

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10080

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌の悪性転化におけるクロマチン・リモデリング

研究課題名(英文) Chromatin remodeling in malignant progression of head-and-neck squamous cell carcinomas

研究代表者

倉田 俊一 (Kurata, Shun-ichi)

神奈川歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：60140901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部(口腔・咽頭・喉頭)癌の浸潤癌への進行の機構を知るために、表皮細胞分化に不可欠とされる遺伝子TP63を標的に癌の培養細胞でゲノム編集を行った。多数の遺伝子で大幅な発現上昇または低下の変化が起こり、癌の進行で見られる上皮間葉転換の現象に類似していた。DNAメチル化・脱メチル化が選択的に遺伝子領域で起こっており、クロマチン・リモデリングによる遺伝子発現の調節と考えられた。エピゲノム調節を介して浸潤癌への進行が起こ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

本研究では頭頸部扁平上皮癌の細胞株を実験系とし、高分化型の癌が浸潤癌に進行する過程で起こる核内の変化を解析した。得られた結果は、DNAメチル化・脱メチル化を中心とするクロマチン・リモデリングによって、遺伝子発現プロファイルが大きく変化し、上皮間葉転換(浸潤能獲得)が起こることを示唆した。癌の悪性転化を理解するには、個々の遺伝子の変異に加えて、ゲノムワイドなクロマチン構造の変化とそれが起こる機構を解析することが重要と思われる。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism of malignant progression of head-and-neck carcinomas, we performed genome editing targeting TP63 gene which is essential for epidermal cell differentiation. The knockout cells showed massive changes in gene expression profile characteristic to epithelial to mesenchymal transition, an event observed in cancer progression. Furthermore, DNA methylation and demethylation selectively occurred in the promoter and body of genes, indicating chromatin remodeling. These results suggest that the process of malignant progression of head-and-neck carcinomas is controlled epigenetically.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 TP63

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がんゲノミクス研究により、各組織の発がんを駆動する遺伝子変異が多数明らかにされたが、多様な上皮癌の浸潤・転移を誘発する遺伝子変異は同定されず、その過程は癌と周辺の微小環境との相互作用によるという仮説さえあった[1]。

(2) 一方、p63 (TP63、p51)は日本で発見されたがん抑制遺伝子 p53 (TP53)ファミリーの遺伝子で、高分化型の(悪性度の低い)頭頸部扁平上皮癌(口腔・咽喉頭の癌)などで高発現する。上皮癌が浸潤癌に進展すると p63 の発現が消失していることが臨床研究で広く知られ、p63 が癌の悪性転化を抑制する可能性が考えられた。また、表皮組織発生の研究で、p63 のエピジェネティック調節機能によってケラチノサイト分化が誘導されることが報告されていた[2]。

(3) 研究代表者らは、頭頸部癌において p63 がゲノム広域のクロマチン構造を調節することにより細胞の分化誘導機能を果たしているが、p63 の発現が失われると逆のクロマチン構造が生じて、癌の悪性転化を許すのではないかと考えた。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌の進行では p63 の発現が失われることによりクロマチンの大幅な構造変化(クロマチン・リモデリング)が起こり、遺伝子発現パターンが大胆に変化して、浸潤・転移能が獲得されることを明らかにする。

具体的には、頭頸部扁平上皮癌の培養細胞で次の内容を検証する。

(1) p63 の発現が消失することによって起こる細胞の総合的な遺伝子発現パターンの変化を明らかにし、その遺伝子発現の変化が、上皮間葉転換(EMT)および浸潤能獲得で検出される典型的な変化であることを示す。

(2) (1)にともなって起こるクロマチン構造の変化、特にヒストンアセチル化および(または)DNAメチル化の変化を明らかにする。クロマチン修飾が明確な変化を示した領域と(1)の遺伝子発現の変化を対応させる。

3. 研究の方法

(1) 高分化型扁平上皮癌細胞株(FaDu, A431等)で p63 を標的としてゲノム編集(CRISPR-Cas9)によるノックアウト(Homology Directed Repair)および siRNA トランスフェクション法(RNA干渉)によるノックダウンを行なった。

(2) 遺伝子発現プロファイルの解析。親株細胞、ノックアウト細胞株、ノックダウン細胞から RNA を精製し、DNA マイクロアレイによる発現プロファイル解析を行った。GO term enrichment 解析からどのような生物学的プロセスの遺伝子発現が変化したのかを調べ、抽出された GO term と関連付けられている各遺伝子に注目し RT-qPCR で定量化した。

(3) エピジェネティック解析。

ヒストンアセチル化・メチル化のゲノム・マッピング。ヒストン 3-リジン 27 アセチル化(H3K27ac)抗体を使用して ChIP(クロマチン免疫沈降)を行い、抽出・精製した DNA 断片に関して qPCR によるエンハンサー検出を試みた。

Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)法による 4 百万以上の生物学的に重要な CpGs 配列をカバーするメチル化サイトの解析を行った。

