

令和元年6月6日現在

機関番号：17102
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K11256
研究課題名(和文) 頭頸部癌幹細胞の多分化能獲得におけるnon-coding RNAの役割

研究課題名(英文) Epigenetic reprogramming in head and neck cancer

研究代表者

若崎 高裕 (Wakasaki, Takahiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10608871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の臨床検体で癌幹細胞が多く存在する癌先進部において、YAP1とSOX2の核内同時発現が顕著であった。これにCD44v7を加えた、免疫染色での三重共発現は予後不良因子であることを示した。さらに、頭頸部扁平上皮癌において、ストレス誘発性のYAP1の活性化がSOX2と協調し、エピジェネティックリプログラミングを介してステムネスの獲得に寄与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮癌における発癌進展に寄与すると考えられる分子に関して臨床検体での予後と関連するデータ及び、基礎実験においてその分子の作用機序の一部を解明した。頭頸部扁平上皮癌先進部における、SOX2、YAP1、CD44v7の免疫染色のtriple positiveは、予後と相関しており、実臨床においても予後予想因子として有用であると考えられる。また、in vitro実験及びTCGAデータ解析結果から、SOX2、YAP1、KLF7は、今後治療ターゲットとなる可能性を秘めていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The nuclear co-expression of YAP1 and SOX2 was remarkable in invasive front areas where many cancer stem cells are present in clinical specimens of oral squamous cell carcinoma. To these, CD44v7 was added, and triple co-expression by immunostaining was shown to be a prognostic factor. In head and neck squamous cell carcinoma, it was shown that stress-induced activation of YAP1 cooperates with SOX2 and contributes to the acquisition of stemness through epigenetic reprogramming.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 エピジェネティック 癌幹細胞 SOX2 YAP1 CD44v7

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学放射線療法や再建手術などの、集学的な治療法が進歩した現在でも、進行頭頸部扁平上皮癌治療の中心は手術であり、進行頭頸部扁平上皮癌の予後及び QOL は、ここ 20 年間大きな改善を見ていない。頭頸部扁平上皮癌の分子生物学的特性に基づいた新たな治療法の開発が求められている。近年の分子生物学的観点からは、癌幹細胞 (CSC) が固形癌の予後を不良とする因子として注目されているが、頭頸部扁平上皮癌の CSC 維持誘導のメカニズムは明らかになっておらず、その解明は頭頸部治療に新たな進展をもたらす可能性を秘めている。最近の whole-exome sequence 研究 (Science 2011) 及び TCGA (The Cancer Genome Atlas, Nature 2015) のパブリックデータにより、頭頸部扁平上皮癌には優位な癌遺伝子の gain-of-function mutation が無いことが明らかになった。さらに、癌の発生・進化には epigenetic な機構が大きく関与する事も明らかになっている。頭頸部扁平上皮癌は周囲環境からのストレスに反応し、epigenetic に malignant reprogramming しながら、適応・進化する複雑適応系 (complex adaptive system) であり、その進化の向かう方向は、過酷な環境下での生存を可能とする多分化能 (pluripotency) を獲得した CSC への reprogramming であると考えている。過去の報告により、Sox2 は頭頸部扁平上皮癌幹細胞化に必要な有力な遺伝子と考えられている。また、YAP1 活性化は、頭頸部扁平上皮癌において増殖性再生表現型ならびに予後不良と相関することが報告されている。頭頸部癌における Sox2 および YAP1 の相互作用は解明されていない。

2. 研究の目的

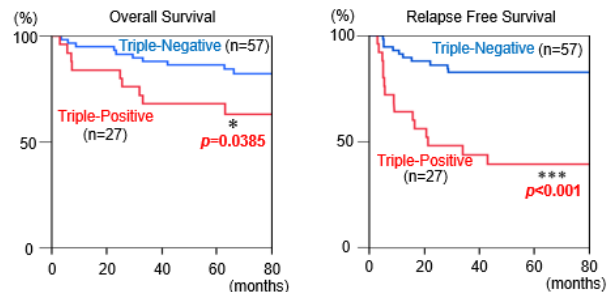
頭頸部扁平上皮癌治療の最大の抵抗因子である、CSC 多分化能獲得メカニズムを epigenetic な視点から解析すること。頭頸部扁平上皮癌において、Epigenetic に活性化された Yap1 は Sox2 と強調し、癌細胞の幹細胞性の獲得に寄与すると仮定し、それを証明すること。

