

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17174

研究課題名(和文)新規口腔がん関連長鎖non-coding RNAの機能解析と臨床応用

研究課題名(英文) Identification of long non-coding RNAs potentially involved in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

西山 廣陽(nishiyama, koyo)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60749563

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)：口腔がんの進展に関与するlncRNAをスクリーニングし、新規口腔がん関連lncRNAとしてDLEU1を同定した。さらにDLEU1のノックダウンが口腔がん細胞の増殖、遊走・浸潤、in vivo腫瘍形成能を強く抑制することを見いだした。また我々はDLEU1の下流標的遺伝子としてHAS3、CD44、TP63を同定した。HA-CD44シグナルは、口腔がんの進展を促すことが知られている。本研究では、口腔がんにおけるDLEU1の詳細な分子機能、特にDLEU1とHA-CD44を結ぶ作用機序とその臨床的意義を明らかにする事で、診断・治療に応用しうる知見を得られる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、新規口腔がん関連lncRNAとしてDLEU1を同定した。DLEU1は口腔がん細胞において高頻度に発現上昇しており、そのノックダウンはin vitroでの増殖、遊走、浸潤、そしてin vivoでの腫瘍形成能を抑制したことから、有望な治療標的分子と考えた。DLEU1と相互作用する分子や、関与するシグナル経路など、詳細な分子機構にはいまだ不明な点が残されている。それらを解明する事で、新規診断・治療法の開発につなげることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we identified lncRNAs functionally associated with OSCC. By analyzing RNA-seq datasets obtained from primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Among those, we found that knocking down lncRNA (DLEU1) strongly suppressed OSCC cell proliferation. DLEU1 knockdown also suppressed migration, invasion and xenograft formation by OSCC cells, which is suggestive of its oncogenic functionality. Microarray analysis revealed that DLEU1 knockdown significantly affects expression of a number of cancer-related genes in OSCC cells, including HAS3, CD44 and TP63, suggesting that DLEU1 regulates HA-CD44 signaling. Expression of DLEU1 was elevated in 71% of primary OSCC tissues, and high DLEU1 expression was associated with shorter overall survival of HNSCC patients. These data suggest that elevated DLEU1 expression contributes to OSCC development, and that DLEU1 may be a useful therapeutic target in OSCC.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔がんは約 90%が扁平上皮癌に分類され、口腔がんの治療には手術、化学療法及び放射線治療を組み合わせた集学的治療が行われる。しかし進行癌や再発癌では治療効果が不十分な場合も多く、口腔がんの 5 年生存率は約 50%である。そのため口腔癌治療における新たな治療標的が求められている。

近年の研究ではヒトゲノムの解読により、タンパク質をコードする遺伝子領域は全ゲノムの 2% 以下しか存在しないことが明らかとなった。一方で精力的なトランスクリプトーム解析により、ゲノム領域の約 60%からは何らかの RNA が転写されていることが示され(Dunham et al. Nature, 2012)、その大半は長鎖非コード RNA(long non-coding lncRNA, 以下 lncRNA)であると考えられている。

lncRNA の代表的な分子機能として、核に局在して転写因子やクロマチン修飾因子の足場となり標的遺伝子の転写を制御する働きと、細胞質に局在してマイクロ RNA (以下 miRNA) と結合することで標的遺伝子との相互作用を競合的に阻害する competitive endogenous RNA (ceRNA)としての機能が知られている。しかし一方で、lncRNA の大部分はいまだに機能が明らかにされていない。また口腔がんにおける lncRNA の研究報告はいまだ非常に少ないのが現状である。

2. 研究の目的

近年の研究では長鎖非コード RNA (long non-coding RNA: lncRNA) の癌における発現異常及び癌の進展への関与が次々と示されている。一方で口腔癌における lncRNA の病的意義や分子生物学的機能は不明な部分が数多い。本研究では口腔扁平上皮癌 (Oral Squamous Cell Carcinoma: OSCC) で癌の進展に関与しうる lncRNA を同定し、その機能的・臨床的意義を明らかにすることで、診断・治療応用につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1). 研究対象

The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースに登録されている head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) 530 症例の RNA シークエンスデータを用いて lncRNA の発現量を解析した。18 種類の OSCC 細胞株を用いて、同定した lncRNA の発現および機能を解析した。札幌医科大学口腔外科で外科的に切除された OSCC 症例 29 例から RNA を抽出し、lncRNA 発現を解析した。

