

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19153

研究課題名(和文) 口腔癌における転写増強機序 tandem duplicator の分布の全ゲノム解析

研究課題名(英文) Whole-genome analysis of the distribution of tandem duplicator, a transcriptional enhancement mechanism in oral cancer

研究代表者

宮本 勲 (Miyamoto, isao)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00741836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究室保有の口腔扁平上皮癌細胞株に対して放射線照射を行い、細胞生存曲線を作製し、放射線耐性株および感受性株を同定した。同定した細胞株に対して次世代シーケンスを用いて全ゲノム的に解析を行った。解析結果により放射線治療前後でコピー数多型(CNV)の変異の生じた領域を検索し、CNVの傾向によってそれぞれの領域で特異的に発現している遺伝子を抽出した。これらの遺伝子は放射線耐性や感受性に関与していると考えられ、今後さらなる研究対象や標的因子となりうる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌発生過程においては、多くの遺伝子による系統的な異常が積み重なることが原因であると考えられている。近年、mutationなどの単純な構造異常ばかりではなく、遺伝子配列の繰り返し構造である tandem duplicator(TD)の全ゲノム上における分布状態やコピー数多型(CNV)が系統的意義を有することが提唱されている。これらは非常に強力な遺伝子発現システムであり、本研究では全ゲノムワイドな解析によりTDやCNVがどのような領域で起きているかを検討し、その分布状況を明らかにし、口腔癌発生や治療抵抗性獲得にどのように関与しているかを検討するという学術的意義が考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, oral squamous cell carcinoma cell lines were irradiated, and radiation-resistant and radiation-sensitive cell lines were identified. The identified cell lines were analyzed using a next-generation sequence analysis. Based on the results, copy number variation (CNV) were investigated with/without irradiation, and genes specifically expressed in the regions were identified. These results suggested that these genes may be potential targets for further research and target factors in the future.

研究分野：分子生物学

キーワード：次世代シーケンス tandem duplicator CNV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌発生に関しては「これぞ driver gene」というほどの決定的な役割を果たす遺伝子は絞り込まれておらず、多くの遺伝子の構造異常や発現異常が積み重なることによって発症する可能性が考えられている。近年、次世代シーケンサーの登場により、全ゲノム規模での構造異常解析が可能となり、シーケンス解析研究によりゲノム配列の様々な構造変化が明らかにされ、癌の発生、浸潤・転移、治療抵抗性などに特徴的な系統的構造変化が重要な役割を果たしていることが再確認されるようになった。その中で、遺伝子配列の繰り返し構造である Tandem duplicator (TD) は非常に強力な遺伝子発現システムであり、その全ゲノム上における分布による系統的遺伝子発現が起こり、発生・分化、癌化のような系統的役割を果たすことが分かってきた。また、同時にコピー数多型 (CNV) についても検索する。CNV とは、近年提唱されている個体間でのコピー数の異なる遺伝子領域が多様な表現型を担っている遺伝子構造である。CNV は、薬剤などの抵抗性や副作用の違いなど個人の体質の差に関与すると言われている。本研究において、全ゲノムワイドな解析により TD および CNV がどのような領域・遺伝子で起きているかを検討し、その分布状態を明らかにし、治療抵抗性獲得にどのように関与しているのかを検討する。

2. 研究の目的

本研究では、口腔癌における Tandem duplicator (TD) およびコピー数多型 (CNV) の全ゲノムにおける分布と頻度を明らかにし、TD、CNV の発現領域および形成遺伝子の組み合わせを検討し、疾患特異性、治療抵抗性の獲得への関与を検討する。

3. 研究の方法

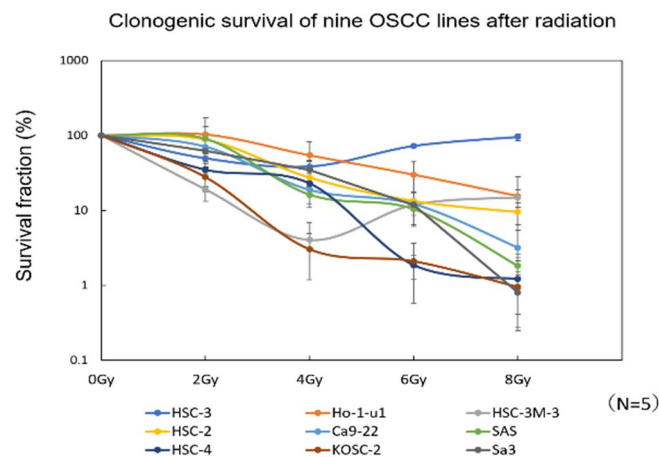
従来の研究で研究室が保有している口腔扁平上皮癌細胞株、耐性度が異なる放射線耐性細胞株を用いて以下の実験を行う。

