

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462600

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるTet-assist Bisulfite 法による脱メチル化解析

研究課題名(英文) Demethylase analysis by using tet-assist bisulfite method in HNSCC.

研究代表者

大和谷 崇 (Yamatodani, Takashi)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60334984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌での脱メチル化酵素、メチル化酵素の働きと、これらの酵素の発現変化がDNAメチル化にどのように影響を与えているか、また脱メチル化酵素、メチル化酵素の発現をコントロールしていると考えられる転写因子Xの影響を細胞株に対するsiRNAを使ってノックダウンし解析した。頭頸部癌において脱メチル化酵素(TET1, TET2, TET3)、メチル化酵素(DNMT3A, DNMT3B)が、Gene Xの働きなどを通して、メチル化、脱メチル化のコントロールを行い、DNAメチル化の蓄積に関与していることが予想された。

研究成果の概要(英文)：This study examined DNA methylation enzymes (DNMT3A, DNMT3B) and DNA demethylation enzymes (TET1, TET2, TET3) expression and profiles of head and neck cancer (HNSCC) patients. This study suggests that DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2, TET3 are a likely mechanism of X gene inactivation, supporting the hypothesis that the X gene may play a role in the tumorigenesis of HNSCC and may serve as an important biomarker.

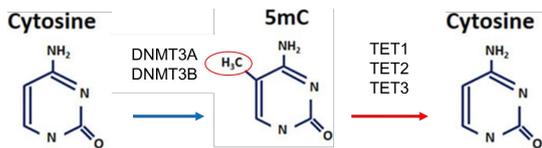
研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 DNAメチル化酵素 脱メチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

当研究グループが頭頸部癌において新規に癌抑制遺伝子であることを確認した GALR1 や他の癌抑制遺伝子 9 種類のプロモーター領域のメチル化度を調べた。その結果、メチル化された遺伝子数が増えると生存率が有意 ( $P < 0.01$ ) に低下することがわかった。

Traditional Bisulfite 法》従来のメチル化解析は、サンプル DNA をバイサルファイト処理で非メチル化シトシンをウラシル (C U) に変換して、5-メチルシトシン (mC C と読む) と非メチルシトシン (C T と読む) をシーケンスの違いを検出していた。DNA メチル化は、DNA メチル化酵素が CpG ジヌクレオチドのシトシン 5 位の炭素にメチル基を付加して 5-メチルシトシン (mC) とすることによって起こり、その機構はこれまで詳細に解析されている。DNA 脱メチル化は、生体内でどのような反応が起こり生じているのかが不明な点はまだ多い。5-ヒドロキメチルシトシン (hmC) は、近年、動物組織で発見されたシトシン修飾体のひとつで、Tet タンパク質が hmC 合成活性 (-CH<sub>3</sub> -CH<sub>2</sub>OH) をもつことが示された。生体内では、Tet タンパク質と Tymine DNA glycosylase の働きで、メチルシトシンは、脱メチル化されシトシンとなる。



エピジェネティクスにおける hmC の役割は未だ判明していないが、脱メチル化の始まりを示す変化であり、mC と異なる重要な役割を担っていると考えられている。

2. 研究の目的

エピジェネティック修飾のひとつである DNA メチル化は、遺伝子発現の抑制やゲノム安定性の維持に必須である。これまで DNA メチル化の解析は詳細に行われていたが、DNA のメチル基を消去する分子基盤 (DNA 脱メチル化) は不明であった。最近、DNA 脱メチル化酵素として機能する可能性をもつ Tet タンパク質が着目され、その DNA 脱メチル化活性に依存して生成される 5-ヒドロキメチルシトシンが検出された。

今回我々は、TET 遺伝子と DNMT3 遺伝子の発現を解析し、メチル化、脱メチル化の酵素の働きが、どのように頭頸部癌のエピゲノム異常の違いを生じているのか知見を蓄積していきたい。

