

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32705

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09545

研究課題名（和文）スーパーエンハンサーによる転写制御の破綻と口腔扁平上皮癌進展機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of transcriptional dysregulation by super-enhancer and oral squamous cell carcinoma progression

研究代表者

櫻井 浩平（Sakurai, Kouhei）

鎌倉女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：10608756

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌の多くを占める口腔癌は転移を認めることがあり、転移症例は予後不良となる。従って口腔癌転移の分子機構を解明することは臨床重要である。癌細胞が転移する際には多くの遺伝子の発現が変動する。本研究は、口腔癌細胞の転移に関与する遺伝子を同定するとともに、その発現制御機構を明らかにすることである。高転移能を有する口腔癌細胞のトランスクリプトームを解析することで、CSF2（Colony Stimulating Factor2）をはじめとした複数の遺伝子が口腔癌の進展に関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は頭頸部癌の多くを占めており、その発症率は年々増加している。口腔領域にはリンパ管や血管が豊富に存在することから、口腔癌は頸部リンパ節や遠隔臓器へ転移を認めることが多い。転移の過程で変動する遺伝子を同定するとともに、それらの遺伝子を制御する分子機構を明らかにすることによって新たな治療法や診断マーカーの開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Oral cancer, which is the most common malignancy in head and neck region, often shows metastasis, leading to poor prognosis. Therefore, it is clinically important to elucidate the molecular mechanisms of oral cancer metastasis. The expressions of numerous genes are dysregulated in the metastatic process. The present study aimed at identifying genes associated with oral cancer metastasis, and revealing the mechanisms of the gene expression. By analyzing transcriptome of an oral cancer cell line with high metastatic potential, we revealed that several genes such as CSF2 (Colony Stimulating Factor2) were involved in oral cancer progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：口腔癌 扁平上皮癌 遺伝子転写制御 転移

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の多くを占める口腔癌は外科的切除が第一選択であり、早期癌の場合は根治も見込める。しかし口腔領域には脈管が豊富に存在することから、頸部リンパ節や遠隔臓器へ転移する症例も珍しくない。転移は口腔癌の予後不良因子の1つであることから、転移の分子機構を解明することが望まれている。

癌細胞が転移する際には、様々な遺伝子の発現が変動する。癌の進展を制御する重要な遺伝子は、より強力なエンハンサーの影響下に置かれることが近年示唆されている。転写制御因子やヒストン修飾が高密度でエンリッチしている領域は、スーパーエンハンサーと呼ばれる。スーパーエンハンサーの支配下にある遺伝子はマスター遺伝子として細胞の identity や phenotype を決定する。口腔癌細胞においてこれらの遺伝子発現制御機構はほとんど明らかになっていない。

癌の進展を解析するためには適切な細胞株モデルを選択する必要があるが、ある癌細胞を親株として、異なる表現型を獲得した亜株を樹立することが行われている。例えば Matsui らは、HSC-3 細胞 (舌の口腔癌細胞) を親株として高転移能株 HSC-3-M3 細胞を *in vivo* screening によって樹立している (Oral Oncology, 34, 253-56, 1998)。これらの細胞は同じ遺伝的背景を有すると考えられるが、表現型が異なっているため同一患者の癌進展を模倣したモデルとして有用である。しかしこの 2 つの細胞の分子学的特性の差異を解析した報告はない。

2. 研究の目的

本研究は口腔癌細胞の転移に関与する遺伝子を同定するとともに、その発現制御機構を明らかにすることである。同一個体由来で表現型が異なる、HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の比較解析を軸にして研究を展開する。本研究の結果から、口腔癌転移の治療標的因子や診断マーカーの同定に結びつくことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト舌癌細胞株である HSC-3 細胞と高転移能株 HSC-3-M3 細胞を、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) 細胞バンクから入手した。いずれの細胞も 10% 子牛胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養した。