3. 研究の方法

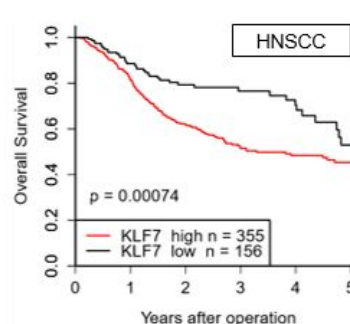
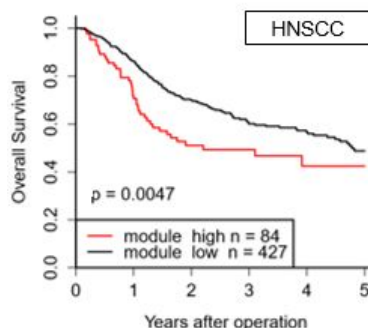
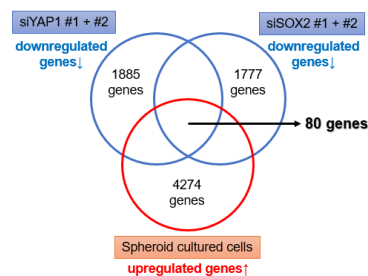
免疫組織化学染色を用いて、口腔癌の臨床検体における癌浸潤先進部で、CD44v9 (頭頸部扁平上皮癌 CSC マーカー)、SOX2 および YAP1 の発現を調べ、臨床データとの比較を行った。さらに、頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、SOX2 および YAP1 の siRNA 細胞株 および sphere アッセイによって得られた細胞株それぞれの発現解析 (マイクロアレイ解析) を行い、TCGA データベースを利用して、CSC 誘導に必要な遺伝子群の pick-up を行った。その遺伝子群から選定した KLF7、YAP1、SOX2 の解析を、in vitro で行った。

4. 研究成果

1) 臨床検体において癌先進部において YAP1 と SOX2 の核内同時発現が顕著であった。SOX2、YAP1 および CD44v9 (頭頸部扁平上皮癌の CSC マーカー) の三重過剰発現 (YAP1-high, SOX2-high, and CD44v9-positive) は予後不良と有意に関連することを示した (右図)。



2) 主な in vitro 実験は、HSC4 (口腔癌細胞株) を用いて行った。SOX2 および YAP1 それぞれのノックダウン細胞株および sphere assay において得られた細胞株の発現解析を行い、有意な変化をきたした共通の遺伝子群を検討した (右図)。これらの候補遺伝子がステムネスの誘導において役割を果たすことを検証するために、DAVID platform を使用して遺伝子オンロジーアッセイを実施した。Sphere forming assay などにより 7 遺伝子 (MMP1, MMP10, SLC02A1, SERPINB2, LEMD1, KLF7, DDX60) 選別した。511 例の頭頸部扁平上皮癌から得られた TCGA RNA 配列データを用いて解析すると、これらの遺伝子群の高発現のグループは有意に予後不良を示し (p = 0.0047) (左図)、EMT (FDR q 値 = 0.216) および血管新生 (FDR q

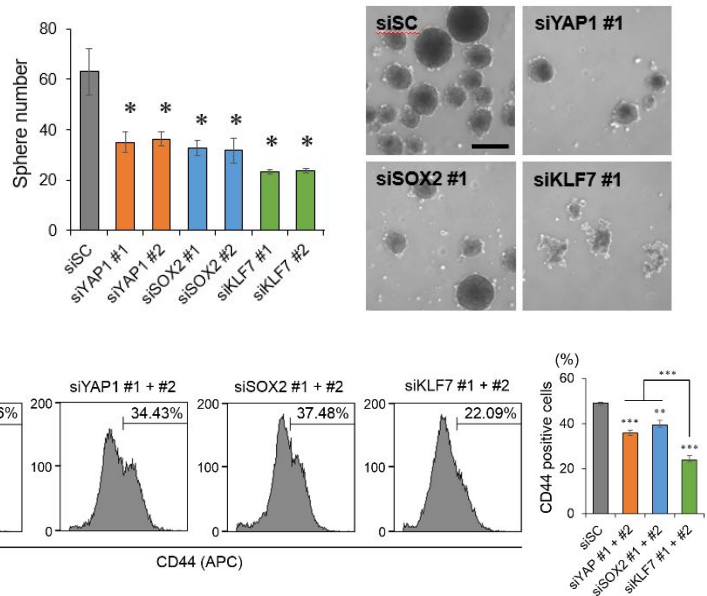


値= 0.225) に有意に関連する発現パターンを示した。

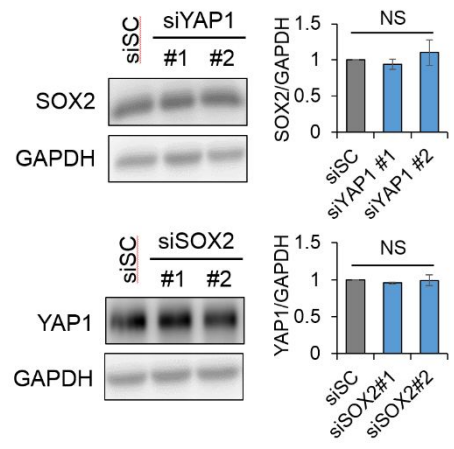
KLF family 転写因子である KLF7 発現と予後の相関あることを、同じ手法で調査して、これもまた予後不良因子であることを見出した ($p = 0.00074$) (前頁右図)。これらの結果は、YAP1 / SOX2 標的遺伝子群 (例えば K L F 7) が腫瘍の進行および癌細胞におけるステムネスの誘導を促進する可能性があることを示している

