

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861406

研究課題名(和文) AP-1 遺伝子群による頭頸部頸部リンパ節転移の進展機序の解明

研究課題名(英文) AP-1 family as a key molecule in the regulation of the pathways related to regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

佐野 大佑 (SANO, Daisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10620990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：同所性頭頸部癌モデルにおける頭頸部癌頸部リンパ節転移能，経尾静脈肺転移モデルにおける遠隔転移能と対比する形でWhole gene microarrayを行った。同結果を元に遺伝子カスケード解析を行い，頭頸部癌の転移機構に深く関わる候補遺伝子としてAP-1 遺伝子群を同定し，AP-1 Familyの中でもJunBを検証対象として選出した。

頭頸部癌におけるJunB発現抑制に伴い，浸潤能，遊走能の低下と，in vivoでは肺転移形成能の抑制と生存期間の延長を認めた。

以上の結果から，本研究により頭頸部癌において，JunBは細胞浸潤能，遊走能を亢進することで遠隔転移形成を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We initially performed the upstream and key nodes analysis related with whole gene microarray analysis characterized by distant metastatic potential in vivo with HNSCC cell lines and identified JunB, member of the activated protein-1 (AP-1) family, as a key molecule regulating the pathways related with distant metastasis of HNSCC. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of JunB, and Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (cas9) system (CRISPR/Cas9)-mediated knockout of JunB in HNSCC cells, markedly suppressed the ability of invasion and migration in vitro. In addition, knockout of JunB significantly repressed the incidence of lung metastases in vivo. These results suggested that JunB could play an important role to promote cell invasion, migration and distant metastasis of HNSCC.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 遠隔転移 AP-1

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は症状が出現しにくいことが多いため進行癌で発見されることが多く、予後不良である。昨今頭頸部癌に対する様々な治療法の開発や、画像等を用いた診断技術に著しい進歩があるにも関わらず、ここ数十年の頭頸部癌の予後改善は乏しい。大きな原因の一つは頭頸部癌の転移病変制御が困難なためである。したがって頭頸部癌の転移機序を解明することは頭頸部癌の治療成績を改善することに直結するといえる。

このような背景のもと、申請者は前回獲得した文科省科学研究費(研究課題番号: 24791797)により、頸部リンパ節転移を再現、検討できる同所性頭頸部癌モデルを用いて得られた *in vivo* における頭頸部癌頸部リンパ節転移の結果に加え、Whole gene microarray、並びに同解析結果をもとに施行された遺伝子カスケード解析の結果から、頭頸部癌頸部リンパ節転移と強い関連をもつ可能性が高い遺伝子として、AP-1 遺伝子群を同定し、研究成果の報告をした。

また、頭頸部癌の遠隔転移関連候補遺伝子を同定するため、上記研究報告と同様に経尾静脈肺転移モデルによる頭頸部癌遠隔転移の結果に加え、Whole gene microarray、並びに同解析結果をもとに施行された遺伝子カスケード解析を施行したところ、AP-1 遺伝子群が頭頸部癌の遠隔転移関連候補遺伝子として再び同定された。

2. 研究の目的

本研究では、AP-1 遺伝子群が頭頸部癌の転移に果たす役割を明らかにし、AP-1 遺伝子群が制御する機序を同定することで、将来の新しい頭頸部癌の治療法、頭頸部癌転移を早期に同定しうる新しい診断法の開発への足がかりとなりうるかを目的とする。

3. 研究の方法

まず頭頸部癌細胞株における AP-1 構成タンパク質 (Fos family: Fos, c-Fos, Fra-1 並びに Jun family: c-Jun, Jun B) の発現を western blotting を用いて評価し、今までの遺伝子カスケード解析結果と共に考察し、「JunB が頭頸部癌の転移を促進する」という仮説のもと以下の検討を行った。

JunB の発現抑制細胞株を siRNA または CRISPR/cas9 を用いて作製し、invasion assay、migration assay、cell viability assay を行い、JunB 発現抑制による *in vitro* における浸潤能、遊走能、増殖能に与える影響を検討した。また CRISPR/cas9 による JunB の発現抑制細胞株による経尾静脈肺転移モデルを用いて、JunB 発現抑制による *in vivo* における遠隔転