(2) Short Tandem Repeat (STR) 解析と sex-typing

QIAamp DNA Mini Kit を用いて HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞から DNA を抽出した。GenePrint 10 System による STR 解析と sex-typing を行った。

(3) マイクロアレイ解析

TRIzol 試薬を用いて HSC-細胞および HSC-3-M3 細胞から Total RNA を抽出した。SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8×60K Microarray (Agilent) による遺伝子発現解析を行った。p 値 < 0.05 および |fold change| > 1.5 を示す遺伝子を、発現変動遺伝子とした。

(4) 遺伝子エンリッチメントおよびパスウェイ解析

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ解析、QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) による遺伝子エンリッチメント解析、パスウェイ解析を行った。

(5) 生存分析

The Cancer Genome Atlas (TCGA) の頭頸部癌データセットを利用した Kaplan-Meier 解析を行った。MMP3、CXCL8、PTGS2、CSF2、MMP13 の各 mRNA について、高発現症例 (発現上位 75%) と低発現症例 (発現下位 25%) に分けて、OncoLnc (<http://www.oncolnc.org/>) によって生存率を評価した。

4. 研究成果

1. HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の由来

HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞から抽出した DNA を用いて、STR 解析および sex-typing を行った。その結果、2 つの細胞の STR プロファイリングは同一であるとともに、男性由来の細胞であることが確認された。従ってこれら 2 つの細胞は同一個体由来であると考えられた。

2. 遺伝子発現解析

HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞からそれぞれ total RNA を抽出した。2 つの細胞における発現変動遺伝子 (differentially expressed genes: DEGs) を同定することを目的にマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。p 値 < 0.05 および |fold change| > 1.5 を示す遺伝子を DEGs とすると、1018 個の遺伝子の発現が変動していた。HSC-3 細胞と比較して、HSC-3-M3 細胞で発現が増加している DEGs は 638 個、減少している DEGs は 380 個であった。

3. 遺伝子エンリッチメント解析およびパスウェイ解析

DEGs が関与する生物学的経路を明らかにするために遺伝子エンリッチメント解析およびパスウェイ解析を行った。

GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) では、HSC-3-M3 細胞で発現が増加している遺伝子は、「cytokine secretion」に関わる遺伝子が有意にエンリッチされていた。一方で HSC-3-M3 細胞で発現が低下している遺伝子は「cell surface receptor signaling pathway」に関わることが予測された。さらに KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) パスウェイ解析では、DEGs は炎症経路に関与することが示唆された。例えば HSC-3-M3 細胞で発現が増加する遺伝子は「TNF signaling pathway」に関わることが予測された。次に IPA (QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis) を行い DEGs の上流因子を探索したところ、TNF、FOS、NF- κ B などが予測された。

上記の結果をもとに、HSC-3-M3 細胞における遺伝子ネットワークを IPA を用いて解析した。NF- κ B をはじめとした複数の上流因子が DEGs を制御する結果、「Metastasis of tumor cell lines」や「Migration cancer cells」といった現象が HSC-3-M3 細胞で誘導される可能性が示された。これらの現象を誘導しうる DEGs のうち NF- κ B の直接の制御を受ける遺伝子は *MMP3*、*CXCL8*、*PTGS2*、*CSF2*、*MMP13* であった。これらの遺伝子は全て HSC-3 細胞と比較して HSC-3-M3 細胞で発現が増加していた。

4. 予後因子

MMP3、*CXCL8*、*PTGS2*、*CSF2*、*MMP13* が予後因子となりえるか、TCGA (The Cancer Genome Atlas) に登録されている頭頸部癌データセットを利用し生存分析を行った。それぞれの遺伝子について高発現症例と低発現症例に分けて解析したところ、*CSF2* (*Colony Stimulating Factor2*) の高発現症例は、低発現症例と比較して有意に生存率が低かった。その他の遺伝子については有意差は確認されなかった。

