

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16850

研究課題名（和文）microRNAとエピゲノム解析によるHPV関連中咽頭癌予後不良因子の同定

研究課題名（英文）Identification of HPV-associated oropharyngeal carcinoma poor prognostic factor using microRNA and epigenome analysis

研究代表者

波多野 孝（HATANO, Takashi）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：40807583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：今までの研究よりヒト乳頭腫ウイルス（HPV）関連頭頸部癌細胞株の網羅的マイクロRNAプロファイリングを行い、HPV感染により発現が変動するマイクロRNA群の中から予後に影響を及ぼすと考えられるマイクロRNA候補を抽出した。抽出したmirBの発現変動を行うことでin vitroで細胞増殖能、遊走能に有意に差が得られ、さらに複数のPublic databaseより抽出した候補下流遺伝子の発現を制御していることを明らかとした。以上より、本研究においてHPV関連中咽頭癌の発癌機構において、mirBにより増殖能、遊走能を亢進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV関連中咽頭癌はHPV陰性癌と比較し予後が良好と考えられているが、その中でも予後不良な症例は依然として存在しており、その理由は明らかではない。本研究で明らかにしたmirBを介した下流遺伝子の制御機構に対する治療開発を行うことで、HPV関連中咽頭癌の予後不良群改善への糸口となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：From previous studies, we performed comprehensive microRNA profiling of human papilloma virus (HPV)-associated head and neck squamous cell carcinoma cell lines and microRNAs that are thought to have an impact on prognosis among microRNAs whose expression fluctuates due to HPV infection were extracted. Then, by varying the expression of the extracted mirB, we obtained a significant difference in cell growth and migration in vitro, and further revealed that it regulates the expression of candidate downstream genes extracted from multiple public databases. These results suggest that mirB enhances proliferation and migration in the carcinogenic mechanism of HPV-associated oropharyngeal carcinoma.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ヒト乳頭腫ウイルス関連中咽頭癌 頭頸部癌 エピゲノム マイクロRNA HPV

1. 研究開始当初の背景

ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 関連中咽頭癌は化学放射線治療に対する感受性がよく、HPV 陰性の従来型の中咽頭癌と比べ予後が良好である。そのため、2018 年に改訂された頭頸部癌取り扱い規約においても中咽頭癌は HPV 感染の有無により大きく異なる病期分類となった。しかしながら、HPV 陽性中咽頭癌の中にも予後不良な経過をたどる例は依然として存在しており、その理由は明らかではない。

我々は HPV 関連頭頸部癌細胞株に対し次世代シーケンサーにターゲット濃縮手法を組み合わせて全組み込み部位の詳細な解析を行い、HPV 遺伝子が遺伝子間領域に組み込まれていることを確認した。更に同細胞株にバイサルファイトパイロシーケンスを行った結果、ゲノムワイドな低メチル化が生じていることもわかり、HPV 関連頭頸部癌で起きているエピゲノム変化が発癌機構につながる可能性があることを報告した。

一方で、複数の癌腫において、遺伝子間領域に存在する noncoding RNA の一つである microRNA が関与していると報告されている。microRNA は標的遺伝子の mRNA の 3' UTR に結合し、その発現を転写後に一括して抑制するため、その発現は癌の遺伝子異常に大きくかかわっている。また、既存の網羅的遺伝子解析データをもとに miRNA の標的遺伝子を検索することができるオンラインプログラムである Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) のように、近年多くの解析ツールやアプリケーションがあり、これらの解析データを参考にした実験が多く行われている。そこで、本研究ではまず HPV 関連頭頸部癌および非関連頭頸部癌細胞株に対して microarray を用いて網羅的 microRNA プロファイリングを行い、発現が変動する microRNA 群の中から、細胞増殖、浸潤、転移との関連、および HPV 感染と関連する microRNA を検証することをから開始した。

そして、The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録された臨床検体に対する microRNA-seq および自施設で行った細胞株に対する microRNA-array のデータより候補として選ばれた microRNA のうち、miR-B が HPV 関連癌で低発現であり、HPV 非関連頭頸部癌細胞株において高発現することで遊走能、増殖能を促進することがわかり、OncomiR である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、miR-B が頭頸部癌の悪性度の促進に果たす役割、また HPV 感染と miR-B の関連性を明らかにすることで、HPV 感染がもたらす頭頸部癌における、エピジェネティックな変化を明らかにすることを目的とする。更に、TCGA 以外の public database の情報も用いて、HPV 関連頭頸部扁平上皮癌における重要な遺伝子のデータ解析を一助として、miR-B の target 遺伝子選定を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

HPV16 遺伝子の導入がもたらす miR の変動の検証。

HPV16 E6,E7 plasmid を用いて、哺乳類発現ベクター-pcDNA3.1 に HPV16 遺伝子を載せ替えたベクターを作成した (pcDNA-HPV16)。その後、このベクターを HPV 陰性頭頸部癌細胞株に transfection し、miR の発現変動の有無を qPCR で確認した。

miR-B 発現抑制による phenotype の変動の有無の検証。

頭頸部癌細胞株 (KCC-T871, WSU-HN30) に対して micro RNA inhibitor を transient transfection して、migration assay, proliferation assay を行った。

public database を用いた、HPV 関連頭頸部扁平上皮癌における重要遺伝子 (Hub-gene) のデータ解析。

GEO database から臨床検体を用いた Microarray 発現プロファイルを入手し、HPV 関連頭頸部癌の tumor/normal tissue の data を用いて、特異的に発現変動している differentially expressed gene (DEG) を識別する。DEG を用いた Gene ontology (GO) functional analysis, The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG) pathway analysis で function, pathway 解析を行った。また、online-tool である The search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) と Cytoscape 3.7.1 ソフトウェアを用いて、DEG の Protein-protein interaction (PPI) network を作成し、重要な遺伝子群となる module と Hub-gene を選出した。Hub-gene として候補となった遺伝子に対して、TCGA の RNA-seq 情報を用いて、microarray-data の解析結果との validation を行い、更に生存率との関連を検証した。

4. 研究成果

1) pcDNA-HPV16 を HPV 非関連頭頸部癌細胞株である WSU-HN30 に transfection した後に抽出した RNA を用いて qPCR を実施した。当初行った自施設の miRNA array と TCGA miRNA seq を用いて候補として挙げた miR に関して検討を行い、miR-B は transfection により上昇を認めた (図 1)。

2) microRNA mimic の transient transfection により、増殖能、遊走能に変動を確認した (図 2、図 3)。

3)GSE55546 と GSE58911 の 2 つの Microarray より DEG を検出し、共通した遺伝子を抽出した(図 4)。Cytoscape アプリケーションの MCODE を用いた解析では、PPI network より 2 つの important module が選ばれ、degree の数に準じて上位 20 の hub-gene を選出した(図 5)。Hub-gene を TCGA の RNA-sequence data を用いて更に validation したところ、HPV 関連頭頸部扁平上皮癌と正常組織の発現の違いが、Microarray data と有意差をもって同様で、かつ Kaplan-Meier survival analysis で有意に生存率が異なる遺伝子を抽出した(図 6)。

・総括

HPV 感染と関連する microRNA を抽出した。さらに、data 解析より HPV 関連癌において重要な働きをする hub-gene を複数選出できた。現在 Hub-gene の function についての検証を続けている。

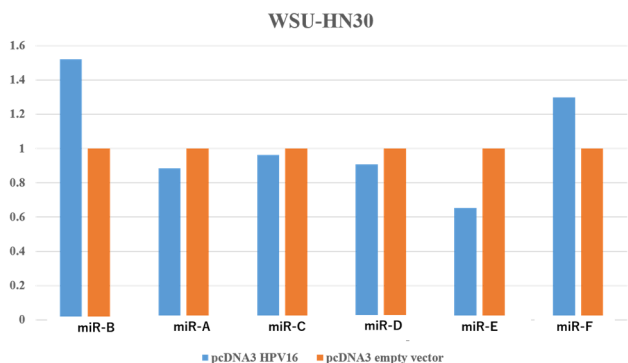


図 1 qPCR (pcDNA-HPV16 transfection 後)

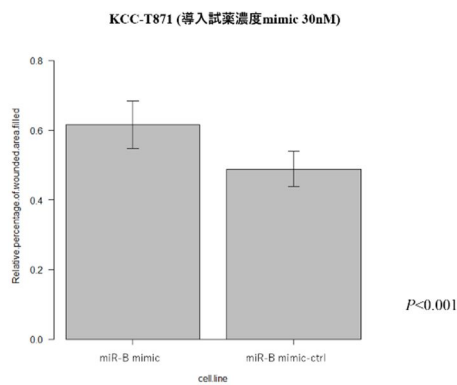


図 2 Migration Assay

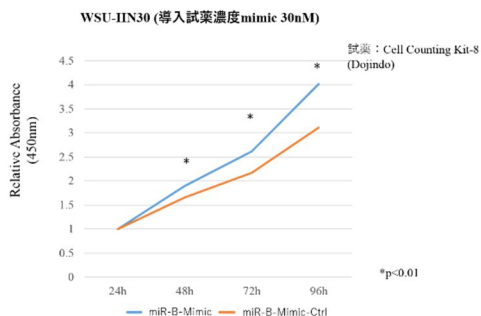


図 3 Proliferation Assay

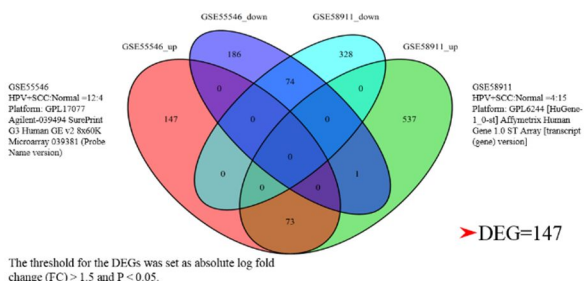


図 4 DEG の抽出

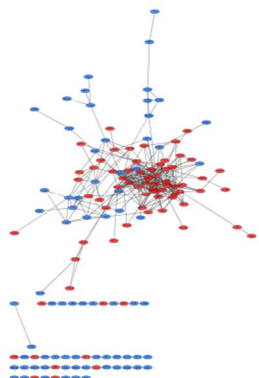


図 5 protein-protein interaction network

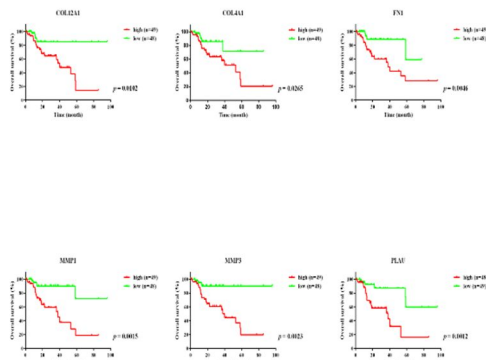


図 6 Validation with TCGA RNA-seq data

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hatano T, Sano D, Oridate N	4. 巻 46(7)
2. 論文標題 The Advances in Research of Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis in Oropharyngeal Cancers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer & chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1128-1130
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Goshi Nishimura, Daisuke Sano, Yasuhiro Arai, Takashi Hatano, Hideaki Takahashi, Teruhiko Tanabe, Takashi Wada, Daiki Morishita, Nobuhiko Oridate	4. 巻 8(17)
2. 論文標題 A prospective clinical trial of the second-look procedure for transoral surgery in patients with T1 and T2 laryngeal, oropharyngeal, and hypopharyngeal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer medicine	6. 最初と最後の頁 7197-7206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.2588	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 -
1. 著者名 Sano D, Fujisawa T, Tokuhisa M, Shimizu M, Sakagami T, Hatano T, Nishimura G, Ichikawa Y, Iwai H, Oridate N	4. 巻 39(12)
2. 論文標題 Real-world Treatment Outcomes of the EXTREME Regimen as First-line Therapy for Recurrent/Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Multi-center Retrospective Cohort Study in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 6819-6827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13898	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 -
1. 著者名 Tatsu Kuwahara, Hideaki Takahashi, Daisuke Sano, Mitsuteru Matsuoka, Hiroshi Hyakusoku, Takashi Hatano, Yohei Hiiragi, Nobuhiko Oridate	4. 巻 38(9)
2. 論文標題 Fibrinogen and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Survival in Patients with Advanced Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 5321-5330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12859	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐野 大佑, 澤熊 香衣, 百束 紘, 波多野 孝, 磯野 泰大, 高田 顕太郎, 佐藤 要, 桑原 達, 相澤 圭洋, 折館 伸彦
2. 発表標題 FOSL1 promotes regional metastasis of head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田 顕太郎, 相澤 圭洋, 佐野 大佑, 奥田 諒, 関根 圭輔, 上野 康晴, 青山 準, 波多野 孝, 荒井 康裕, 谷口 英樹, 折館 伸彦
2. 発表標題 Establishment of PDX-derived salivary gland adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----