

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861738

研究課題名(和文) 口腔癌の抗癌剤および放射線耐性に関するエピゲノム異常の解明と個別化治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of epigenomic alterations in chemoresistance and radioresistance of oral squamous cell carcinoma to provide the personalized medicine.

研究代表者

廣末 晃之 (Hirosue, Akiyuki)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00638182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(OSCC)における抗癌剤/放射線耐性は効果的な癌治療を妨げる重要な因子である。エピゲノムを用いた癌の診断や治療反応性の予測は様々な癌で研究されているが、OSCCの抗癌剤/放射線耐性に関してはほとんど報告がない。そこで、本研究ではOSCCの抗癌剤/放射線耐性に関連するエピゲノム異常を解明し、エピゲノムプロファイルに基づいた新たな診断法の開発を目指すことを目的とした。臨床検体を用いたDNAメチル化解析によりMGMT、TFAP2E、DAPK1のDNAメチル化は化学放射線療法の治療効果との相関が見られ、OSCCの抗癌剤感受性や放射線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)：Chemo-radiotherapy resistance is a key obstacle to effective cancer treatment in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Epigenomic alterations, particularly DNA methylation have been extensively studied for future diagnosis, prognosis and prediction of therapeutic response in a variety of cancers. However, the contribution of epigenetic changes to the development of chemo-radiotherapy resistance in OSCC remains to be elucidated. Herein, we investigated the relevance between clinical effect and epigenomic alterations in OSCC to develop the novel diagnostic methods based on epigenomic profile. DNA methylation frequencies were evaluated by quantitative methylation specific PCR (MSP) assay. MSP assay indicated that hypermethylation of MGMT, TFAP2E and DAPK1 was associated with pathological response to 5-FU based chemo-radiotherapy and overall survival. These results suggest that methylation status of these genes may provide the prediction of chemosensitivity and radiosensitivity in OSCC.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 エピゲノム DNAメチル化 ヒストン修飾 抗癌剤耐性 放射線耐性 エピジェネティクス治療薬

### 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%以上を口腔扁平上皮癌(OSCC)が占めている。近年、頭頸部癌の診断法の向上および分子標的治療薬を含めた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化学療法および放射線療法への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。それ故、癌の個性を把握し、分子レベルでの病態把握により、個別化された治療法の開発が不可欠となっている。その方法のひとつとして、エピゲノム異常の検出は新たな診断法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も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)。

癌に関連するエピゲノム異常のうち、DNA メチル化を網羅的に解析したメチローム解析は様々な癌において癌の病期診断、予後の予測および治療反応性の診断として注目されている。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)。また、大腸癌では転写因子である TFAP2E の DNA メチル化が 5-FU の薬剤感受性に関与することが報告されており(Ebert et al. *New Engl. J. Med.* 2012)、DNA メチル化は臨床的特徴を診断する有用な分子メカニズムと考えられる。しかしながら、OSCC ではこのような CIMP の報告は少なく、その臨床的背景との関連性は解析されておらず、薬剤感受性に関与した遺伝子のエピゲノム異常の報告もほとんどない。

研究代表者はこれまで、OSCC の細胞株や臨床検体を用いて、抗癌剤耐性に関連する DNA メチル化異常の解析を行ってきたが、癌の個性を捉えるには、更なるエピゲノム情報の解析が必要であり、メチローム解析から得られる DNA メチル化プロファイルに加え、ヒストン修飾プロファイル、さらには高次クロマチ

ン構造も含めた、総合的なエピゲノムプロファイルの確立が望まれる。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、OSCC の抗癌剤および放射線耐性に関連するエピゲノム異常を解明し、エピゲノムプロファイルに基づいた新たな診断法の開発と個別化治療の確立を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)抗癌剤耐性および放射線耐性 OSCC 細胞株におけるエピゲノムの異常の解析

(a)抗癌剤/放射線耐性に関与する DNA メチル化異常の解析

5-FU 耐性 OSCC 細胞株(Nagata et al. *Br. J. Cancer* 2011)、放射線耐性 OSCC 細胞株とその親株を用いて、DNA メチル化アレイ解析および次世代シーケンサーを用いた RSBB(Reduced representation of bisulfite sequence)法にてゲノムワイドでの DNA メチル化の解析を行った。