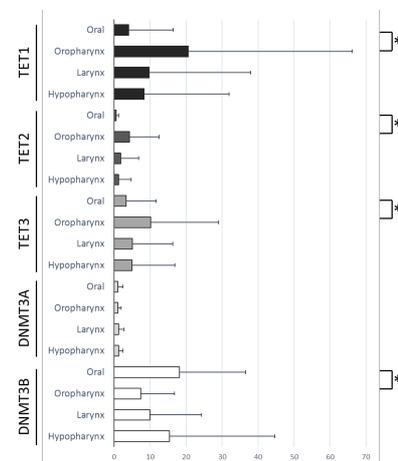
3. 研究の方法

エピジェネティック修飾のひとつである DNA メチル化は、遺伝子発現の抑制やゲノム安定性の維持に必須である。これまで DNA メチル化の解析は詳細に行われていたが、DNA のメチル基を消去する分子基盤 (DNA 脱メチル化) は不明であった。近年、DNA 脱メチル化酵素として機能する可能性をもつ Tet タンパ

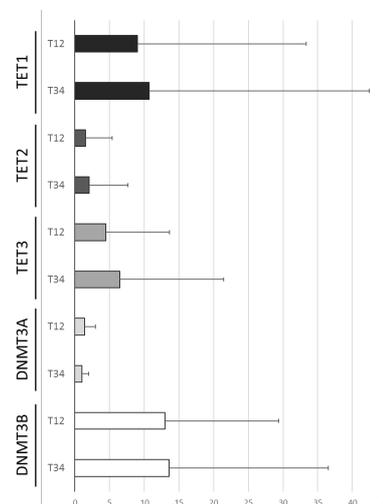
ク質が着目され、その DNA 脱メチル化活性に依存して生成される 5-ヒドロキメチルシトシンが検出された。今回の研究で、脱メチル化酵素である ten eleven translocation (TET1, TET2, TET3) の頭頸部癌での発現とメチル化酵素 DNA methyltransferases (DNMT3A, DNMT3B) の発現の解析を行い頭頸部癌での脱メチル化酵素、メチル化酵素の働きと、これらの酵素の発現変化が DNA メチル化にどのように影響を与えているか、また脱メチル化酵素、メチル化酵素の発現をコントロールしていると考えられる転写因子 X の影響を細胞株に対する siRNA を使ってノックダウンし解析した。また臨床検体を使って、高 X 発現症例と低 X 症例での脱メチル化酵素、メチル化酵素の発現の変化を解析した。

4. 研究成果

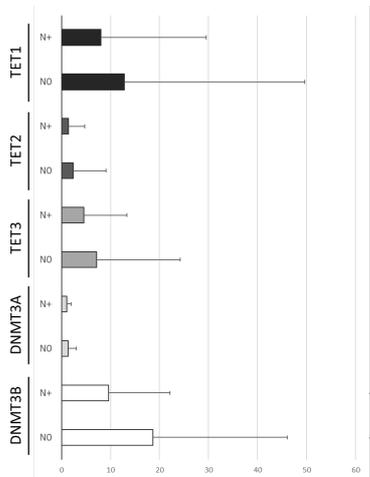
(1) 臨床検体 149 例を使った mRNA 発現解析。中咽頭癌は口腔癌と比べ、TET1, 2, 3 遺伝子の発現が有意に亢進し、DNMT3B 遺伝子の発現が有意に低下していた。中咽頭癌では脱メチル化をすすめる働きが亢進していると考えられる。喉頭癌、下咽頭癌は、有意な差を認めなかった。



