

平成30年6月8日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15824

研究課題名(和文) 超高悪性口腔腫瘍のゲノム・エピゲノム解析

研究課題名(英文) Genomic and epigenome analysis for high-grade malignant oral tumor

研究代表者

中城 公一 (Nakashiro, Koichi)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90314880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性口腔腫瘍には治療後直ちに局所再発あるいは転移を来し、放射線や化学療法にも抵抗性を示し予後不良となる症例が存在する。そこで、本研究ではこのような症例よりゲノム DNA および total RNA を抽出し、ゲノム・エピゲノム解析を試みた。まず、ゲノム DNA を用いて腫瘍遺伝子変異解析を行ったところ、TP53、PIK3CA、HRAS の変異が検出された。つづいて、total RNA を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、上皮間葉移行を制御する遺伝子群の発現異常が認められた。これらの分子は難治性悪性口腔腫瘍に対する有用な治療標的となる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Malignant oral tumors have local recurrence or metastasis immediately after treatment, and also have resistance to radiation and chemotherapy, which leads to poor prognosis. In this study, genomic DNA and total RNA were extracted from such cases and genomic/epigenome analysis was attempted. Firstly, when tumor gene mutation analysis was performed using genomic DNA, somatic mutations of TP53, PIK3CA, and HRAS were detected. Subsequently, gene expression analysis by microarray was performed using total RNA. As a result, abnormal expression of the genes involved in epithelial mesenchymal transition was observed. These molecules have the potential to be useful therapeutic targets for refractory malignant oral tumors.

研究分野：口腔外科学

キーワード：悪性口腔腫瘍 腫瘍遺伝子変異 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

2002年にマウス骨肉腫のモデルで単一の癌遺伝子 (Myc) を一時的に発現抑制するのみで、腫瘍細胞の骨芽細胞への分化誘導による骨肉腫の治癒が観察され、癌遺伝子への依存が癌のアキレス腱となることが示された。さらに、ヒト悪性腫瘍においても単一あるいは複数の癌遺伝子 (HER2, EGFR, BCR-ABL, KIT 等) を分子標的とした薬剤 (Trastuzumab, Gefitinib, Imatinib 等) が抗腫瘍分子標的薬として承認され、現在も治療に用いられている。以上の結果は、悪性腫瘍の治療の成功には個々の症例に応じて適切な遺伝子を分子標的にすることが重要であることを示唆している。個々の腫瘍の増殖、浸潤、転移において重要な機能を担っている分子すなわちドライバー遺伝子およびその分子ネットワークを同定し、それらを分子標的とすることにより治癒あるいは悪性腫瘍との共存が期待できる。さらに、2011年には口腔を含む頭頸部扁平上皮癌の悪性形質を支持する遺伝子変異が次世代シーケンサーによるエキソーム解析により明らかにされた。また、2013年には頭頸部癌を含むヒト悪性腫瘍 (臓器別 12 種類) の遺伝子変異が報告された。このように、種々の悪性腫瘍の原発巣における遺伝子変異カタログを完成させることは極めて重要なことである。なぜなら、腫瘍間の多様性を把握できる上にこれら変異遺伝子を標的とした創薬に有用となるからである。

2. 研究の目的

急速な進行あるいは再発転移により初診時より 6 か月以内に原病死となった悪性口腔腫瘍症例 (超高悪性口腔腫瘍症例) の腫瘍および正常組織からそれぞれゲノム DNA および total RNA を抽出し、次世代シーケンサーおよびマイクロアレイを用いて腫瘍特異的な突然変異遺伝子や発現異常遺伝子を同定する。すなわち、超高

悪性口腔腫瘍の診断マーカーおよびドライバー遺伝子候補を同定する。

さらに、超高悪性口腔腫瘍症例より初代培養した腫瘍細胞を用いて同定されたドライバー遺伝子候補の機能および治療標的としての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 超高悪性口腔腫瘍のゲノム・エピゲノム解析

対象患者の生検および手術標本の一部から腫瘍および正常組織を採取し、それぞれ TissueLyser (キアゲン) にてホモジナイズしたのちに、ゲノム DNA は DNeasy Blood and Tissue Kit (キアゲン)、total RNA は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて抽出した。まず、抽出したゲノム DNA (225 ng) から HaloPlex Cancer Panel (アジレント) を用いてターゲットエンリッチアンプリコンライブラリーを作製し、つづいてデスクトップ型次世代シーケンサーMiSeq (イルミナ) にてウルトラディープシーケンシングを行った。得られたシーケンスデータをアジレント社から無償提供されている変異解析ソフトウェア SureCall を用いて変異を検出した。正常組織由来ゲノム DNA からは検出されず、腫瘍組織由来のゲノム DNA においてのみ検出される体細胞変異を腫瘍特異的遺伝子変異とした。

次に、total RNA を用いてマイクロアレイ (GeneAtlas、アフィメトリックス) による網羅的遺伝子発現解析を行い、mRNA (Human Genome U219 Array Strip) および microRNA (GeneChip™ miRNA 4.1 Array Strip) それぞれの発現プロファイリングデータを取得した。これらデータを遺伝子発現解析ソフトウェア GeneSpring GX (アジレント) を用いて分析することにより、腫瘍特異的に発現変

