HPV-related oropharyngeal cancers. 近藤悟、脇坂尚宏、吉崎智一. 第 74 回日本癌学会、2015 年 10 月 8 日-10 日、名古屋国際会議場(愛知・名古屋市)
- 4) The expression of Sparc in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma and its relation with cell competition. 近藤悟、脇坂尚宏、吉崎智一. 第 73 回日本癌学会、2014 年 9 月 25 日-9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- 5) Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Initiates Cancer Progenitor Cells in Nasopharyngeal Cell Lines. Kondo S, Kano M, Kobayashi E, Ueno T, Pagano JS, Yoshizaki T. 6th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma, 2013 年 6 月 20 日-6 月 22 日、Istanbul (Turkey)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 悟 (KONDO, Satoru)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：70436822

(2) 研究分担者

脇坂 尚宏 (WAKISAKA, Naohiro)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号：70377414

(3) 連携研究者

()

研究者番号：