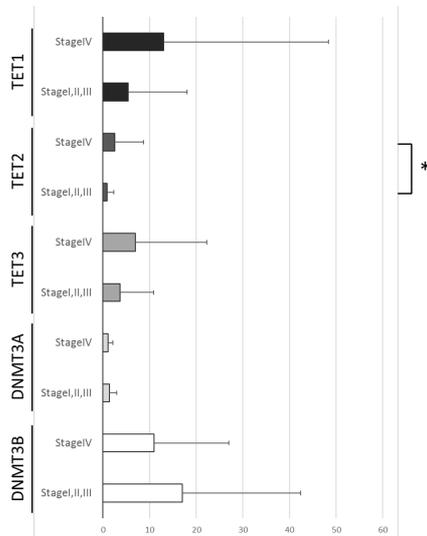
(2) 腫瘍進行度との比較解析。脱メチル化酵素 (TET1, TET2, TET3)、メチル化酵素 (DNMT3A, DNMT3B) のいずれも腫瘍進行度によって発現量の変化はみられなかった。



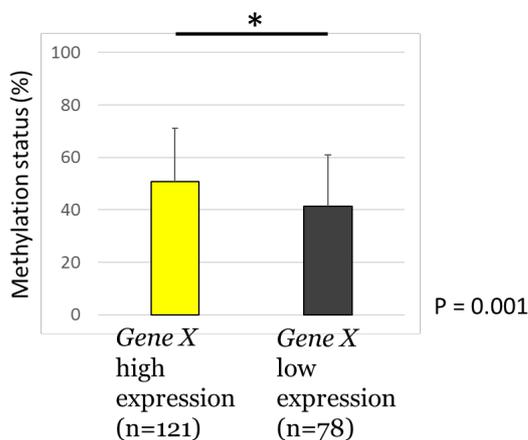
(3) 頸部リンパ節転移の有無の比較解析。メチル化酵素 DNMT3B が頸部リンパ節転移無しの場合で有意に高発現を認めた。



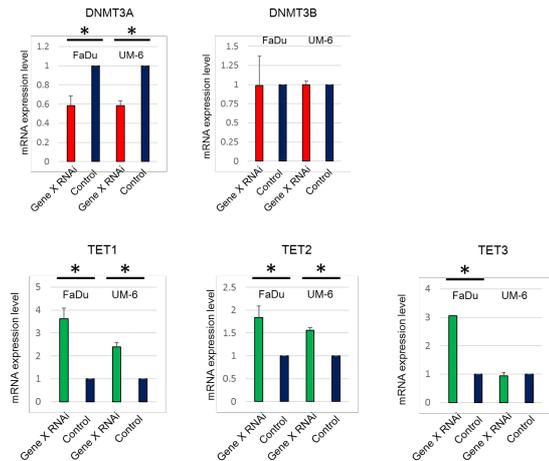
(4) ステージ進行度との比較解析。TET2 遺伝子の発現がステージ IV で有意に高発現であった。



(5) Gene X の発現量による癌抑制遺伝子の DNA メチル化度の違い。Gene X の高発現している症例で癌抑制遺伝子の DNA メチル化度が有意に高かった。



(6) Gene X の siRNA を使って細胞株へのノックダウン。Gene X siRNA を使ってノックダウンすると DNMT3A が低発現になり TET1, TET2, TET3 は高発現になった。



これらの結果から、頭頸部癌において脱メチル化酵素(TET1, TET2, TET3)、メチル化酵素(DNMT3A, DNMT3B)が、Gene X の働きなどを通して、メチル化、脱メチル化のコントロールを行い、DNA メチル化の蓄積に関与していることが予想された。