(2). 定量 RT-PCR による発現解析

18 種類の OSCC 細胞株における lncRNA の発現を定量 RT-PCR 法で解析した。DLEU1 に対する 2 種類の siRNA (siDLEU1-1, 2) をトランスフェクションし、72 時間に発現抑制効率を定量 RT-PCR 法で検証した。OSCC 臨床検体における DLEU1 の発現を定量 RT-PCR 法で確認した。

(3). siRNA による lncRNA ノックダウン

6 種類の lncRNA に対する siRNA を OSCC 細胞株にトランスフェクションし、OSCC 細胞の増殖に与える影響を cell viability assay により検証した。

(4). 細胞増殖・遊走・浸潤アッセイ

OSCC 細胞株に DLEU1 に対する siRNA をトランスフェクションし、DLEU1 のノックダウンが増殖に与える影響を cell viability assay で検証した。また細胞の遊走・浸潤能に与える影響を、wound healing assay、Boyden chamber アッセイにより解析した。

(5). 細胞周期・アポトーシス解析

OSCC 細胞に DLEU1 に対する siRNA をトランスフェクションし、DLEU1 ノックダウンが細胞周期に与える影響をフローサイトメトリーにより解析した。またアポトーシスに与える影響を、Annexin V / PI 染色とフローサイトメトリーにより解析した。

(6). xenograft 解析

OSCC 細胞に DLEU1 に対する siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に 1×10^7 個の細胞をヌードマウスの両側背部皮下に移植した。移植後 1 週間後より腫瘍径の測定と、siRNA の局注を行って 27 日後に腫瘍を摘出した。腫瘍径、重量を測定し HE 染色および Ki-67 染色を行った。

(7). マイクロアレイ解析

OSCC 細胞に DLEU1 に対する siRNA をトランスフェクションし、72 時間後に total RNA を抽出した。マイクロアレイ解析を行い、DLEU1 ノックダウンにより発現変動する遺伝子を抽出した。データ解析には Gene Spring GX ソフトウェアを使用した。アレイ解析で同定された遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法により検証した。

4. 研究成果

(1). OSCC における lncRNA の発現スクリーニング

RNA シークエンスデータ解析の結果、頭頸部扁平上皮癌で有意に発現亢進を示す lncRNA を 15 種類抽出した。定量 RT-PCR 法を用いて、それらの lncRNA の発現を 18 種類の OSCC 細胞株で解析した結果、14 種類の lncRNA の発現亢進を確認した。

(2). Cell viability assay による lncRNA の機能的スクリーニング

上記で同定した lncRNA のうち、特に高頻度に発現亢進を認めた 6 種類の lncRNA (DLEU1, LINC00941, LINC00460, TCONS_00015845, TCONS_00025137, TCONS_00005474) について機能スクリーニングを行った。5 種類の OSCC 細胞株 (HSC-3, KON, Ca9-33, MOT, SAS) に、lncRNA に対する siRNA をトランスフェクションして cell viability assay を行った。その結果、DLEU1 (deleted in lymphocytic leukemia 1) に対する siRNA が最も高い増殖抑制効果を示したことから、がん遺伝子的に機能する lncRNA 候補と考え、さらに機能解析を進めた。

(3). DLEU1 の機能解析

Migration assay, wound healing assay, invasion assay の結果、DLEU1 のノックダウンは OSCC 細胞の遊走能、浸潤能を抑制した。フローサイトメトリー解析から、DLEU1 のノックダウンが細胞周期の G2 期停止及びアポトーシスを誘導することが明らかとなった。また xenograft 解析から、DLEU1 のノックダウンが in vivo での腫瘍形成能を優位に阻害することが示された。摘出した xenograft を免疫染色した結果、DLEU1 ノックダウン群はコントロール群と比較して、Ki-67 陽性細胞数が有意に減少していた。これらの結果から DLEU1 が OSCC において癌遺伝子的に働く可能性が示唆された。

(4). DLEU1 ノックダウンによる遺伝子発現プロファイルの変化

3 種類の OSCC 細胞株 (HSC-3, KON, Ca9-22) を用いて DLEU1 ノックダウンにより発現変動する遺伝子をマイクロアレイにより解析した結果、3 株に共通して変動する 814 遺伝子を同定した。Gene Ontology 解析の結果、それらの遺伝子は細胞増殖、分化、運動に関与することが示された。またパスウェイ解析から、マトリックスプロテアーゼ、アポトーシス、細胞周期、MAPK シグナルなど癌の増殖、浸潤に関わるパスウェイに関わる遺伝子が多いことが示された。マイクロアレイの結果を定量 RT-PCR で検証した結果、HAS3, CD44, BCL2L10, HOXD8, PRDM4, SMYD2, SETD6, KDM1B など、癌との関わりが知られる遺伝子が DLEU1 ノックダウンにより発現低下することが確認された。また CDH1 が DLEU1 ノックダウンにより発現上昇することが確認された。

