

平成30年 5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20595

研究課題名(和文) 治療抵抗性口腔癌の高次エピゲノム解析に基づく新規診断法とエピゲノム治療法の創出

研究課題名(英文) Creation of novel diagnostic methods and epigenome therapy based on higher-order epigenome analysis in treatment-resistant oral cancer

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)は罹患率が増加しており、治療抵抗性や転移などの高悪性形質は生存率を低下させる大きな要因である。そこで、本研究ではOSCCの治療抵抗性に関する高次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とエピゲノム治療法の創出することを目的とした。高次エピゲノム制御に関するBRD4に着目し、その阻害薬であるJQ1をOSCC細胞株に投与したところ、増殖・遊走・浸潤の低下を認め、さらに浸潤・転移に関するMMP2遺伝子の発現の低下を認めた。BRD4は口腔癌における新たな浸潤転移の指標、さらには治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma (OSCC) has been increased morbidity, and its high malignant potential, including metastasis and therapeutic resistance affects patient survival. Herein, we investigated the higher-order epigenomic alteration in therapeutic resistance of OSCC to develop the novel diagnostic methods and epigenome therapy based on epigenome profile. Bromodomain containing 4 (BRD4) associates with acetylated chromatin and facilitates transcriptional activation. BET inhibitor JQ1 suppressed cell proliferation, migration and invasion in OSCC cell lines, and JQ1 reduced expression levels of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), which are associated with cancer metastasis. These results suggest that BRD4 may be a novel therapeutic target in OSCC.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 治療抵抗性 高次エピゲノム DNAメチル化 ヒストン修飾 エピゲノム治療

## 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 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、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・転移を生じやすい高悪性度の症例や化学療法および放射線療法への耐性を示す症例といった治療抵抗性の癌の問題が挙げられる。よって再発・転移のリスク評価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治療標的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、これらの修飾による 1 次構造体のエピゲノムに加え、エンハンサー、プロモーター、インスレーターとの相互作用といった 3 次元的なクロマチン構造による高次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、癌化や老化等の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やヒストン修飾の解析は様々な癌において病期診断、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(Toyota et al. *PNAS* 1999)。また近年、高次のクロマチン構造変換に関連して、複数のがん関連遺伝子の発現を活性化するスーパーエンハンサーが同定されている。スーパーエンハンサーはヒストン H3 の 27 番目のリジンのアセチル化 (H3K27Ac) で修飾されており、BET タンパク質ファミリーのひとつである BRD4 が同部を認識し、結合することが報告されている (Loven et al. *Cell* 2013)。スーパーエンハンサーは癌の特性維持に必要な遺伝子の発現制御に関与しており、BET ファミリータンパク質に対する特異的阻害剤(BRD4 阻害剤)は複数のがん関連遺伝子の発現を同時に抑制し、薬剤抵抗性の改善も含めた抗腫瘍効果がいくつかの癌で報告されている。

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。その結果、*MGMT*、*DAPK1*、*TFAP2E* の DNA メチル化と術前の化学放射線治療の治療効果との間に相関が認められ、それらの遺伝子がメチル化

されている症例に関しては予後が不良になることを見出している。しかし、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、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 の治療抵抗性に関連する高次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エピゲノム異常を標的としたがん治療の創出を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)治療抵抗性の OSCC 細胞株における高次エピゲノムの異常の解析

(a)抗癌剤/放射線耐性に関する 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、数種類の放射性耐性 OSCC 細胞株 (SAS-R、Ca9-22-R、HSC2-R)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)浸潤・転移に関するヒストン修飾状態の解析

OSCC 細胞株(SAS,HOC313)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。これらの解析結果より浸潤・転移機構に関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。

(d)スーパーエンハンサーの同定

Homer というソフトウェアを使用して、H3K27Ac の ChIP-seq データからエンハンサー、スーパーエンハンサーを同定した。

(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。

また生検時のサンプルから mRNA を抽出し、浸潤転移に關与する遺伝子の発現を qRT-PCR 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学的意義を解析した。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)細胞株を用いたエピゲノム治療薬の解析

