

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0334

研究課題名（和文）患者由来腫瘍異種移植片モデルを用いた腺様嚢胞癌の進展機序の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Molecular elucidation of tumor progression of adenoid cystic carcinoma(Fostering Joint International Research)

研究代表者

安藤 瑞生（Ando, Mizuo）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60511467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間：15ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は基課題を発展させ、発癌関連遺伝子の転写調節を明らかにすることを目指し、腺様嚢胞癌に加えて扁平上皮癌を対象とした。特にヒトパピローマウイルス（HPV）によって引き起こされるHPV関連中咽頭癌は、患者数の増加が著しく、比較的若年者に生じることから、その克服が大きな課題となっている。本研究では腺様嚢胞癌とHPV関連中咽頭癌とを比較し、癌ゲノムにみられる遺伝子異常、エピゲノム異常の全体像を解明し、エピゲノム異常の標的が遺伝子転写開始点にあることを明らかにした。また、HPV関連中咽頭癌の中に、DNAメチル化が高度に生じる症例群を見出し、この群に特徴的なMyc経路の活性化があることも解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV関連中咽頭癌の腫瘍組織は正常組織とは異なるDNAメチル化状態を示し、従来注目されてきた遺伝子の調節領域である「プロモーター領域」よりも、むしろ「転写開始点」におけるDNAメチル化状態の変化が遺伝子発現と強く関連していることを突き止めた。この結果は、発癌に繋がるエピゲノム異常の解明において、転写開始点への注目を促す画期的な発見である。また、Mycによるエピゲノム調節機構は過去の基礎的研究でも報告されていたが、実際のHPV関連中咽頭癌において示された初めての報告となる。これらの成果は、HPV関連中咽頭癌の病態解明に貢献し、治療の最適化の実現に役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）： Although DNA methylation at promoter-associated CpG islands is well known to be correlated with gene repression, genome-wide studies utilizing massively parallel sequencing have described a role for DNA methylation outside these well-described CpG sites and thus expanded the focus of epigenetically mediated transcriptional regulation to much larger regions of interest.

Here we describe a tumor-specific shift in association of transcriptional repression from DNA methylation at conventional promoter regions in normal tissue, to cancer-specific transcriptional repression associated with broad repressive chromatin marks and DNA methylation at transcriptional start sites (TSSs) regardless of CpG island presence. These findings are complemented by identification of a hypermethylation phenotype in HPV-related oropharyngeal cancer, characterized by MYC pathway activation.

研究分野：癌ゲノム

キーワード：エピゲノム 腺様嚢胞癌 扁平上皮癌 転写開始点

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の基課題は、頭頸部癌患者に由来する腫瘍異種移植片 PDX (Patient-Derived Xenograft) を有する疾患動物モデルを活用し、唾液腺腺様嚢胞癌の特徴的な進展機序を解明することを目的とした。腺様嚢胞癌は遺伝子変異の少ない癌腫であるため、ゲノム DNA 配列の異常だけではなく、発癌関連遺伝子の転写調節機構を解明することが必要と考えられた。

### 2. 研究の目的

今回の国際共同研究では、がんゲノムからの転写調節の基礎を明らかにするため、ゲノム・エピゲノム・RNA の異常を網羅的に検索することとした。対象として、腺様嚢胞癌に加え、ヒトパピローマウイルス (HPV; Human Papillomavirus) 関連中咽頭扁平上皮癌を選択した。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトの腺様嚢胞癌および HPV 関連中咽頭癌に由来する癌組織および正常組織を用いて、Exome-seq による遺伝子変異解析、RNA-seq による遺伝子発現解析、MBD-seq による DNA メチル化解析、さらにヒストン修飾解析のためクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) のデータ解析を行った。患者由来の原発腫瘍塊をマウスに直接移植する PDX モデルから得られた腫瘍組織を解析に使用した。

(2) 網羅的シーケンスにより得られたデータを加工し、遺伝子プロモーター領域や転写開始点 (TSS; Transcription Start Site) のエピゲノム変化と遺伝子発現量とに注目してデータ解析を行った。In-house アルゴリズムの他、GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) や GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool) などの既存アルゴリズムを用いた解析を実施した。

(3) 上記の Discovery (探索的) コホートで得られた結果を検証するため、Validation (検証的) コホートとして TCGA (The Cancer Genome Atlas) などの公共データベースを用いた検証実験、および細胞株を用いて分子生物学的手法による検証実験を実施した。