(b)抗癌剤/放射線耐性に関与する遺伝子の DNA メチル化状態と遺伝子発現解析

当所属分野では 5FU-耐性 OSCC 細胞株の遺伝子発現アレイ解析のデータを有していたため、放射性耐性 OSCC 細胞株においても親株と共に遺伝子発現アレイ解析を施行し、耐性株で発現が変化している遺伝子を抽出した。また、発現変化がある遺伝子の発現機構に関して DNA メチル化状態との関連性について解析した。

(c)抗癌剤/放射線耐性に関与するヒストン修飾状態の解析

OSCC 細胞株(SAS)を用いてゲノムワイドでのヒストン修飾状態を ChIP-seq 法にて解析した。対象とするヒストン修飾は活性化のマークであるヒストン H3 リジン 27 のアセチル化(H3K27Ac)とした。これらの解析結果と DNA メチル化の結果を踏まえ、耐性機構に関与してエピゲノム異常が生じている遺伝子の探索を行った。

(2)OSCC におけるエピゲノム・プロファイルとその臨床的意義の解析

OSCC 組織の解析として当所属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て DNA を抽出した。細胞株の解析から候補となる耐性関連遺伝子群を抽出し、プロモーター領域における DNA メチル化状態を定量的 MSP 法にて解析した。

解析結果を基に、臨床病理学的特徴と併せてその臨床的意義を解析した。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) エピジェネティクス治療薬によるエピゲノムの変化と抗癌剤感受性の検討  
DNA 脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine 及び新規エピゲノム治療薬として注目されているヒストンメチル化酵素阻害剤: EZH2 阻害薬 (DZNep) や BRD4 阻害薬 (JQ1) を用いて、細胞増殖能および 5-FU に対する抗癌剤感受性試験を行い、耐性改善薬として有用な薬剤の探索を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 抗癌剤/放射線耐性に関する DNA メチル化状態の変化

OSCC 細胞株 (SAS, Ca9-22) と 5-FU 耐性 OSCC 細胞株 (SAS/FR2, Ca9-22/FR2) を用いてゲノムワイドでの DNA メチル化状態の解析を行った。解析にはイルミナ社の DNA メチル化アレイ (Infinium Human Methylation 450 BeadChip) を用いた。また、SAS 細胞由来の放射線耐性 OSCC 細胞株は次世代シーケンサーを用い、RRBS (Reduced representation of bisulfite sequence) 法による網羅的 DNA メチル化解析を行った。結果として、5-FU 耐性 OSCC 細胞株および放射線耐性 OSCC 細胞株ともゲノムワイドで DNA メチル化状態が大きく変化していた。

(2) 抗癌剤/放射線耐性に関する遺伝子の DNA メチル化状態と遺伝子発現の変化

当所属分野では 5FU-耐性 OSCC 細胞株の遺伝子発現アレイ解析のデータを有していたため、放射性耐性 OSCC 細胞株においても親株と共に遺伝子発現アレイ解析を施行した。5-FU 耐性 OSCC 細胞株および放射線耐性 OSCC 細胞株で発現が低下している遺伝子と過去に DNA メチル化と薬剤耐性の報告がある遺伝子情報 (Heyn et al. *Nat. Rev. Genetics* 2012) より抗癌剤/放射線耐性に関する可能性のある候補遺伝子を抽出した。

(3) 抗癌剤/放射線耐性に関するヒストン修飾状態の変化

抗癌剤耐性および放射線耐性に関連するヒストン修飾状態を解析するために OSCC 細胞株 (SAS) を用いて ChIP-seq 法にて解析を行った。対象としたヒストン修飾は活性化のマークであるヒストン H3 リジン 27 のアセチル化 (H3K27Ac) とした。また、データベース (UCSC Genome Browser) を用いて、過去に報告されているヒストン修飾: ヒストン H3 リジン 4 のモノメチル化 (H3K4me1)、ヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3)、ヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) の解析を行った。上記で抽出した候補遺伝子群において遺伝子発現が低下している遺伝子に関しては活性化のマークが低下していた。