動する mRNA および microRNA を同定した。

(2) 超高悪性口腔腫瘍の治療に有用となる標的分子の探索

超高悪性口腔腫瘍症例由来の初代培養腫瘍細胞よりゲノム DNA を抽出し、組織と同様の遺伝子変異を有することを次世代シーケンサーを用いて確認した。つづいて、初代培養腫瘍細胞 (5,000 個/ウェル) に異常を有する遺伝子に対する合成 small interfering RNA (siRNA) を 10 nM の濃度で Lipofectamine RNAiMAX を用いてリバーストランスフェクションし、96 ウェルプレートにて 72 時間培養した。培養終了後、WST-8 assay にて細胞数を定量し導入した合成 siRNA の細胞増殖に及ぼす影響を評価した。また同時に、合成 siRNA 導入細胞より蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング法にて合成 siRNA の RNA 干渉効果を確認した。著明な細胞増殖抑制効果を示した合成 siRNA の標的遺伝子については治療標的としての有用性が高いと評価し、各症例のドライバー遺伝子とした。次に、ドライバー遺伝子およびその分子ネットワークの機能や活性を阻害する低分子化合物の各腫瘍細胞の増殖に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。

4. 研究成果

口腔扁平上皮癌には根治切除が行えたにもかかわらず局所再発あるいは転移を来し、さらには放射線や化学療法にも抵抗性を示し予後不良となる症例が存在する。口腔扁平上皮癌の治療成績の向上にはこのような症例の制御が必須となる。そこで、本研究では超高悪性度症例由来の初代培養腫瘍細胞を用いて治療法の探索を試みた。根治切除が行えたにもかかわらず初診時よりわずか約 3 か月で全身転移により死に至った下顎歯

肉扁平上皮癌患者の原発、リンパ節転移、肺転移腫瘍組織からそれぞれ初代培養を行った。これらの組織および細胞からゲノム DNA を抽出し、ターゲットディープシーケンシングによる腫瘍遺伝子変異解析を行ったところ、腫瘍組織および全ての細胞から TP53、PIK3CA、転移巣由来細胞からはさらに HRAS の変異が検出された。

次に、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析では、原発および転移巣由来細胞間に 809 種類の mRNA、17 種類の microRNA の著明な発現変動が認められた。その中には、上皮間葉転換 (EMT) に関与することが知られている miR-200 family の発現抑制とその標的遺伝子である ZEB1、ZEB2 の発現亢進が含まれていた。実際に、転移巣由来細胞では細胞間接合が减弱し、線維芽細胞様の形態を呈していた。

つづいて、腫瘍遺伝子変異に基づいた分子標的治療の有用性を検討するために PIK3CA および HRAS に対する合成 siRNA を初代培養腫瘍細胞に導入したところ有意な細胞増殖抑制を認めた。また、Akt および ERK1/2 のリン酸化も著明に抑制されていた。さらに、PI3K/mTOR 阻害剤である BEZ-235 および MEK1/2 阻害剤である Trametinib の初代培養腫瘍細胞の増殖に及ぼす影響について検討した。両剤とも全ての細胞に対して有意な増殖抑制効果を示したが、特に BEZ-235 の効果が顕著であった。また、転移巣由来細胞に対しては両剤の併用効果が認められた。さらに、BEZ235、Trametinib はそれぞれの標的の下流分子のリン酸化をほぼ完全に抑制していた。

以上の結果より、超高悪性度口腔腫瘍症例においてその初代培養腫瘍細胞が適切な分子標的薬の選択に有用となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Goda H, Okamoto M, Nakashiro K, Hino S, Murase R, Hamakawa H. Prognostic impact of preoperative serum interleukin-6 levels in patients with early-stage oral squamous cell carcinoma, defined by sentinel node biopsy. *Oncol Lett* 14:7965-7969, 2017. doi: 10.3892/ol.2017.7183.

Sakaue T, Sakakibara I, Uesugi T, Fujisaki A, Nakashiro K, Hamakawa H, Kubota E, Joh T, Imai YK, Izutani H, Higashiyama S. The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells. *Sci Rep* 7:42845,2017. doi: 10.1038/srep42845.

Fukuda S, Nishida-Fukuda H, Nanba D, Nakashiro K, Nakayama H, Kubota H, Higashiyama S. Reversible interconversion and maintenance of mammary epithelial cell characteristics by the ligand-regulated EGFR system. *Sci Rep* 6: 20209,2016. doi: 10.1038/srep20209.

Oka R, Nakashiro K, Goda H, Iwamoto K, Tokuzen N, Hamakawa H. Annexin A8 is a novel molecular marker for detecting lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7:4882-4889,2016. doi: 10.18632/oncotarget.6639.

Tokuzen N, Nakashiro K, Tanaka H, Iwamoto K, Hamakawa H. Therapeutic potential of targeting cell division cycle associated 5 for oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7:2343-2353,2016. doi: 10.18632/oncotarget.6148.

[学会発表](計4件)

中城公一、浜川裕之、高悪性度口腔扁平上皮癌の治療を考える、第53回日本口腔組織培養学会学術大会、2016年

徳善紀彦、中城公一、浜川裕之、ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対するPI3K/mTOR阻

害剤BEZ235とMEK阻害剤Trametinibの併用効果、第53回日本口腔組織培養学会学術大会、2016年

徳善紀彦、中城公一、秋山仁志、浜川裕之、ヒト口腔扁平上皮癌におけるTrametinibの抗腫瘍効果、第75回日本癌学会学術総会、2016年

Akiyama H, Nakashiro K, Tokuzen N, Tanaka H, Hino S, Hamakawa H. Mutation and function of PIK3CA and HRAS in human oral squamous cell carcinoma cells. 107th American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中城 公一 (Nakashiro, Koichi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90314880

(2) 研究分担者

浜川 裕之 (Hamakawa, Hiroyuki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20127905

(3) 研究協力者

徳永 順士 (Tokunaga, Naohito)