### 4. 研究成果

以上の研究により、HPV 関連中咽頭癌の腫瘍組織とは異なる DNA メチル化状態を示し、従来注目されてきた遺伝子の調節領域である「プロモーター領域(注)」よりも、むしろ「転写開始点」における DNA メチル化状態の変化が遺伝子発現と強く関連していることを突き止めた(図1)。TCGA データベースを用いた検証実験により、中咽頭癌だけでなく乳癌においても、転写開始点における DNA メチル化状態の変化がより重要であることが示唆された。また、抑制性のヒストン修飾 (H3K9me3) が転写開始点において DNA メチル化と協調的にはたらいっている可能性も示された。これらの結果は、発癌に繋がるエピゲノム異常の解明において、転写開始点への注目を促す画期的な発見である。しかし腺様嚢胞癌ではこれらの知見は明らかでなく、癌腫による差を反映していると考えられた。

続いて、DNA メチル化状態を指標にして HPV 関連中咽頭癌症例を解析した結果、高メチル化腫瘍に分類される一群が存在することを同定した(図2)。高メチル化腫瘍群では、Myc 経路の活性化が見られ(図3)、この事実は細胞株を用いた分子生物学の実験によって裏付けられた。過去の基礎的研究で Myc によるエピゲノムの調節機構が報告されていたが、実際の HPV 関連中咽頭癌において示された初めての報告となる。

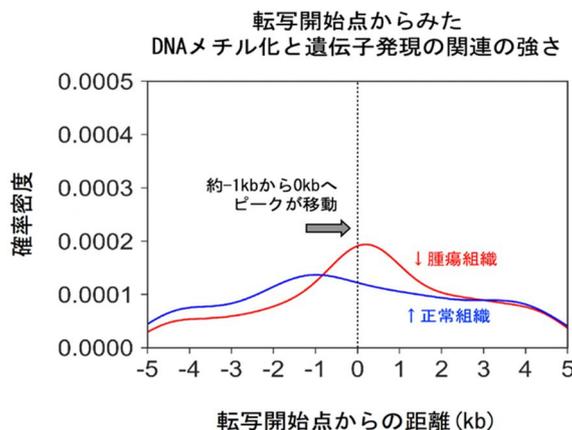


図1. DNA メチル化状態の変化が遺伝子発現に関連するゲノム上の位置を、約 2 万遺伝子の総和として転写開始点からの距離で示している。青で示す正常組織では転写開始点よりも約 1kb 上流 (遺伝子プロモーター領域) にピークがあるのに対し、赤で示す腫瘍組織のピークは 0kb (転写開始点) にほぼ一致している。

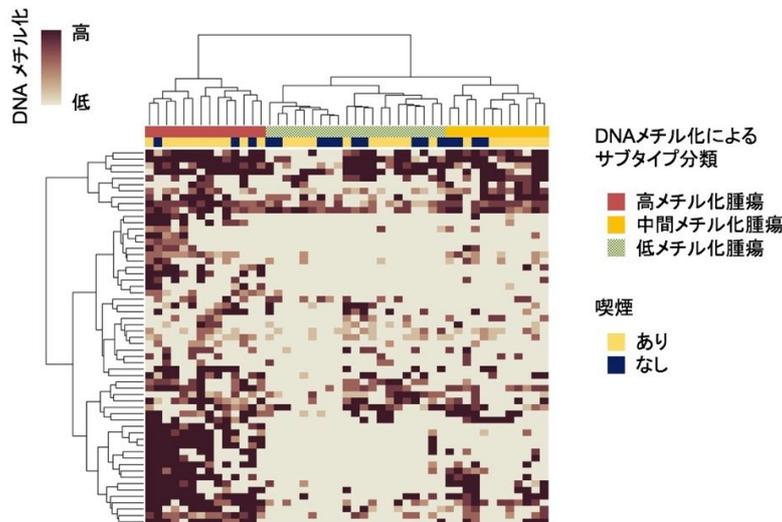


図2. HPV 関連中咽頭癌の Discovery (探索的) コホート 47 症例を、DNA メチル化状態を指標としてクラスタリング解析した。左端の 14 症例が高メチル化腫瘍と分類される。

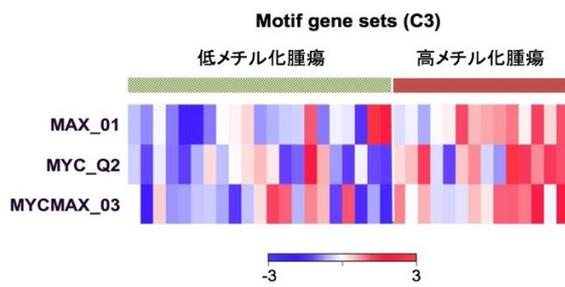


図3. 高メチル化腫瘍と低メチル化腫瘍の遺伝子発現の差を解析した。右側の高メチル化腫瘍では、Myc 経路が活性化している (赤色で示す) ことが示唆された (Myc は Max と複合体を形成してはたらく)。この結果は、細胞株を用いた分子生物学的実験によって裏付けられた。