(4) 全ゲノム配列の解析

次世代シーケンス解析を行い、FaDu 細胞株が本来持つ遺伝子変異や SNP、およびゲノム編集細胞に挿入された変異を検出した。

4. 研究成果

(1) TP63 exon-1 ノックアウトとノックダウン。TP63 は exon-1 から開始される TA-p63 と exon-3' から開始される Δ N-p63 の 2 種類の転写様式があり、TA-p63 の発現は微少で Δ N-p63 の発現が 99% 以上を占める。非常に興味深いことに、exon-1 を CRISPR-Cas9 でノックアウトした FaDu 細胞では、 Δ N-p63 の発現もサイレンシングを受けており、TP63 遺伝子全体の発現が検出できなくなっていた。TA-p63 のトランス活性化作用により Δ N が活性化されることが以前に報告されており[3]、我々の結果はその仮説を支持する。この機構についてはさらなる検討が必要であるが、得られた exon-1 のゲノム編集細胞を TP63 ノックアウト細胞として本研究に使用することにした。また、RNA 干渉法では我々の実験で有用性が確認されている 2 つの siRNA を使用した。FaDu

細胞ほかいくつかの扁平上皮癌細胞では siRNA トランスフェクションにより 85% の p63RNA を消失させることができた。A431 細胞でも同じ方法で薬剤耐性による選択を試みたが、標的遺伝子の編集細胞を樹立に成功しなかった。

(2) 遺伝子発現プロファイルの劇的な変化。マイクロアレイによる遺伝子発現解析では、1169 もの遺伝子発現が $\log_2(\text{scale signal})$ で 5 倍以上 ($\geq \text{foldchange}$) の変化 (上昇または低下) が見られた。GO term enrichment 解析を行うと、細胞外基質 (ECM) の組織化、ヘミデスモソーム形成、細胞接着、が高頻度に現れ、これらの GO term を付与されている遺伝子について RT-qPCR で量的な変化を確認した。次に述べる遺伝子の多くは RT-qPCR で ≥ 100 (上昇/低下) の変化が確認された。では ECM 遺伝子ラミニン (LAMA1)、コラーゲン (COL4A4 ほか)、フィブロネクチン (FN1) の発現上昇、インテグリン 3、4 (ITGA3、ITGB4) の低下が確認された。ヘミデスモソームを構成する膜結合型 ECM である COL17A1 や LAMC3、ケラチン 5 (KRT5)、ITGB4 が著しく低下した。細胞接着遺伝子では E カドヘリン (CDH1)、細胞間接着分子 1 (ICAM1)、タイトジャンクション構成タンパク質 CLDN1、-4 などが低下する一方、神経細胞接着因子 (NCAM1) が上昇した。

これらの結果は、上皮間葉転換で起こる変化と比較して、多くのオーバーラップが見られた。特に KRT5 が抑制され、代わってビメンチン (VIM) が大幅な発現上昇するなどの典型的な変化が検出された。さらに、表皮特異的遺伝子 keratinocyte-specific genes [4] として報告された 76 遺伝子のうち 57 遺伝子がマイクロアレイで発現低下が認められ、そのうち 10 遺伝子は RT-qPCR で 0.02 ~ 0.001 倍に低下することを確認した。

(3) p63 消失に伴う DNA メチル化の変化。(RRBS)法による解析を行うことにより、多数の遺伝子のプロモータ領域および遺伝子本体の CpG メチル化の変化を明確に検出することができた。上の ~ で記した遺伝子の半数以上で、発現の変化と DNA メチル化の変化に明らかな相関がみられた。例えば、発現が低下した ITGB4、LAMC3、KRT5、CLDN4 のプロモータ領域または遺伝子本体のメチル化増強が確認できた。逆に、発現上昇した遺伝子 FN1、VIM、NCAM1 では脱メチル化が確認できた。p63 が消失することにより遺伝子特異的にメチル化・脱メチル化の変換が起こると考えられた。

しかし、すべての変化が DNA メチル化で説明できるわけではなかった。例えば過去に我々が TP63 の標的として報告した ITGA3 遺伝子 [5] は p63 消失により発現が低下したが、それを説明するような DNA メチル化の変化は見られなかった。クロマチン修飾によらず、p63 による直接の転写制御を受ける種々の遺伝子が知られている。

また、ヒストンアセチル化の解析ではごく一部のプロモータが検出されるにとどまり、発現パターンの変化と相関するような結果を得ることができなかった。DNA の断片化、ChIP の条件設定、PCR の標的の選択などに問題があったと考えている。