(4) OSCC 組織における DNA メチル化状態の変化

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細胞株の実験において抽出した遺伝子で以下の 7 つである。癌抑制遺伝子の CDKN2A、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、その他抗癌剤耐性との関連が報告されている SFN、SULF2 のプロモーター領域のメチル化の解析を行った。正常組織と癌組織それぞれ 20 検体より DNA を抽出し、バイサルファイト処理後に定量的 MSP 法にて DNA メチル化状態を比較したところ、MGMT、DAPK1、TFAP2E では癌組織において有意に高メチル化状態を示していた。

(5) DNA メチル化状態と術前の化学放射線療法の治療効果との関連

癌組織にて高メチル化状態であった MGMT、DAPK1、TFAP2E のメチル化状態と抗癌剤および放射線耐性の関連性を調べるために、術前の化学放射線療法の治療効果とそれぞれのメチル化状態を統計学的に解析を行った。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 例について解析したところ、MGMT のメチル化と治療効果との間に相関が見られ、MGMT の高メチル化症例は化学放射線療法の治療効果が有意に低い状態であった。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。

(6) DNA メチル化状態と予後との関連

上記の患者群を対象に 5 年生存率における解析を Kaplan-Meier 法にて行ったところ、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が得られた。また、MGMT および TFAP2E とも高メチル化されている症例においては有意に予後が不良であった。

(7) エピジェネティクス治療薬による抗腫瘍効果および抗癌剤感受性への影響

DNA 脱メチル化剤である 5-aza-dC をヒストンメチル化酵素阻害剤である DZNep、BRD4 阻害である JQ1 を用いて解析を行った。それぞれの阻害剤で OSCC 細胞株による細胞増殖の検討を行った結果、濃度依存的に細胞増殖が抑制された。さらに 5-aza-dC および JQ-1 を用いて、5-FU に対する抗癌剤感受性試験を行った結果、5-FU 耐性 OSCC 細胞株において抗癌剤耐性が緩和される結果が得られた。さらに、5-FU 耐性 OSCC 細胞株にて 5-aza-dC の処理後の DNA メチル化状態を MGMT、TFAP2E、DAPK1 について確認したところ、メチル化の低下が見られていた。

今回の研究結果より、5FU-耐性 OSCC 細胞株、放射線耐性 OSCC 耐性株においてはゲノムワイドでの DNA メチル化解析によって、ダイナミックに DNA メチル化状態が変化してい

ることが分かった。今後は、ヒストン修飾状態についても両細胞株を用いてゲノムワイドでの解析を行い、エピゲノムプロファイルの蓄積を行っていきたい。また、臨床検体を用いた DNA メチル化解析により MGMT、TFAP2E、DAPK1 の DNA メチル化は術前の化学放射線療法の治療効果との相関が見られ、OSCC の抗癌剤感受性や放射線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。エピゲノム治療薬における解析ではエピゲノム治療薬の処理にて細胞増殖抑制が認められ、また 5-FU に対する抗癌剤耐性への緩和が認められた。今後は放射線耐性への関連についてもさらに実験を進め、抗癌剤や放射線との併用での耐性改善や抗腫瘍効果への影響を解析していきたいと考えている。今回の解析結果に加え、今後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続け、OSCC の総合的なエピゲノム・プロファイルを確立し、エピゲノム・プロファイルに基づく新たな診断法の確立および個別化治療への応用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 7 件)

Nakashima H., Matsuoka Y., Yoshida R., Nagata M., Hirosue A., Kawahara K., Sakata J., Arita H., Hiraki A., Nakayama H.

Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study

BMC cancer 16:41-49, 2016 (査読有)  
DOI:10.1186/s12885-016-2079-6.

Kawahara K., Nakayama H., Fukuma D., Nagata M., Yoshida R., Tanaka T., Nakagawa Y., Hirosue A., Hiraki A., Takeda Y & Shinohara M.

A case of adenomatoid odontogenic tumor-like tumor, unusual benign odontogenic tumor in the maxilla.

J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol. 27:299-302, 2015 (査読有)

DOI:10.1016/j.ajoms.2014.05.001

Matsuoka Y., Yoshida R., Nakayama H., Nagata M., Hirosue A., Kawahara K., Nakagawa Y., Matsuoka Y., Sakata J., Arita H., Hiraki A. & Shinohara M.

The tumor stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma

APMIS. 123:205-214, 2015 (査読有)  
DOI: 10.1111/apm.12344. Epub 2014 Dec 31.