- 1) 口腔扁平上皮癌細胞株 9 種に対して、放射線を照射し、Clonogenic survival assay を行い、放射線耐性株及び感受性株を同定する。
- 2) 放射線耐性株及び感受性株に対して次世代シーケンサーを用いて全ゲノムを検索し、遺伝子の繰り返し構造である TD、遺伝子のコピー数の差である CNV の存在をゲノム上にマッピングする。
- 3) 解析結果より放射線耐性株と感受性株を比較し、遺伝子構造上での比較を行い、その差異上に存在する遺伝子を抽出する。

4. 研究成果

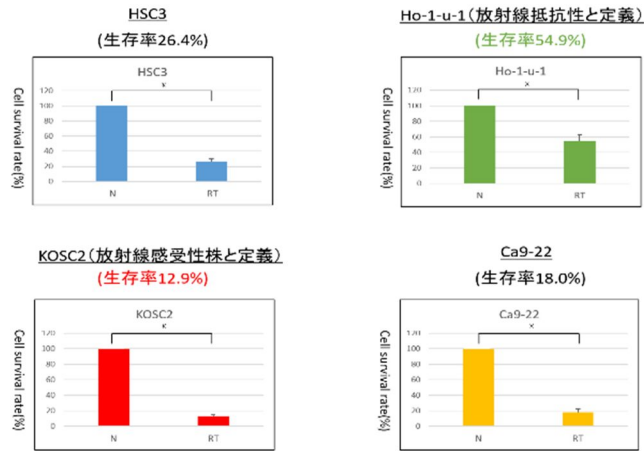
(1). 放射線感受性の比較。

研究室が保有している口腔扁平上皮癌細胞株 9 種 (HSC-2、HSC-3、HSC-3M3、HSC-4、KOSC-2、Ca9-22、Sa3、SAS、Ho-1-u1) に対して、放射線を照射 (0-8Gy) の単回照射を行い fraction curve を作成した。



(図1. Clonogenic survival of nine OSCC lines after radiation)

放射線耐性株の樹立には明確な方法はまだ確立されていない。本研究では、上記の図1より放射線耐性傾向上位2種 (HSC-3, Ho-1-u1)、中位株 (Ca9-22)、感受性傾向株 (KOSC-2) を抽出して 2Gy × 5 日間、計 10Gy を照射することで放射線治療に準じた環境下において生存率を比較した。



(図2. 放射線照射後の細胞生存率)

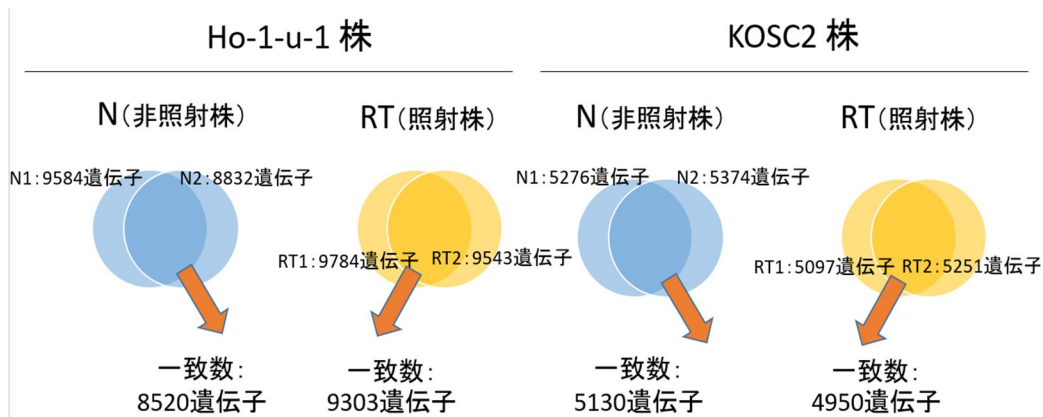
その結果、HSC-3、Ho-1-u1、Ca9-22、KOSC-2 でそれぞれ 26.4%、54.9%、18.0%、12.9%の生存率となり、Ho-1-u1 を放射線耐性株細胞株、KOSC-2 を放射線感受性細胞株と定義した。(図.2)

(2). 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析。

放射線抵抗性株および感受性株について次世代シーケンスを用いて全ゲノム解析を行い、CNV及びTDP発現の変異をパターン化し比較検討した。

Ho-1-u1 及び KOSC-2 について各 2 検体ずつ解析し、それぞれにおける CNV の変化を検索した。Ho-1-u1、KOSC2 の放射線未照射株を(N1、N2)、放射線照射株を(RT1、RT2) とし、共通している領域、コピー数を 2 検体間で統合し、その領域に含まれている遺伝子数を算出した。