5. 考察

HSC-3-M3 細胞は 1998 年に樹立された (Oral Oncology, 34, 253-56, 1998) が、その後ほとんど使用されておらず、親株 HSC-3 細胞との分子学的特性の差異は全く解析されてこなかった。本研究では HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の RNA を用いたマイクロアレイ解析から 2 つの細胞の DEGs をはじめて明らかにした。1018 個の DEGs は、HSC-3-M3 細胞における炎症経路や NF- κ B の活性化に関与することが予想された。また NF- κ B の下流に位置する DEGs のうち *MMP3*、*CXCL8*、*PTGS2*、*CSF2*、*MMP13* が HSC-3-M3 細胞の転移や遊走を促進している可能性が示された。*CSF2* mRNA の高発現が頭頸部癌の予後不良因子であり、口腔癌転移の指標や治療標的となりえることも示唆された。他の口腔癌細胞株も併用しながら、*CSF2* などの DEGs をノックダウンあるいは過剰発現させた場合の増殖能や転移能の変化を *in vitro* および *in vivo* で解析している。

本研究から DEGs が炎症経路や NF- κ B の発現制御を受けていることが予想されるが、そ

の詳細な分子機構は不明な点が多い。NF- κ B がスーパーエンハンサーの活性化に与ることが報告 (Cell Reports 31, 107724, June 2, 2020) されていることから、HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞における NF- κ B や H3K27ac の ChIP (chromatin immunoprecipitation) -sequencing に取り組んでいる。今後、NF- κ B や H3K27ac の集積領域と DEGs を照らし合わせながら発現制御機構の解明を目指していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okabe A, Kiriya Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T.	4. 巻 32
2. 論文標題 Short-term Detection of Gastric Genotoxicity Using the DNA Double-Strand Break Marker -H2AX	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Pathology	6. 最初と最後の頁 91-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1293/tox.2019-0007	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 Yamada S, Nobusawa S, Yamazaki T, Teranishi T, Watanabe S, Murayama K, Ohba S, Okabe A, Sakurai K, Urano M, Tsukamoto T, Yokoo H, Hirose Y, Abe M	4. 巻 69
2. 論文標題 An Epilepsy-Associated Glioneuronal Tumor With Mixed Morphology Harboring FGFR1 Mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 372-377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12799	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 Sakurai K, Onouchi T, Yamada S, Baba Y, Murata T, Tsukamoto T, Kuroda M, Urano M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Cytology of morule in cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Malaysian Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 339-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Minatsuki C, Yamamichi N, Inada KI, Takahashi Y, Sakurai K, Shimamoto T, Tsuji Y, Shioyama K, Kodashima S, Sakaguchi Y, Niimi K, Ono S, Niwa T, Ohata K, Matsuhashi N, Ichinose M, Fujishiro M, Tsutsumi Y, Koike K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression of Gastric Markers Is Associated with Malignant Potential of Nonampullary Duodenal Adenocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci.	6. 最初と最後の頁 2617-2625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-018-5179-0.	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 Takahashi Y, Yamamichi N, Inada KI, Shiogama K, Sakurai K, Takeuchi C, Mizutani Y, Tsutsumi Y, Koike K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Nectin1 expression is frequently decreased in gastric cancers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 557-562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12721.	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 Wasano K, Sakurai K, Kawasaki T, Kusafuka K, Kasahara M, Kondo N, Inada KI, Ogawa K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Acquisition of resistance to androgen deprivation therapy in salivary duct carcinoma: A case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rare Tumors	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2036361318798867.	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 Nakayama C, Yamamichi N, Tomida S, Takahashi Y, Kageyama-Yahara N, Sakurai K, Takeuchi C, Inada KI, Shiogama K, Nagae G, Ono S, Tsuji Y, Niimi K, Fujishiro M, Aburatani H, Tsutsumi Y, Koike K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Transduced caudal-type homeobox (CDX) 2/CDX1 can induce growth inhibition on CDX-deficient gastric cancer by rapid intestinal differentiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3853-3864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13821.	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 Urano M, Nakaguro M, Yamamoto Y, Hirai H, Tanigawa M, Saigusa N, Shimizu A, Tsukahara K, Tada Y, Sakurai K, Isomura M, Okumura Y, Yamaguchi H, Matsubayashi J, Nagao T.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Diagnostic Significance of HRAS Mutations in Epithelial-Myoepithelial Carcinomas Exhibiting a Broad Histopathologic Spectrum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Surg Pathol.	6. 最初と最後の頁 984-994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001258.	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 Ideta Y, Tagawa T, Hayashi Y, Baba J, Takahashi K, Mitsudo K, Sakurai K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Transcriptomic profiling predicts multiple pathways and molecules associated with the metastatic phenotype of oral cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics and Proteomics	6. 最初と最後の頁 17-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20238	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