移能に与える影響を、経尾静脈肺転移モデルの肺重量、肺腫瘍占有面積率、肺転移率を調べることで検討した。

4. 研究成果

c-Jun, Jun B, Fra-1 のタンパク発現は肺転移無形成細胞株と比し、肺転移高形成細胞株で高発現の傾向を認めた。

siRNA を用いてノックダウン細胞株を作製し、invasion assay、migration assay を施行したところ、両細胞株において、JunB の発現抑制に伴い浸潤能、遊走能の低下を認めた。同結果は CRISPR/cas9 によるノックアウト KCC-T871 株における migration assay においても遊走能低下と同様の結果であることを確認した。一方、JunB 発現抑制に伴う細胞増殖能の変化は認めなかった(図1, 2)。

経尾静脈肺転移モデルにおいては、JunB の発現抑制により肺重量、肺腫瘍占有面積率、肺転移率の低下を認め、それらと共にモデルマウスの生存延長を確認した(図3)。

以上の結果から、本研究により頭頸部癌において、JunB は細胞浸潤能、遊走能の促進を介して遠隔転移形成を促進することが示唆された。

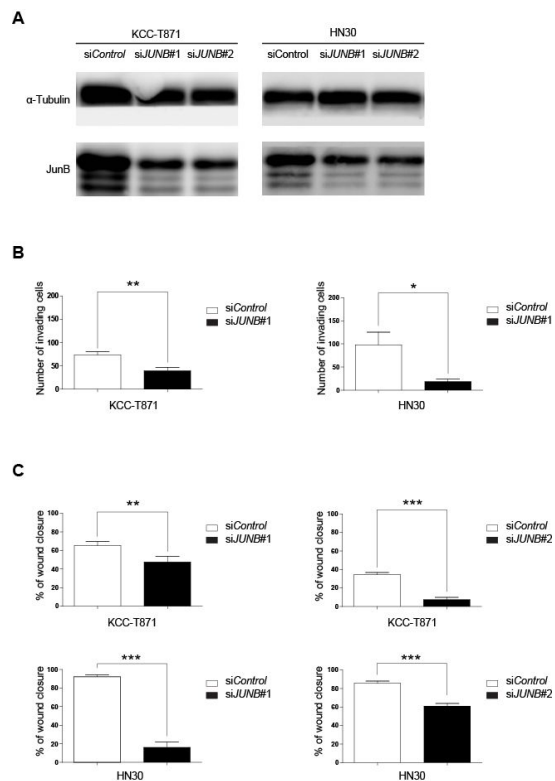


図1. JunB 発現抑制に伴う *in vitro* における浸潤能、遊走能への影響

A. siRNA による JunB ノックダウン頭頸部癌細胞株 B. siRNA による JunB ノックダウンは細胞浸潤能を低下させた。C. siRNA による JunB ノックダウンは細胞遊走能を低下させた。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (bars, SEM)

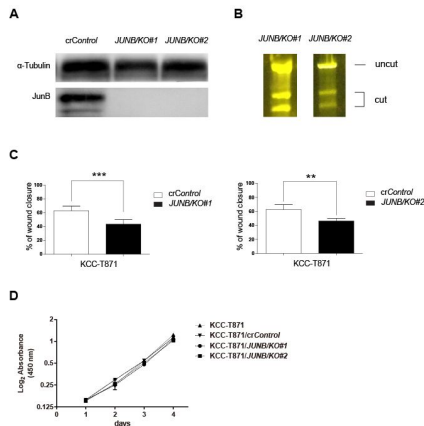


図2. sgRNAによるJunB発現抑制に伴う*in vitro*における遊走能, 増殖能への影響

A. B. sgRNAによるJunBノックアウト頭頸部癌細胞株
C. sgRNAによるJunBノックアウトは細胞遊走能を低下させた。D. JunBノックアウトにより細胞増殖能に変化は無かった。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (bars, SEM)