新規エピゲノム治療薬として注目されている BRD4 阻害薬 (JQ1) を用いて、細胞増殖能、浸潤能、遊走能への影響を解析した。

## 4. 研究成果

### (1)抗癌剤/放射線耐性に關与する DNA メチル化状態の変化

5-FU 耐性 OSCC 細胞株 (SAS/FR2、Ca9-22/FR2) とその親株である OSCC 細胞株 (SAS、Ca9-22) 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 (SAS-R) は親株 (SAS) と共に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/放射線耐性に關与する遺伝子の 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 (SAS-R、Ca9-22-R、HSC2-R) 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。放射線耐性 OSCC 細胞株で発現が低下している遺伝子の内、放射線耐性との関連が報告されている遺伝子として MGMT を抽出した。同遺伝子に關して DNA メチル化との関連性について解析したところ、SAS 細胞ではプロモーター領域での高メチル化を認めた。

### (3) MGMT 遺伝子の 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

上記の MGMT 遺伝子に關して放射線耐性との関連性を評価するため、治療前の生検時のサンプルから抽出した DNA をパイサルファイト処理し、定量的 MSP 法にて DNA メチル化状態の解析を行った。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乏しいという結果が得られた。

### (4)浸潤・転移に關与するヒストン修飾状態の変化

浸潤・転移に關連するヒストン修飾状態を解析するために OSCC 細胞株 (SAS) および浸潤・転移能の高い OSCC 細胞株 (HOC313) 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 H3K27Ac とした。ChIP-seq の解析結果をもとに、転移に關与する遺伝子の探索を行った。その結果、転移に關連の深い、MMP 遺伝子群の近傍には H3K27Ac の高集積が確認された。そこで、MMP 遺伝子群の中で MMP2 に着目し、解析を進めた。

### (5)エンハンサー、スーパーエンハンサーの同定

Homer というソフトウェアを使用して、H3K27Ac の ChIP-seq データからエンハンサー、スーパーエンハンサーを同定したが、MMP2 遺伝子座に關してもエンハンサー領域が認められた。UCSC Genome Browser のデータベースを用いて他の細胞株においても検索を行ったところ、同領域は OSCC 細胞株だけではなく、他の細胞株においても保存されていた。

### (6)MMP2 遺伝子座への BRD4 の結合

H3K27Ac の高集積部位には BET タンパク質ファミリーのひとつである BRD4 が同部を認識し、結合することが報告されている。そこで BRD4 の抗体を用いて ChIP 解析を行ったところ、MMP2 遺伝子座の H3K27Ac の高集積部位で BRD4 の結合が確認できた。

### (7)OSCC 患者での BRD4 と MMP2 の発現

OSCC 患者の非癌部、癌部から採取した検体より mRNA を抽出し、BRD4 と MMP2 の遺伝子発現レベルを qRT-PCR で比較したところ、両遺伝子とも癌組織において優位に発現が上昇していた。両遺伝子は癌組織においては正に相関することを認めた。また、頸部リンパ節転移を認めた患者群では BRD4、MMP2 とも有意に高い発現が認められた。

### (8) エピゲノム治療薬の細胞増殖、遊走能、浸潤能への影響

新規エピゲノム治療薬として注目されている BRD4 阻害薬 (JQ1) を用いて解析を行った。JQ1 を用いて OSCC 細胞株 (SAS、HOC313) による細胞増殖を MTT assay にて解析した結果、濃度依存的に細胞増殖が抑制された。また、wound healing assay にて遊走能を matrigel invasion chamber を用いて浸潤能を解析したところ、より浸潤能の高い HOC313 細胞にて JQ-1 処理を行った細胞の遊走および浸潤が著明に抑制された。

(9) JQ1 による MMP2 遺伝子の発現変化および BRD4 の結合変化

JQ1 を加えた OSCC 細胞株(SAS、HOC313)にて MMP2 遺伝子の発現変化を解析したところ、両細胞株共に JQ1 投与にて MMP2 の著明な発現低下を認めた。また、MMP2 遺伝子座の H3K27Ac 集積部位への BRD4 の結合量に関しても ChIP 解析の結果、JQ1 投与にて結合量の低下を認めた。

今回の研究結果をまとめると、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。臨床検体も用いた解析より MGMT の高メチル化症例は化学放射線療法の治療効果が乏しいという結果が得られた。