Yoshitake Y., Fukuma D., Yuno A., Hirayama M., Nakayama H., Tanaka T., Nagata M., Takamune Y., Kawahara K., Nakagawa Y., Yoshida R., Hirosue A., Ogi H., Hiraki A., Jono H., Hamada A., Yoshida K., Nishimura Y., Nakamura Y. & Shinohara, M.

Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS.

Clin. Cancer Res. 21:312-321, 2015 (査読有)

DOI: 0.1158/1078-0432.CCR-14-0202.

Epub 2014 Nov 12.

Yoshida R., Nakayama H., Nagata M., Hirosue A., Tanaka T., Kawahara K., Nakagawa Y., Matsuoka Y., Sakata J., Arita H., Hiraki A., Shinohara M. & Ito T.

Overexpression of nucleostemin contributes to an advanced malignant phenotype and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma.

Br. J. Cancer 111:2308-2315, 2014 (査読有)

DOI:10.1038/bjc.2014.539. Epub 2014 Oct 14.

Nakagawa Y., Nakayama H., Nagata M., Yoshida R., Hirosue A., Tanaka T., Kawahara

K., Matsuoka Y., Kojima T., 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. 44:1376-1384, 2014 (査読有)

doi: 10.3892/ijo.2014.2265. Epub 2014 Jan 21.

Kawahara K., Nakayama H., Nagata M., Yoshida R., Hirosue A., Tanaka T., Nakagawa Y., Matsuoka Y., Kojima T., 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. 43:350-356, 2014 (査読有)

DOI: 10.1111/jop.12140. Epub 2013 Dec 10.

〔学会発表〕(計 5 件)

Hirosue A., Nakamoto M., Yamamoto T.,  
Matsuoka Y., Nakamura C., Kawahara K.,  
Yoshida R., Hiraki A., Nakayama H.,  
Shinohara M.

Epigenetic alterations in  
chemoresistance and radioresistance  
of oral squamous cell carcinoma.  
22nd International conference on oral  
& maxillofacial surgery  
2015 年 10 月 27 日 ~ 30 日

メルボルン、オーストラリア

Sakata J., Hirosue A., Yoshida R.,  
Nagata M., Matsuoka Y., Arita H.,  
Kawahara K., Nakagawa Y., Hiraki A.,  
Shinohara M., Nakayama H.

Increased expression of HMGA2  
predicts metastasis and poor  
prognosis in oral squamous cell  
carcinoma.

第 74 回日本癌学会総会

2015 年 10 月 08 日 ~ 11 日

名古屋国際会議場、愛知

Sakata J., Hirosue A., Yoshida R.,  
Nagata M., Matsuoka Y., Arita H.,  
Kawahara K., Nakagawa Y., Hiraki A.,  
Shinohara M., Nakayama H.

The Clinicopathological analysis of  
HMGA2 in oral squamous cell carcinoma.

第 39 回日本頭頸部癌学会、第 4 回アジ  
ア頭頸部癌学会

2015 年 6 月 4 日 ~ 6 日

神戸国際会議場、兵庫

Hirosue A., Nakamoto M., Nakamura C.,  
Kawahara K., Muta A., Ochi K.,  
Yoshida R., Nagata M.,  
Nakayama H., Hiraki A., Shinohara M.

Epigenetic alterations in  
drugresistance of oral squamous cell  
carcinoma.

96th Annual Meeting, Scientific  
Sessions & Exhibition in conjunction  
with the Japanese Society and Korean  
Association of Oral and  
Maxillofacial Surgeons

2014 年 09 月 08 日 ~ 13 日

Hawaii Convention Center, Hawaii

Sakata J., Hirosue A., Yoshida R.,  
Nakamoto M., Matsuoka Y., Arita H.,  
Kawahara K., Nakagawa Y., Nagata M.,  
Nakayama H., Hiraki A., Shinohara M.

The Clinicopathological analysis of  
HMGA2 in oral squamous cell carcinoma.

第 73 回日本癌学会総会

2015 年 9 月 25 日 ~ 27 日

パシフィコ横浜、神奈川

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00638182

## 6. 研究組織

研究代表者

廣末 晃之 (HIROSUE Akiyuki)