(5). 口腔癌における DLEU1 発現と予後との関係性

DLEU1 の臨床的意義を解析するため、TCGA の頭頸部扁平上皮癌の発現データを用いた解析を行った。その結果、DLEU1 は正常組織に比べて癌組織で有意に発現亢進し、かつ予後不良と有意に相関した。次に札幌医科大学付属病院口腔外科で切除された OSCC 臨床検体 29 例を解析した結果、癌組織における DLEU1 の発現亢進を認めた。29 例中 17 例では、隣接する正常粘膜組織を得ることができたため、17 例の癌部・対照正常部での DLEU1 発現を比較した結果、12 例(71%)において癌部で有意な発現亢進を認めた。

(6). 考察

DLEU1 は慢性リンパ性白血病(CLL)において高頻度に欠失する染色体 13q14 に位置する。この領域は癌抑制遺伝子として有名な RB1 も存在することから、当初 DLEU1 は CLL の癌抑制遺伝子候補として同定された。しかし DLEU1 遺伝子そのものの機能に関する研究報告は少なく、CLL 以外の悪性腫瘍における役割も明らかではないが最近、上皮性卵巣癌において DLEU1 が過剰発現し、癌遺伝子的に機能することが報告された。これらのことから DLEU1 は癌種によって異なる機能を示す可能性が推測される。本研究の結果、OSCC では DLEU1 が高頻度に過剰発現し、そのノックダウンによって OSCC 細胞の増殖、遊走、浸潤が顕著に抑制されること、そして細胞周期停止及びアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。またマウス xenograft 実験から、DLEU1 のノックダウンは in vivo における腫瘍形成能を阻害することも示された。これらの結果は OSCC において DLEU1 の過剰発現が、腫瘍促進的に機能することが示唆された。またマイクロアレイ解析の結果、DLEU1 のノックダウンは HAS3, CD44 の発現を低下させた。HAS3 は細胞外ヒアルロン酸マトリックスを合成し、その過剰発現は HNSCC で癌の増殖、浸潤を促進することが知られている。また CD44 はヒアルロン酸をリガンドとするレセプターで、細胞膜に存在する接着分子であり HNSCC では癌幹細胞マーカーとして報告されている。CD44 の過剰発現は上皮間葉移行により転移を促進し、抗アポトーシス作用や MAPK シグナル活性化により腫瘍の増殖及び化学療法抵抗

性に關与する。これらの結果より DLEU1 が HAS3 を標的とし、HAS3-CD44 シグナルを活性化させることで OSCC の進展に寄与する可能性が考えられた。また DLEU1 の発現抑制は SMYD2, SETD6, KDM1B の発現を減弱させた。これらの遺伝子はヒストンメチル修飾により癌の増殖に關わるとされ、DLEU1 は癌のエピジェネティック制御に關与する可能性も示唆された。一方、DLEU1 の発現抑制は CDH1 の発現を上昇させた。CDH1 (E-cadherin) は DNA メチル化により発現抑制され、がんの遊走、浸潤を抑制するがん抑制遺伝子として知られている。これらの結果より、DLEU1 のノックダウンは多数のがん関連遺伝子に影響を与え、それが抗腫瘍効果につながっていることが推測された。また DLEU1 は OSCC において高頻度に過剰発現していることから、新たな治療標的として応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koyo Nishiyama, Reo Maruyama, Takeshi Niinuma, Masahiro Kai, Hiroshi Kitajima, Mutsumi Toyota, Yui Hatanaka, Tomohiro Igarashi, Jun-ichi Kobayashi, Kazuhiro Ogi, Hironari Dehari, Akihiro Miyazaki, Akira Yorozu, Eiichiro Yamamoto, Masashi Idogawa, Yasushi Sasaki, Tamotsu Sugai, Takashi Tokino, Hiroyoshi Hiratsuka and Hiromu Suzuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-018-0893-2	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Koyo Nishiyama, Reo Maruyama, Hiroshi Kitajima, Takeshi Niinuma, Kazuhiro Ogi, Hironari Dehari, Akihiro Miyazaki, Akira Yorozu, Eiichiro Yamamoto, Masahiro Kai, Takashi Tokino, Hiromu Suzuki
2. 発表標題 Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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
---------	---------