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田原沙佑美、田原智満、島寛太、磯村まどか、中川満、岡部麻子、櫻井浩平、桑原一彦、酒井康弘、山田勢至、浦野誠、黒田誠、塚本徹哉、大宮直木
2. 発表標題 除菌後胃癌背景胃粘膜におけるDNAメチル化異常の蓄積
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷泰憲、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤寛
2. 発表標題 酵素抗原法の技術開発：パラフィン包埋切片において各種固定法が抗体活性におよぼす影響
3. 学会等名 第107回 日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯村まどか、櫻井浩平、佐藤伸明、河合遼子、吉田和加、杉田好彦、久保勝俊、浦野誠、前田初彦
2. 発表標題 歯原性病変におけるメラノサイトの局在と発生起源について
3. 学会等名 第29回 日本臨床口腔病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦野誠、磯村まどか、櫻井浩平、黒田誠
2. 発表標題 耳下腺腫瘍の1例
3. 学会等名 第29回 日本臨床口腔病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、桑原一彦、高橋智、塚本徹哉
2. 発表標題 DNA二重鎖切断マーカー -H2AXを用いた胃発がん物質の短期同定
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒川敏、富重博一、川辺則彦、永田英俊、浅野之夫、古田晋平、志村正博、林千紘、神尾健士郎、河合永季、安岡宏典、東口貴彦、今枝義博、稲田健一、櫻井浩平、石原慎、伊東昌広、堀口明彦
2. 発表標題 Stage 結腸・直腸S状部癌における癌先進部の低分化胞巣は再発のリスク因子になりうるか
3. 学会等名 第23回 日本外科病理学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井浩平、中村豊、市川孝昭、馬場洋一郎、村田哲也、塚本徹哉、黒田誠、浦野誠
2. 発表標題 甲状腺乳頭癌 篩状-モルラ型の一例
3. 学会等名 第57回 日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤太二、菅原沙恵子、櫻井浩平、相田萌花、赤田このみ、大橋由奈、小野詩織、鈴木さくら、中谷桃子、酒造麻実、三村明穂、大村正史、高橋君子、中谷弥栄子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた、脈波と心電測定およびICG動脈硬化巣ライブイメージングによる総合的糖尿病合併症評価法
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋由奈、小野詩織、菅原沙恵子、櫻井浩平、相田萌花、赤田このみ、鈴木さくら、中谷桃子、酒造麻美、三村明穂、大村正史、高橋君子、中谷弥栄子、伊藤太二
2. 発表標題 インスリン抵抗性特異的な血中分泌型miRNAの網羅的同定と標的遺伝子予測による糖尿病と合併症の新たな診断マーカーの探索
3. 学会等名 第74回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤田このみ、相田萌花、菅原沙恵子、櫻井浩平、大橋由奈、小野詩織、鈴木さくら、中谷桃子、酒造麻実、三村明穂、大村正史、高橋君子、中谷弥栄子、伊藤太二
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた加速度脈波、心電、及びICG蛍光イメージングを組み合わせた総合的糖尿病合併症評価法
3. 学会等名 第74回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------