当初、本研究は腺様嚢胞癌を主な研究対象とした。腺様嚢胞癌は癌関連遺伝子変異などのゲノム異常が少ない癌腫であるため、DNA メチル化などのエピゲノム異常に富むであろうと仮定し、同様にゲノム異常が少ないことが知られている HPV 関連中咽頭癌と比較しながら研究を進めた。結果として、後者の癌腫における知見が主な研究成果となった。

HPV 関連中咽頭癌は、同じウイルスを原因とする子宮頸癌よりも近年の患者数増加が著しく、比較的若年者に生じることから、その制圧が世界的な課題となっている。本研究の成果により HPV 関連中咽頭癌のゲノム・エピゲノムの全体像が明らかとなり、HPV 関連中咽頭がんの病態解明に大きな進展をもたらした。今後、治療最適化の実現にも役立つものと期待される。

注) プロモーター領域：転写 (DNA から RNA を合成する段階) に関与し、遺伝子発現のタイミングや発現量の制御に重要な役割をもつ領域。実際に転写が始まる位置を転写開始点と呼ぶ。プロモーター領域は転写開始点のやや上流に位置し、ここに転写因子というタンパクが結合して転写が始まる。

#### <引用文献>

Ando M, Saito Y, Xu G, et al. Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in human cancers. Nat Commun. 2019;10:2188

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ren Shuling, Gaykalova Daria, Wang Jennifer, Guo Theresa, Danilova Ludmila, Favorov Alexander, Fertig Elana, Bishop Justin, Khan Zubair, Flam Emily, Wysocki Piotr T., DeJong Peter, Ando Mizuo, Liu Chao, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Haft Sunny, Sadat Sayed, Califano Joseph A.	4. 巻 143
2. 論文標題 Discovery and development of differentially methylated regions in human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2425 ~ 2436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Liu Chao, Guo Theresa, Xu Guorong, Sakai Akihiro, Ren Shuling, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Sadat Sayed, Saito Yuki, Khan Zubair, Fisch Kathleen M., Califano Joseph	4. 巻 24
2. 論文標題 Characterization of Alternative Splicing Events in HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Identifies an Oncogenic DOCK5 Variant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5123-5132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-0752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukusumi Takahito, Guo Theresa W., Sakai Akihiro, Ando Mizuo, Ren Shuling, Haft Sunny, Liu Chao, Amornphimoltham Panomwat, Gutkind J. Silvio, Califano Joseph A.	4. 巻 24
2. 論文標題 The NOTCH4-HEY1 Pathway Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 619 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-17-1366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ando M, Saito Y, Xu G, Bui NQ, Medetgul-Ernar K, Pu M, Fisch K, Ren S, Sakai A, Fukusumi T, Liu C, Haft S, Pang J, Mark A, Gaykalova DA, Guo T, Favorov AV, Yegnasubramanian S, Fertig EJ, Ha P, Tamayo P, Yamasoba T, Ideker T, Messer K, Califano JA.	4. 巻 10
2. 論文標題 Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09937-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu Chao, Guo Theresa, Sakai Akihiro, Ren Shuling, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Sadat Sayed, Saito Yuki, Califano Joseph A.	4. 巻 126
2. 論文標題 A novel splice variant of LOXL2 promotes progression of human papillomavirus?negative head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 737 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.32610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Saito Yuki, Favorov Alexander V., Forman Michael, Ren Shuling, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Liu Chao, Sadat Sayed, Ando Mizuo, Xu Guorong, Khan Zubair, Pang John, Valsamakis Alex, Fisch Kathleen M., Califano Joseph A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Rational genomic optimization of DNA detection for human papillomavirus type 16 in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Head & Neck	6. 最初と最後の頁 688 ~ 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.26041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Haft Sunny, Ren Shuling, Xu Guorong, Mark Adam, Fisch Kathleen, Guo Theresa W., Khan Zubair, Pang John, Ando Mizuo, Liu Chao, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Califano Joseph A.	4. 巻 125
2. 論文標題 Mutation of chromatin regulators and focal hotspot alterations characterize human papillomavirus?positive oropharyngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 2423 ~ 2434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.32068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安藤瑞生、齊藤祐毅、山岨達也、Joseph A Califano
2. 発表標題 HPV関連中咽頭癌のエピゲノム解析：高DNAメチル化腫瘍の同定
3. 学会等名 第42回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤 瑞生、齊藤 祐毅、山嵜 達也
2. 発表標題 HPV関連中咽頭癌のエピゲノム:DNAメチル化およびヒストン修飾のゲノムワイド解析
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤瑞生
2. 発表標題 シンポジウム「トランスレーショナルリサーチはどう進んでいるか」:頭頸部癌クリニカルシーケンスの経験とゲノム医療時代の展望
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カリファノ ジョセフ  (Califano Joseph)	カリフォルニア大学サンディエゴ校・Moores Cancer Center・Director	
その他の研究協力者	メッサー カレン  (Messer Karen)	カリフォルニア大学サンディエゴ校・Moores Cancer Center・Professor	