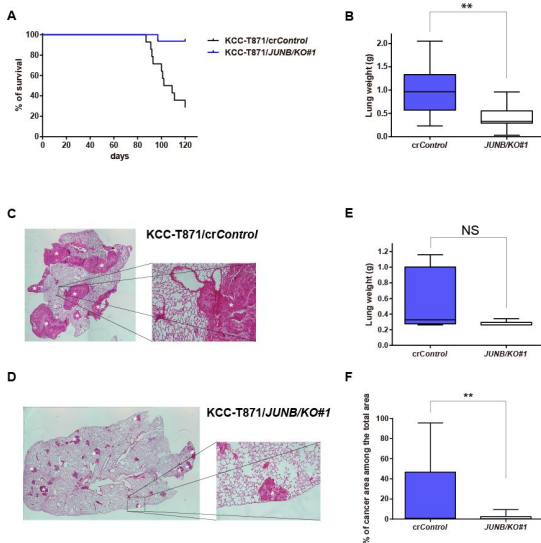


図3. JunB発現抑制による*in vivo*における遠隔転移能に与える影響

A. JunB発現抑制によりモデルマウスの生存は延長した。
B. JunB発現抑制によりモデルマウスの肺重量は減少した。
C. 肺組織像(HE染色, コントロール群) D. 肺組織像(HE染色, JunB発現抑制群) E. JunB発現抑制によるモデルマウスの肺重量減少を再確認した。F. JunB発現抑制によりモデルマウスの肺腫瘍占有面積率は低下した。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (bars, SEM)

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 6 件)

Hyakusoku H, Sano D, Takahashi H, Hatano T, Isono Y, Shimada S, Ito Y, Myers JN, Oridate N: JunB promotes cell invasion, migration and distant metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. J Exp Clin Cancer Res. 2016 Jan

12;35:6. doi: 10.1186/s13046-016-0284-4. 査読有

Neskey DM, Osman AA, Ow TJ et al. (14 番目/24 人): Evolutionary Action Score of TP53 Identifies High-Risk Mutations Associated with Decreased Survival and Increased Distant Metastases in Head and Neck Cancer. Cancer Res. 2015 Apr 1;75(7):1527-36. 査読有

Hah JH, Zhao M, Pickering CR et al. (10 番目/16 人): HRAS mutations and resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. Head Neck. 2014 Nov;36(11):1547-54. 査読有

Shiwarski DJ, Shao C, Bill A et al. (8 番目/14 人): To "grow" or "go": TMEM16A expression as a switch between tumor growth and metastasis in SCCHN. Clin Cancer Res. 2014 Sep 1;20(17):4673-88. 査読有

Zhou G, Wang J, Zhao M et al. (6 番目/21 人): Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation. Mol Cell. 2014 Jun 19;54(6):960-74. 査読有

佐野大佑, 折館伸彦: よくわかる遺伝子機能と遺伝子 頭頸部癌と遺伝子. JOHNS 30(6) 719-722. 2014 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

Sano D, Hyakusoku H, Takahashi H, Hatano T, Isono Y, Oridate N: JunB promotes distant metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), October 8-10, 2015

百束紘, 佐野大佑, 高橋秀聡, 波多野孝, 磯野泰大, 荒井康裕, 折館伸彦: 頭頸部癌遠隔転移進展における AP-1 遺伝子群の関与についての検討. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 東京国際フォーラム(東京都千代田区), 2015 年 5 月 20~23 日

Sano D, Hyakusoku H, Takahashi H, Hatano T, Isono Y, Oridate N: AP-1 family promotes cell invasion and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma *in vivo*. 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), September 25-27, 2014

Sano D, Hyakusoku H, Takahashi H, Oridate N: The comprehensive profile with the upstream and key nodes analysis for regional and distant

metastatic potential of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. 5th World Congress of IFHNOS, New York, NY, July 26 -30, 2014

佐野大佑, 高橋秀聡, 折館伸彦. 遺伝子カスケード解析による頭頸部癌マウスモデルにおける頸部リンパ節・遠隔転移能に対する検討. 第38回日本頭頸部癌学会, 東京ファッションタウンビル(東京都江東区), 2014年6月12~13日.

佐野大佑, 百束紘, 高橋秀聡, 荒井康裕, 高橋優宏, 西村剛志, 折館伸彦. 遺伝子カスケード解析による同所性頭頸部癌モデルにおける頸部リンパ節転移能に対する検討. 第115回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市), 2014年5月14~17日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 大佑 (SANO, Daisuke)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 10620990