(4) FaDu およびゲノム編集細胞の全ゲノム配列解析。本研究ではまず扁平上皮癌の親株細胞 FaDu と得られた p63 編集細胞に関して TP63 の exon-1 内 PCR で増幅し編集部位を確認した。次に全ゲノムシーケンス解析を行い、FaDu 細胞自体が本来持っている遺伝子変異 (3,249,374) に加えて、2 回の CRISPR-Cas9 トランスフェクションを経て得られた編集細胞では 801,617 の変異が検出された (フィルター処理、確率 $> 99\%$)。すでに多くの研究から報告されたように、癌細胞で CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を行うと、標的部位以外で DNA 開裂反応がおこり (Off-target 効果) おびたしい数の遺伝子変異が挿入されることが知られている [6, 7]。本研究でも off-target 効果による変異導入が多数あったことが分かった。新たに加わった変異の殆どが SNP (679,289) であり、残りは 1,2 塩基の Indel (122,328) だった。その Indel の多数は遺伝子間の配列や、イントロンにあった。High Impact の変異を有する遺伝子が 84 あり、そのうち 6 遺伝子が転写制御因子をコードしていたが、TP63 遺伝子の発現に関わる因子はなかった。

(5) 結果の考察。本研究課題では、頭頸部癌の進行における DNA メチル化・脱メチル化を中心クロマチン・リモデリングの重要性と、その過程に p63 の発現消失が関与することを明らかにした。癌の臨床で見られる p63 発現低下と癌の進行の関連、ノックアウトマウスの表現型、その他の知見を総合すると、結果 (2)(3) に述べた変化の多くは、ゲノム編集の off-target 効果ではなく、TP63 の消失によって誘導された生物学的な帰結と考えられる。また、研究代表者らは p63 タンパク質がヒストンアセチル基転移酵素活性を持つ p300 と結合することを発見しており [8]、ヒストンアセチル化がクロマチン修飾の変化の一部として寄与すると思われる。p63 のトランス活性化能やドミナント・ネガティブ型制御能はよく知られている機能であるが、そのような直接的な転写制御の研究結果では p63 消失による浸潤癌への進行を十分に説明することはできず、むしろ補完的な機能とも考えられる。

- [1] Friedl P, Alexander S (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity *Cell* **147**, 992-1009.
- [2] Kouwenhoven EN, Oti M, Niehues H, van Heeringen SJ, Schalkwijk J, Stunnenberg HG, van Bokhoven H, Zhou H (2015). Transcription factor p63 bookmarks and regulates dynamic enhancers during epidermal differentiation *EMBO Rep* **16**, 863-878.
- [3] Antonini D, Rossi B, Han R, Minichiello A, Di Palma T, Corrado M, Banfi S, Zannini M, Brissette JL, Missero C (2006). An autoregulatory loop directs the tissue-specific expression of p63 through a long-range evolutionarily conserved enhancer *Mol Cell Biol* **26**, 3308-3318.
- [4] Gazel A, Ramphal P, Rosdy M, De Wever B, Tornier C, Hosein N, Lee B, Tomic-Canic M, Blumenberg M (2003). Transcriptional profiling of epidermal keratinocytes: comparison of genes expressed in skin, cultured keratinocytes, and reconstituted epidermis, using large DNA microarrays *J Invest Dermatol* **121**, 1459-1468.
- [5] Kurata S, Okuyama T, Osada M, Watanabe T, Tomimori Y, Sato S, Iwai A, Tsuji T, Ikawa Y, Katoh I (2004). p51/p63 Controls subunit alpha3 of the major epidermis integrin anchoring the stem cells to the niche *J Biol Chem* **279**, 50069-50077.
- [6] Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G (2013). CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity *Nucleic Acids Res* **41**, 9584-9592.
- [7] Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells *Nat Biotechnol* **31**, 822-826.
- [8] Katoh I, Maehata Y, Moriishi K, Hata RI, Kurata SI (2019). C-terminal alpha Domain of p63 Binds to p300 to Coactivate beta-Catenin *Neoplasia* **21**, 494-503.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Iyoko Katoh, Fuminori Tanabe, Hirotake Kasai, Kohji Moriishi, Noriko Shimasaki, Katsuaki Shinohara, Yukiko Uchida, Tomoko Koshiba, Soichi Arakawa, Michiko Morimoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Potential Risk of Virus Carryover by Fabrics of Personal Protective Gowns	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Public Health	6. 最初と最後の頁 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpubh.2019.00121.	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 Iyoko Katoh, Yojiro Maehata, Kohji Moriishi, Ryu-Ichiro Hata, Shun-ichi Kurata	4. 巻 21
2. 論文標題 C-terminal Domain of p63 Binds to p300 to Coactivate -Catenin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 494 ~ 503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neo.2019.03.010	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 Yang XY, Ozawa S, Kato Y, Maehata Y, Izukuri K, Ikoma T, Kanamori K, Akasaka T, Suzuki K, Iwabuchi H, Kurata SI, Katoh I, Sakurai T, Kiyono T, Hata RI.	4. 巻 20
2. 論文標題 C-X-C Motif Chemokine Ligand 14 is a Unique Multifunctional Regulator of Tumor Progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1872 ~ 1872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20081872	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iyoko Katoh, Ryu-Ichiro Hata, Shun-ichi Kurata
2. 発表標題 Impacts of TA-p63 specific exon knockout by genome editing: DeltaN-p63 silencing and loss of cell differentiation
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	加藤 伊陽子 (KatoH Iyoko) (20333297)	神奈川歯科大学・歯学部・特任教授 (32703)	

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