3) SOX2, YAP1, KLF7 のノックダウン細胞株を用いて、Sphere forming assay を行った。

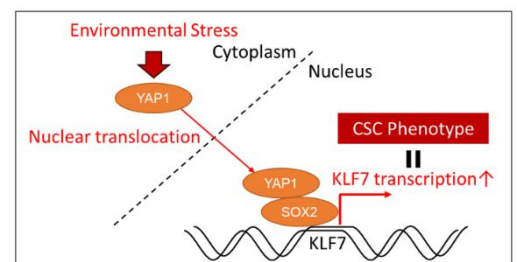
SOX2, YAP1, KLF7 はそれぞれ、sphere 形成および癌幹細胞増殖を促進させることを示した (右図)。統計的有意性はなかったが、siKLF7 は、siYAP1 および siSOX2 と比較して、球体形成に対してより顕著な阻害効果を示した。さらに、KLF7 阻害は、HSC4 細胞における CD44 陽性 CSC 集団を著しく減少させた (右図)。これらの結果は、YAP1/SOX2 共通標的遺伝子の 1 つである KLF7 が、エフェクター分子としてのステムネスの誘導において実質的な役割を果たすことを示唆している。



さらに、siRNA アッセイを用いて、SOX2 に対する YAP1 のサイレンシングの影響、およびその逆の影響を調べた。以前の研究とは異なり、SOX2 と YAP1 はそれぞれお互いの下流でタンパク発現量の変化に影響しなかった (右図)。この結果は、siRNA アッセイによって得られた先述のマイクロアレイデータにおいても確認した。さらに、sphere 形成は YAP1 および SOX2 の mRNA 発現レベルを変化させなかったことも確認した。次に spheroid 形成時に YAP1 の核内移行が顕著化することを蛍光免疫染色で示した。さらに、データベース解析により、KLF7 の制御領域に SOX2 の結合配列があることを検出した。これらの結果は、ストレス誘発性 YAP1 核内移行は SOX2 を活性化し、ステムネスの獲得のための頭頸部扁平上皮癌のエピジェネティック機構を促進することを示唆するものだった (右下図)。



頭頸部扁平上皮癌においてストレス環境下における YAP1 の核内移行による活性化が、SOX2 の活性化を伴い、下流にある KLF7 を介して幹細胞性質の獲得を得ることが示唆された。頭頸部扁平上皮癌はこれらのエピジェネティック機構を介して、癌の進展に寄与すると考えられた。この内容は、現在英語論文投稿中である。



5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計3件)

1: Wakasaki T, Yasumatsu R, Masuda M, Matsuo M, Tamae A, Kubo K, Kogo R, Uchi R, Taura M, Nakagawa T. Small Cell Carcinoma in the Head and Neck. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2019 Jun 4:3489419853601. doi: 10.1177/0003489419853601. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31161776.

2: Wakasaki T, Yasumatsu R, Uchi R, Taura M, Matsuo M, Komune N, Nakagawa T. Outcome of chemotherapy following nivolumab treatment for recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. Auris Nasus Larynx. 2019 May 22. pii: S0385-8146(18)31048-4. doi: 10.1016/j.anl.2019.05.001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31128940.

3: Wakasaki T, Kiyohara H, Omori H, Nishi K, Taguchi K, Rikimaru F, Toh S, Higaki Y, Masuda M. Massive internal jugular vein tumor thrombus derived from squamous cell carcinoma of the head and neck: two case reports. Oral Maxillofac Surg. 2017 Mar;21(1):69-74. doi: 10.1007/s10006-016-0600-3. Epub 2016 Nov 24. PubMed PMID: 27885568.

〔学会発表〕(計6件)

頭頸部領域の再発/遠隔転移 扁平上皮癌に対する iCi 投与後化学療法の治療効果 頭頸部外科学会 2019.1

Outcome of Second-Line Combined Palliative Chemotherapy of Weekly Paclitaxel and Cetuximab for Patients with Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Cancer after Platinum, 5-Fluorouracil, and Cetuximab Therapy AAOHNSF 2018.9

軟口蓋腫瘍切除後の口蓋全層欠損に対し硬口蓋粘骨膜弁及び鼻中隔粘膜弁で再建した一例 2018.9

当院における涙嚢部腫瘍 頭頸部扁平上皮癌学会 2018.6

当科における中咽頭癌の治療成績の解析～AJCC8th 分類を勘案した後方視的解析～ 頭頸部外科学会 2018.1

同時性食道扁平上皮癌・咽頭喉頭扁平上皮癌の治療戦略 九州がんセンター案 2017.6

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：益田 宗幸

ローマ字氏名：Masuda Muneyuki

研究協力者氏名：大森 裕文

ローマ字氏名：Omori Hirofumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。