また、転移能の高い OSCC 細胞株での H3K27Ac の ChIP-seq の解析結果をもとに、転移に関与する遺伝子の探索を行った結果、転移に関連の深い、MMP 遺伝子群の近傍には H3K27Ac の高集積が確認された。そこで、MMP 遺伝子群の中で MMP2 に着目し、解析を進め、BRD4 の抗体を用いて ChIP 解析を行ったところ、MMP2 遺伝子座の H3K27Ac の高集積部位で BRD4 の結合が確認できた。続いて BRD4 阻害薬 (JQ1) を OSCC 細胞株に投与したところ、増殖・遊走・浸潤の低下を認め、さらには MMP2 の著明な発現の低下を認めた。次いで、OSCC 患者の非癌部、癌部から採取した検体の mRNA を抽出し、BRD4 と MMP2 の遺伝子発現レベルを qRT-PCR で比較したところ、有意に正に相関することを認め、頸部リンパ節転移を認めた患者群でより高い発現傾向にあった。さらに JQ1 の投与は、MMP2 遺伝子座の H3K27Ac 集積部位への BRD4 の結合量を低下させた。これらの結果から高次エピゲノム制御に関与する BRD4 が口腔癌における新たな浸潤転移の指標、さらには治療標的となり得る可能性が示唆された。現在、放射線耐性に関与する遺伝子に関しても同定し解析を進めており、これらの研究結果も併せて本研究の目的である治療抵抗性に関与する高次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規診断法とエピゲノム治療法の創出を目指したいと考えている。

## 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 8 件)

Sakata J, Yamana K, Yoshida R, Matsuoka Y, Kawahara K, Arita H, Nakashima H, Nagata M, Hirosue A, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Hiraki A, Shinohara M, Toya R, Murakami R, Nakayama H.

Tumor budding as a novel predictor of occult

metastasis in cT2N0 tongue squamous cell carcinoma.

Human Pathology 76:1-8, 2018 (査読有)  
DOI:10.1016/j.humpath.2017.12.021.

Sakata S, Matsuoka Y, Kawahara K, Kakiuchi Y, Takaki A, Hirosue A, Yoshida R, Saeki S, Fujii K, Nakayama H.

Severe interstitial pneumonia associated with anti-PD-1 immune checkpoint antibody after talc slurry pleurodesis.

Respiratory Investigation 56:195-198, 2018 (査読有)

DOI:10.1016/j.resinv.2017.11.006.

Arita H, Nagata M, Yoshida R, Matsuoka Y, Hirosue A, Kawahara K, Sakata J, Nakashima H, Kojima T, Toya R, Murakami R, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H

FBXW7 expression affects the response to chemoradiotherapy and overall survival among patients with oral squamous cell carcinoma.

Tumour Biology 39:1-9, 2017 (査読有)

DOI:10.1177/1010428317731771.

Kawahara K, Hiraki A, Yoshida R, Yoshida, Arita H, Matsuoka Y, Yamashita T, Koga K, Nagata M, Hirosue A, Fukuma D, Nakayama H.

Salivary duct carcinoma treated with cetuximab-based targeted therapy: A case report.

Molecular and Clinical Oncology 6:886-892, 2017 (査読有)

DOI: 10.3892/mco.2017.1226.

Nakamoto M, Ishihara K, Watanabe T, Hirosue A, Hino S, Shinohara M, Nakayama H, Nakao M

The glucocorticoid receptor regulates the ANGPTL4 gene in a CTCF-mediated chromatin context in human hepatic cells.

PLOS ONE 12: e0169225, 2017 (査読有)

DOI:10.1371

Sakata J, Yoshida R, Matsuoka Y, Nagata M, Hirosue A, Kawahara K, Nakamura T,

Nakamoto M, Hirayama M, Takahashi N, Nakashima H, Arita H, Ogi H, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H

Predictive value of the combination of SMAD4 expression and lymphocyte infiltration in malignant transformation of oral leukoplakia.

Cancer Medicine 6:730-738, 2017 (査読有)

DOI: 10.1002/cam4.1005

Matsuoka Y, Nakayama H, Yoshida R, Hirosue A, Nagata M, Tanaka T, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Nakashima H, Shinriki S, Fukuma D, Ogi H, Hiraki A, Shinohara M, Toya R, Murakami R.

IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma.

British Journal of Cancer 115:1234-1244, 2016  
(査読有)  
DOI: 10.1038/bjc.2016.327  
Hiraki A, Yamamoto T, Yoshida R, Nagata M,  
Kawahara K, Nakagawa Y, Matsuoka Y,  
Tanaka T, Hirosue A, Fukuma D, Ikebe  
T, Shinohara M, Nakayama H.  
Factors affecting volume change of  
myocutaneous flaps in oral cancer.  
International Journal of Oral and Maxillofacial  
Surgery 45:1395-1399, 2016 (査読有)

[学会発表](計 7 件)

山本達郎、廣末晃之、中元雅史、川原健太、  
高橋望、吉田遼司、平木昭光、篠原正徳、  
斉藤典子、中尾光善、中山秀樹  
BRD4 は MMP2 遺伝子座にエピジェネティ  
ックな調節を介して口腔扁平上皮癌の転  
移に關与する  
第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
2018 年 1 月 25-26 日  
新潟グランドホテル、新潟  
Junki Sakata, Akiyuki Hirose, Ryoji Yoshida,  
Yuichiro Matsuoka, Kenta Kawahara, Tatsuro  
Yamamoto, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima  
Shunsuke Gohara, Sho Kawaguchi, Yuka  
Nagao, Keisuke Yamana, Hideki Nakayama  
Overexpression of IGFBP3 contributes to  
radioresistance and a poor prognosis in oral  
squamous cell carcinoma  
第 76 回日本癌学会学術総会  
2017 年 9 月 28-30 日  
パシフィコ横浜、神奈川県  
坂田純基、廣末晃之、吉田遼司、  
松岡祐一郎、永田将士、川原健太、高橋望、  
有田英生、中嶋光、田中拓也、福間大喜、  
尾木秀直、中山秀樹  
IGFBP3 は DNA 修復の促進を介して口腔  
扁平上皮癌に放射線抵抗性を附与する  
第 41 回日本頭頸部癌学会  
2017 年 6 月 8-9 日  
ウェスティン都ホテル京都 京都  
坂田純基、廣末晃之、吉田遼司、  
松岡祐一郎、永田将士、川原健太、有田  
英生、中嶋光、田中拓也、福間大喜、  
尾木秀直、中山秀樹  
IGFBP3 は DNA 修復の促進を介して口腔  
扁平上皮癌に放射線抵抗性を附与する  
第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集  
会、2017 年 4 月 27-28 日  
ひめぎんホール、愛媛  
Tatsuro Yamamoto, Akiyuki Hirose,  
Masafumi Nakamoto, Ryoji Yoshida, Kenta  
Kawahara, Masashi Nagata, Takuya Tanaka,  
Noriko Saitoh, Mitsuyoshi Nakao, Hideki  
Nakayama  
BRD4 contributes to metastasis in oral  
squamous cell carcinoma through the  
epigenetic regulation of MMP2.  
第 75 回日本癌学会学術総会

2016 年 10 月 6-8 日  
パシフィコ横浜、神奈川県  
Junki Sakata, Akiyuki Hirose, Ryoji Yoshida,  
Masashi Nagata, Yuichiro Matsuoka, Hidetaka  
Arita, Hikaru Nakashima, Kenta Kawahara,  
Daiki Fukuma, Hidenao Ogi,  
Masanori Shinohara, Hideki Nakayama  
The clinicopathological analysis of IGFBP3 in  
oral squamous cell carcinoma.  
第 75 回日本癌学会学術総会  
2016 年 10 月 6-8 日  
パシフィコ横浜、神奈川県  
坂田純基、廣末晃之、吉田遼司、永田  
将士、松岡祐一郎、有田英生、中嶋光、  
福間大喜、尾木秀直、篠原正徳、  
中山秀樹  
口腔扁平上皮癌における HMGA2 の臨床  
的意義  
第 40 回日本頭頸部癌学会  
2016 年 6 月 9-10 日  
大宮ソニックシティ、埼玉

## 6 . 研究組織

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