#### 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 10 件)

1. Izumi C, Misawa K, Endo S, Sugiyama K, Mochizuki D, Imai A, Mima M, Yamatodani T, Mineta H: Late recurrence of breast carcinoma metastasis to the hypopharynx: a case report. *SpringerPlus*, 11;5:599. 2016
2. Misawa K, Kawasaki H, Matsuo R, Sugiyama K, Mochizuki D, Endo S, Imai A, Misawa Y, Yamatodani T, Mizuta K, Mineta H: Human papillomavirus associated small cell carcinoma/neuroendocrine carcinoma of the oropharynx: A report of two cases. *SpringerPlus*, 2016 in press
3. Endo S, Mizuta K\*, Takahashi G, Nakanishi H, Yamatodani T, Misawa K, Hosokawa S, Mineta H: The effects of ventilation tube insertion or trans-tympanic silicone plug insertion on a patulous Eustachian tube. *Acta Oto-Laryngologica*, 136(6):551-5. 2016
4. Hosokawa S, Funai K, Sugiyama K, Takahashi G, Okamura J, Takizawa Y, Yamatodani T, Mineta H. Survival outcomes after surgical resection of pulmonary metastases of head and neck tumours. *J Laryngol*

- Otol.*;130(3):291-5. 2016
5. 大和谷 崇ら. 外耳道癌術後感染に対して有茎側頭筋弁が有用であった一例 耳鼻咽喉科臨床 109(2):89-94. 2016
  6. Kamiya K, Unno N, Miyazaki S, Sano M, Kikuchi H, Hiramatsu Y, Ohta M, Yamatodani T, Mineta H, Konno H. Quantitative assessment of the free jejunal graft perfusion. *J Surg Res*, 194(2):394-9. 2015
  7. 大和谷 崇ら. 広範囲気管合併切除後に二期の再建を行った甲状腺癌症例 頭頸部外科 25(1): 85-90. 2015
  8. Misawa Y, Misawa K, Kanazawa T, Uehara T, Endo S, Mochizuki D, Yamatodani T, Carey TE, Mineta H: Tumor suppressor activity and inactivation of galanin receptor type 2 by aberrant promoter methylation in head and neck cancer. *Cancer* ; 120(2):205-213, 2014
  9. Hosokawa S, Mizuta K, Takahashi G, Okamura J, Takizawa Y, Hosokawa K, Yamatodani T, Mineta H. Carcinoma of the external auditory canal: histological and treatment groups. *B-ENT*;10(4):259-64. 2014
  10. 大和谷 崇ら. 両側真珠腫術後に髄膜瘤を形成し、髄液漏出停止に難渋した一例 *Otology Japan* 24(3): 195-199. 2014

[学会発表](計7件)

1. 大和谷 崇ら. 鼓室型グロームス腫瘍の一例(口演) 第26回日本頭頸部外科学会 平成28年1月27日~平成28年1月29日 名古屋国際会議場、愛知
2. 大和谷 崇ら. 二次性中耳真珠腫の臨床的検討(ポスター) 第117回日本耳鼻咽喉科学会総会 平成28年5月18日~21日 名古屋国際会議場、愛知
3. 大和谷 崇ら. 外耳道腫瘍として認められた顎関節ガングリオンの一例(ポスター) 第78回耳鼻咽喉科臨床学会 平成28年6月23日~6月24日 城山観光ホテル、鹿児島
4. 大和谷 崇ら. 外耳道癌術後感染に対して有茎側頭筋弁が有用であった一例 第77回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会 平成27年6月25日~26日 オークラアクティビティ浜松
5. 大和谷 崇ら. 真珠腫性中耳炎術中に認められた側頭骨髄膜脳瘤の一例 第25回日本耳科学会総会学術講演会 平成27年10月7日~平成27年10月10日 長崎ブリックホール(長崎市)
6. 大和谷 崇ら. 気管再建を行った甲状腺浸潤癌の一例(口演) 第24回日本頭頸部外科学会総会 香川 サンポート高松 平成26年1月30日 高松
7. 大和谷 崇ら. 術前に内耳障害を来した

後天性真珠腫手術症例の検討。(口演)  
第24回日本耳科学会総会 新潟朱鷺メッセ 平成26年10月17日 新潟

[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

大和谷 崇 (YAMATODANI, Takashi)  
浜松医科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 60334984

(2)研究分担者

三澤 清 (MISAWA, Kiyoshi)  
浜松医科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 90334979

峯田周幸 (MINETA, Hiroyuki)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40190714

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )