

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16860

研究課題名(和文) 頭頸部癌における選択的スプライシングを介した発癌機構の解明

研究課題名(英文) Exploring the mechanisms of carcinogenesis through the aberrant alternative splicing in head and neck cancer

研究代表者

酒井 昭博 (Akihiro, Sakai)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：20384886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：今回、頭頸部癌における選択的スプライシングを介した発癌機構を次世代シーケンサー解析を用いて検討した。まずTCGAのデータを用いて候補遺伝子を抽出し、頭頸部癌細胞株を用いて表現型を検討した。その結果幾つかの遺伝子が候補遺伝子として選択された。次に上記の遺伝子導入株、ノックダウン株を作成した後、RNA-Seq解析により、誘発されたスプライシング変異を同定した。その結果スプライシング関連遺伝子の異常は多くの発癌遺伝子の異常スプライシングを誘導していることが判明した。スプライシング関連遺伝子の異常は頭頸部癌の異常スプライシング発現を誘導し、発癌に関与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異以外の発癌機構として遺伝子発現の下流である転写後調節レベルの選択的スプライシングによる発癌機構が明らかになってきている。このスプライシングによる発癌機構が頭頸部癌の発癌に重要な役割を果たしている可能性が十分あると考え今回の研究を行った。本研究によりスプライシング関連遺伝子CPSF1の遺伝子変異は癌関連遺伝子のASEを幅広く誘発し、CPSF1の発現異常は、頭頸部癌においてASEを誘発することにより、発がんに関与している可能性があることが判明した。さらなる研究により頭頸部癌の発癌機構解明、予後向上に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of carcinogenesis via ASEs in HNC using RNA sequencing and examined. First, we selected candidate genes from splicing-related genes using TCGA data, and examined the phenotypes of the candidate genes using HNC cell lines. As a result, several genes were selected as candidate genes. Next, after creating overexpression and knockdown cell lines, RNA was extracted, and ASEs induced were identified by RNA-Seq analysis. The results showed that splicing-related gene aberrations induced ASEs of many oncogenes. Abnormalities in splicing-related genes induce ASEs in HNC and may be involved in carcinogenesis.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：選択的スプライシング 頭頸部癌 CPSF1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年、がんゲノムアトラス (TCGA) 研究ネットワークの研究者らにより、頭頸部癌のゲノム変化における最新の包括的調査の結果が報告され、頭頸部癌の70%以上において、成長因子受容体 (EGFR など)、シグナル分子 (PIK3CA など)、細胞周期制御因子に関わる遺伝子に変化があると報告された (Nature 2015)。この報告の中では多数の遺伝子変異が報告されているが、治療標的となる癌遺伝子そのものの変異の報告は少なく、治療開発が難しい癌抑制遺伝子の多数の変異が発見される結果であった。従って、頭頸部癌の発癌に関しては、多数のがん遺伝子・がん抑制遺伝子の発現機能異常が制御される一元的なメカニズムの存在が示唆され、その解明が必要である。1つのメカニズムとして、転写後制御、中でも選択的スプライシングが注目を浴びており、事実、転写後調節の大きな因子として、一部のスプライシング変異が発癌のトリガーとなっていることが報告された (Nat Struct Mol Biol. 2007)。すなわち、転写後調節に新たな治療標的が存在することが示唆されている。現在、頭頸部癌においてほとんど報告がないスプライシング関連遺伝子中のドライバー遺伝子を見れば、そのドライバー遺伝子、もしくはドライバー遺伝子異常によって引き起こされたスプライシング変異(図: ?2)をターゲットとすることにより、発癌を抑制し、新しい治療標的となる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は頭頸部癌における選択的スプライシングを介した発癌機構を次世代シーケンサー解析を用いて解明し、新しい治療標的となりうるかどうかを検討することである。

3. 研究の方法

- (1) スプライシング関連遺伝子の中から候補遺伝子を抽出し、ターゲット遺伝子を同定する。
- (2) 頭頸部癌細胞株を用いて候補遺伝子の表現型を検討する。
- (3) その遺伝子を導入した細胞株より RNA を抽出し、RNA-Seq 解析により、キーとなるスプライシング変異を同定する。
- (4) 同定されたスプライシング異常の発現を、TCGA データ、細胞株を用いた生物学的サンプルで検証を行い、発癌メカニズムの解明を目指す。

4. 研究成果

(1) 選択的スプライシングに関連する候補遺伝子の検索

候補遺伝子の検索:

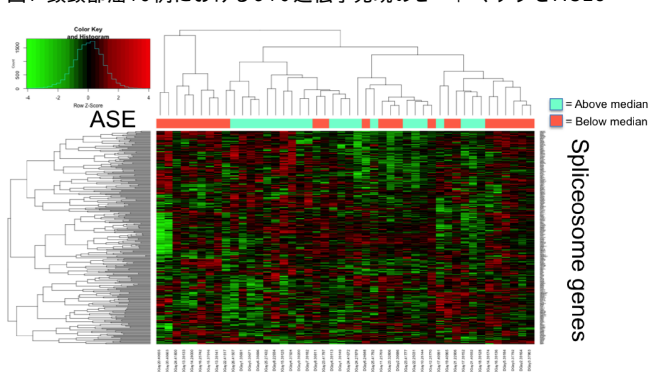
QuickGO を用いて、“spliceosome”に関連している遺伝子計319遺伝子を抽出した。

次いでこの遺伝子群の発現異常が選択的スプライシングイベント (ASEs: サンプル中の異常スプライシング数) と関連しているか確認するため、頭頸部癌臨床検体46サンプルのRNA-Seqデータを用いてこの遺伝子群の発現とサンプル間のヒートマップを作成しASEsとの関連を俯瞰した(図1)。

ASEsはGuoらのRNA-Seq解析パイプラインに従い計算された(Guo, Sakai, et al. Cancer Res 2016)。その結果、サンプル間のクラスターはASE発現と強固で、遺伝子群の遺伝子発現とASEsは強く相関していることが確認できた。つまり、この遺伝子群の中にASEsを変化させ、発癌に強く関連するドライバー遺伝子が含まれている可能性が高いと考えた。そこで、最も頭頸部癌と関わっている候補遺伝子を選択するために、TCGAの頭頸部癌のデータを用いて、この遺伝子群の遺伝子異常(変異、コピー数、発現異常)を調べ、それらが高頻度に認められる13遺伝子を候補遺伝子として見いだした(表1)。

さらに遺伝子を絞り込むために、スクリーニングとして頭頸部癌細胞株に対し13遺伝子のsiRNAによるノックダウンを用いた増殖アッセイを行い、増殖抑制効果が高かったCPSF1を最終候補遺伝子として選択した。

図1 頭頸部癌46例における319遺伝子発現のヒートマップとASEs



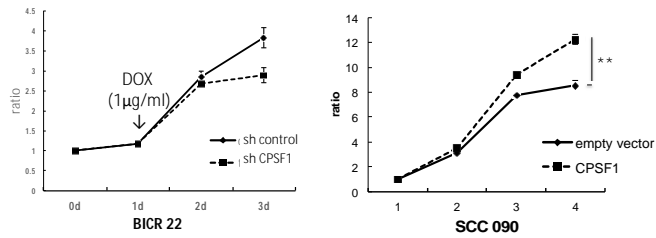
Gene symbol	Description	Mutation	Copy Number Variation			Expression	
			Amplification	Deletion	High	Low	
CPSF1	Cleavage And Polyadenylation Specific Factor 1	3	30	0	76	2	
CPSF7	Cleavage And Polyadenylation Specific Factor 7	4	4	0	24	5	
QBR1	Debranching RNA Lariat 1	7	29	0	85	0	
DHX9	DEAD-Box Helicase 9	5	4	0	22	3	
HNRNPL	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L	7	4	0	16	0	
PRPF6	pre-miRNA processing factor 6	8	1	0	38	8	
PSP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	7	11	2	21	0	
RBM4	RNA Binding Motif Protein 4	3	22	0	34	0	
RSRC1	Arginine And Serine Rich Coiled-Coil 1	4	40	0	89	0	
SNRPN	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N	6	2	1	17	0	
SRPK2	SFRS protein kinase 2	5	13	0	22	1	
TRA2B	Transformer 2 Beta Homolog	4	55	0	50	0	
YTHDC1	YTH domain containing 1	5	2	0	13	0	

表1 TCGAの頭頸部癌における13遺伝子の遺伝子異常

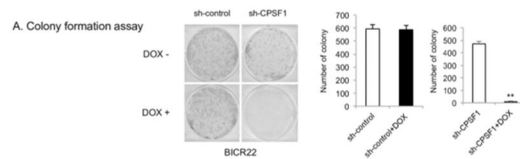
(2) 頭頸部癌細胞株を用いた遺伝子の表現型の検討

遺伝子強制発現・誘導ノックダウン安定細胞株の作成：The pLenti-C-mGFP-P2A-Puro vector (OriGene)、Inducible target gene-shRNA vectors (Dharmacon)を用いてレンチウイルスを作成し、細胞株へトランスフェクションし、Puromycin セレクション後、安定発現株を樹立しそれを用いて各種実験を行った。

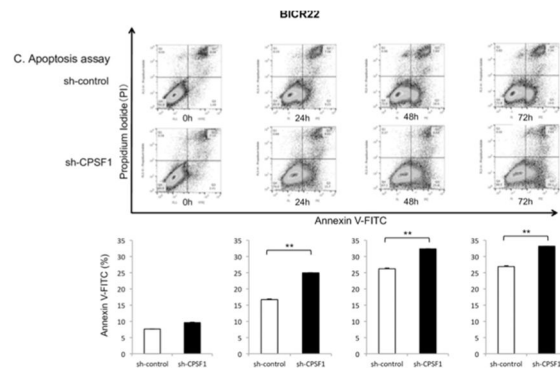
細胞増殖試験：各細胞を 96-well plates に $3-5 \times 10^3$ 個播種し、24、48、72 時間後に Vita Blue Cell Viability Reagent を用いて蛍光を測定した。DOX により細胞増殖抑制が認められた。また CPSF 1 遺伝子導入株はコントロール株と比較し、細胞増殖が引き起こされた。



コロニー形成試験：各細胞 500 個を 6well 培養プレートに播種し 5%CO2 下、37 °C で 14 日間培養し、Diff-Quick kit を用いてコロニーを染色、顕微鏡下にコロニー数を測定した。Sh-CPSF1 導入株では DOX 刺激において細胞増殖の抑制が認められた。



アポトーシス試験：Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma - Aldrich) で細胞を染色し、BD FACS Calibur を用いてアポトーシスを検出した。sh-CPSF1 細胞におけるアポトーシスは、sh-control 細胞におけるアポトーシスと比較して、有意に増加した。



(3) RNA-Seq 解析

変動スプライシング変異の検出：上記細胞株より RNA を抽出し、RNA-Seq 解析により、ノックダウン or 遺伝子導入前後で大きく変化しているスプライシング異常を前述の Guo のパイプライン (Cancer Res 2016) を用いて解析した。RNA-Seq リードを Mapped to GRCh37/hg19 にアライメントし output として junction データを得た。また RSEM を用いて遺伝子発現データを得た後、2 群間で有意に変動しているスプライシング変異を同定した。

Table 2. The list of top 20 significant genes after junction analysis of the CPSF1 knockdown dataset.

Gene symbol	Gene Name	p value
PNISR	PNN interacting serine and arginine rich protein(PNISR)	0.000035
SLC39A1	solute carrier family 39 member 1(SLC39A1)	0.00041
LAMC2	laminin subunit gamma 2(LAMC2)	0.00061
UBE2C	ubiquitin conjugating enzyme E2 C(UBE2C)	0.0037
PUM2	pumilio RNA binding family member 2(PUM2)	0.0057
SLC5A6	solute carrier family 5 member 6(SLC5A6)	0.0091
HRAS	HRas proto-oncogene, GTPase(HRAS)	0.01
AKT2	AKT serine/threonine kinase 2(AKT2)	0.011
HDLBP	high density lipoprotein binding protein(HDLBP)	0.011
TK1	thymidine kinase 1(TK1)	0.011
TXN2	thioredoxin 2(TXN2)	0.011
MIR4435-1HG	MIR4435-2 host gene(MIR4435-2HG)	0.013
EIF4G1	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1(EIF4G1)	0.015
NIN	ninein(NIN)	0.015
MICAL2	microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 2 (MICAL2)	0.017
PIGO	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class O(PIGO)	0.019
PRMT5	protein arginine methyltransferase 5(PRMT5)	0.019
ZNF618	zinc finger protein 618(ZNF618)	0.024
MIR205HG	MIR205 host gene(MIR205HG)	0.027
UBR3	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 3 (putative)(UBR3)	0.028

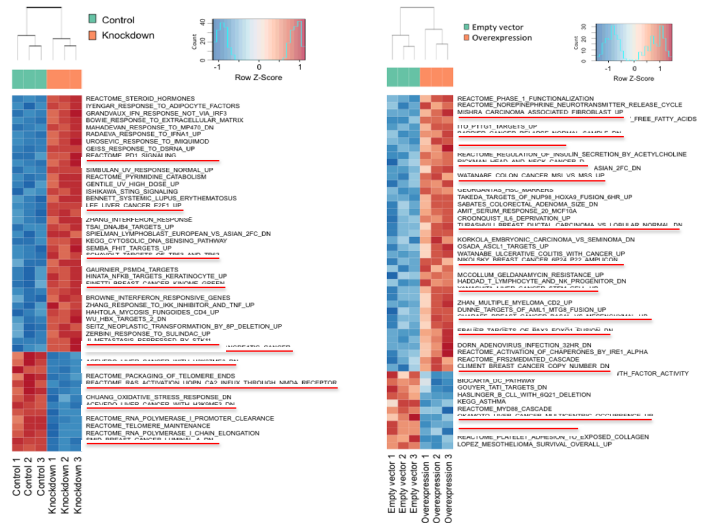
Table 3. The list of top 20 significant genes after junction analysis of the CPSF1 overexpression dataset.

Gene symbol	Gene name	p value
BOK	BOK, BCL2 Family Apoptosis Regulator	0.00065
MAP4	Microtubule Associated Protein 4	0.00065
ATG13	Autophagy Related 13	0.0018
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2	0.0019
AKNAD1	AKNA Domain Containing 1	0.0023
SZT2	SZT2, KICSTOR Complex Subunit	0.0035
MB21D1	Mab-21 Domain Containing 1	0.0046
BPNT1	3'(2'), 5'-Bisphosphate Nucleotidase 1	0.0059
CTC-432M15.3	ENSG00000273217 Gene	0.0061
SLC25A19	Solute Carrier Family 25 Member 19	0.0065
APIG1	Adaptor Related Protein Complex 1 Gamma 1 Subunit	0.0068
POLR3E	RNA Polymerase III Subunit B	0.009
ZDHHC23	Zinc Finger DHHC-Type Containing 23	0.0093
RUVBL1	RuvB-like 1 (E. coli)	0.0094
MTUS1	Microtubule Associated Scaffold Protein 1	0.01
TRIB3	Tribbles Pseudokinase 3	0.013
ACSL5	Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 5	0.014
PYGO2	Pygopus Family PHD Finger 2	0.014
ELAVL1	ELAV Like RNA Binding Protein 1	0.015
NEK9	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 9	0.015

その結果、CPSF1 の遺伝子変異は幅広く癌関連遺伝子の ASE を誘発した事が判明した。

Single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) による Enrichment 解析: RSEM データを用いて ssGSEA を行い、2 群間で有意に変化した Pathway を同定した。

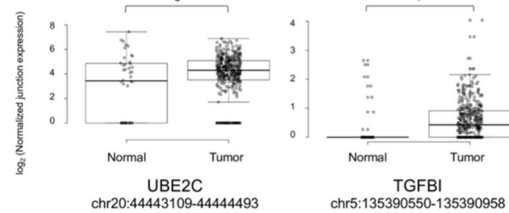
その結果、CPSF1 は幅広く癌関連遺伝子の ASE を変化させ、癌関連の gene set を変化させていることがわかった。



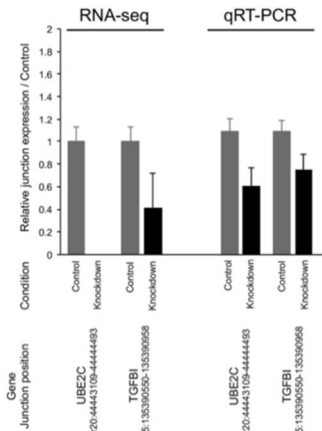
(4) スプライシング変異の検証

TCGA データを用いた検証: TCGA の raw RNA-Seq data を Mappedsplice2 で再アライメントした junction data を用いて上記の方法で検出したスプライシング変異が、TCGA データでも検出できるかどうか検討した。UBE2C、TGFB1 のスプライシング変異が TCGA データにおいても有意に発現が上昇していることがわかった。

C. ASE Junction expression between normal and tumor with TCGA cohort



細胞株を用いた実験的検証: 細胞株より RNA を抽出し、cDNA を作成。スプライシング変異を同定可能な primer、probe を設計し、それらを用いて qRT-PCR によりスプライシング変異の実験的検証を行った。CPSF1 ノックダウン細胞株においてもスプライシング変異の抑制が確認された。



今回の研究において、スプライシング関連遺伝子、特に CPSF1 遺伝子が、発癌遺伝子の ASE を誘発し、発がんに関連していることが判明した。しかし、ASE 発現の複雑さ、複数の遺伝子にまたがる ASE 発現への幅広い影響を考慮すると、CPSF1 の過剰発現によって生じる表現型効果を実行する単一のスプライスバリエントを定義することはできなかった。頭頸部癌における CPSF1 に関連する特定のスプライスバリエントの相対的な機能的寄与を解明するためには、さらなる研究が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 18件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fukusumi Takahito, Guo Theresa, Ren Shuling, Haft Sunny, Liu Chao, Sakai Akihiro, Ando Mizuo, Saito Yuki, Sadat Sayed, Califano Joseph	4. 巻 58
2. 論文標題 Reciprocal activation of HEY1 and NOTCH4 under SOX2 control promotes EMT in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 226 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.5156	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 Ren Shuling, Gaykalova Daria A., Guo Theresa, Favorov Alexander V., Fertig Elana J., Tamayo Pablo, Callejas-Valera Juan Luis, Allevato Mike, Gilardi Mara, Santos Jessica, Fukusumi Takahito, Sakai Akihiro, et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 HPV E2, E4, E5 drive alternative carcinogenic pathways in HPV positive cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 6327 ~ 6339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-01431-8	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 Sakai Akihiro, Ando Mizuo, Fukusumi Takahito, Ren Shuling, Liu Chao, Qualliotine Jesse, Haft Sunny, Sadat Sayed, Saito Yuki, Guo Theresa W., Xu Guorong, Sasik Roman, Fisch Kathleen M., Gutkind J. Silvio, Fertig Elana J., Molinolo Alfredo A., Califano Joseph A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Aberrant expression of CPSF1 promotes head and neck squamous cell carcinoma via regulating alternative splicing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0233380	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 Liu Chao, Sadat Sayed H., Ebisumoto Koji, Sakai Akihiro, Panuganti Bharat A., Ren Shuling, Goto Yusuke, Haft Sunny, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Saito Yuki, Guo Theresa, Tamayo Pablo, Yeerna Huwate, Kim William, Hubbard Jacqueline, Sharabi Andrew B., Gutkind J. Silvio, Califano Joseph A.	4. 巻 26
2. 論文標題 Cannabinoids Promote Progression of HPV-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma via p38 MAPK Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2693 ~ 2703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-3301	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 Saito Yuki, Favorov Alexander V., Forman Michael, Ren Shuling, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Liu Chao, Sadat Sayed, Ando Mizuo, Xu Guorong, Khan Zubair, Pang John, Valsamakis Alex, Fisch Kathleen M., Califano Joseph A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Rational genomic optimization of DNA detection for human papillomavirus type 16 in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Head & Neck	6. 最初と最後の頁 688 ~ 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.26041	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 Liu Chao, Guo Theresa, Sakai Akihiro, Ren Shuling, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Sadat Sayed, Saito Yuki, Califano Joseph A.	4. 巻 126
2. 論文標題 A novel splice variant of LOXL2 promotes progression of human papillomavirus?negative head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 737 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.32610	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 Ando Mizuo, Saito Yuki, Xu Guorong, Bui Nam Q., Medetgul-Ernar Kate, Pu Minya, Fisch Kathleen, Ren Shuling, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Liu Chao, Haft Sunny, Pang John, Mark Adam, Gaykalova Daria A., Guo Theresa, Favorov Alexander V., Yegnasubramanian Srinivasan, Califano Joseph A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09937-w	査読の有無 無
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 Haft Sunny, Ren Shuling, Xu Guorong, Mark Adam, Fisch Kathleen, Guo Theresa W., Khan Zubair, Pang John, Ando Mizuo, Liu Chao, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Califano Joseph A.	4. 巻 125
2. 論文標題 Mutation of chromatin regulators and focal hotspot alterations characterize human papillomavirus?positive oropharyngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 2423 ~ 2434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.32068	査読の有無 無
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 Ren Shuling, Gaykalova Daria, Wang Jennifer, Guo Theresa, Danilova Ludmila, Favorov Alexander, Fertig Elana, Bishop Justin, Khan Zubair, Flam Emily, Wysocki Piotr T., DeJong Peter, Ando Mizuo, Liu Chao, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Haft Sunny, Sadat Sayed, Califano Joseph A.	4. 巻 143
2. 論文標題 Discovery and development of differentially methylated regions in human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2425 ~ 2436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31778	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 Liu Chao, Guo Theresa, Xu Guorong, Sakai Akihiro, Ren Shuling, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Sadat Sayed, Saito Yuki, Khan Zubair, Fisch Kathleen M., Califano Joseph	4. 巻 24
2. 論文標題 Characterization of Alternative Splicing Events in HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Identifies an Oncogenic DOCK5 Variant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5123-5132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-0752	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 酒井昭博
2. 発表標題 頭頸部癌における選択的スプライシングを介した発癌機構の解明
3. 学会等名 第42回 頭頸部癌学会
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

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
---------	---------