下図のように、Ho-1-u1 の放射線未照射株では N1 で 9584 遺伝子、N2 で 8823 遺伝子あり共通しているものは 8520 遺伝子あった。放射線照射株では RT1 で 9784 遺伝子、RT2 で 9543 遺伝子あり、共通しているものは 9303 遺伝子であった。また、KOSC2 の放射線未照射株では N1 で 5276 遺伝子、N2 で 5374 遺伝子あり、共通しているものは 5130 遺伝子であった。また、放射線照射株では RT1 で 5097 遺伝子、RT2 で 5251 遺伝子あり、共通しているものは 4950 遺伝子であった。(図.3) 以上のようにほとんどの領域で一致しており、検体間での差がないことを確認した。



(図3. 細胞株間における共通領域における遺伝子数の比較)

(3). 遺伝子構造の比較検討。

Ho-1-u-1 株、及び KOSC-2 株において、放射線非照射株(N1,N2)、放射線照射株(RT1,RT2)でそれぞれ一致している遺伝子を抽出しコピー数を検索し、条件分けすることで候補遺伝子を推定した。

条件 1)放射線照射によって抵抗性株、感受性株ともに解析できコピー数に変化があった遺伝子。下記の通り、Chr18 の Ho-1-u-1 株で N と比較して RT で大幅にコピー数の増加を認め、KOSC-2 株でも RT でやや増加を認めた領域。同領域には ROCK1P1 が存在した。(表.1)

copy number	Ho-1-u-1				KOSC2				Gene
	N1	N2	RT1	RT2	N1	N2	RT1	RT2	
Chr18	97	48	147	191	237	237	243	246	ROCK1P1

(表 1.放射線照射によって CNV の増加を認めた領域)

条件 2)放射線照射によって抵抗性株、感受性株ともに消失した遺伝子。
下記の通り、Chr12 の Ho-1-u-1 株、KOSC-2 株共に放射線照射によって領域の消失を認めた領域。
同領域には ANO2、LINC02443、SNORA129、VWF が存在した。(表.2)

copy number	Ho-1-u-1				KOSC2				Gene
	N1	N2	RT1	RT2	N1	N2	RT1	RT2	
Chr12	5	3	x	x	3	3	x	x	ANO2,LINC02443, SNORA129,VWF

(表 2.放射線照射によって CNV の消失を認めた領域)

条件 3)放射線照射によって抵抗性株のみ消失した遺伝子。
下記の通り、Chr6,8,12,19,22 において Ho-1-u-1 株の放射線照射のみで消失を認めた領域。同領域には、TMEM242、ASNSP1、LINC00293、LOC100287846、SPIDR、BHLHE41、INTS13、ITPR2、MIR4302、RASSF8、RASSF8-AS1、SSPN、ALG10、SNAR-B1、SNAR-B2、FAM230E、FAM230F、AIFM3、ARVCF、C22orf39、CCDC188、CDC45、CLDN5、CLTCL1、COMT、CRKL、DGCR10、DGCR11、DGCR2、DGCR5、DGCR6、DGCR6L、DGCR8、DGCR9、ESS2、FAM230G、GNB1L、GP1BB、GSC2、HURA、KLHL22、LINC00895、LINC00896、LINC01311、LINC01637、LOC102724770、LOC102724788、LOC284865、MED15、MIR1306、MIR185、MIR3618、MIR4761、MIR6816、MRPL40、PI4KA、POM121L4P、PRODH、RANBP1、RTL10、RTL4R、SCARF2、SEPT5GP1BB、SERPIND1、SLC25A1、SNAP29、SNORA77B、TANGO2、TBX1、TMEM191A、TRMT2A、TSSK2、TXNRD2、UFD1、ZDHHC8、ZNF74 が存在した。(表.3)

copy number	Ho-1-u-1				KOSC2				Gene
	N1	N2	RT1	RT2	N1	N2	RT1	RT2	
chr6	12	11	x	x	5	5	5	5	TMEM242
chr8	3	3	x	x	4	4	4	4	ASNSP1,LINC00293, LOC100287846,SPIDR
chr12	5	3	x	x	3	3	3	3	BHLHE41,INTS13,ITPR2,MIR4302, RASSF8,RASSF8-AS1,SSPN
chr12	4	3	x	x	3	3	3	3	ALG10
chr19	5	5	x	x	5	5	5	5	SNAR-B1,SNAR-B2
chr22	5	5	x	x	7	7	7	7	FAM230E
chr22	43	40	x	x	14	14	14	14	FAM230F
chr22	4	5	x	x	3	3	3	3	AIFM3,ARVCF,BCRP2,C22orf39,CCDC188, CDC45,CLDN5,CLTCL1,COMT,CRKL,DGCR1, DGCR11,DGCR2,DGCR5,DGCR6,DGCR6L,DGCR8, DGCR9,ESS2,FAM230G,GNB1L,GP1BB,GSC2, HIRA,KLHL22,LINC00895,LINC00896,LINC01311, LINC01637,LOC102724770,LOC102724788, LOC284865,LRR74B,LZTR1,MED15,MIR1286, MIR1306,MIR185,MIR3618,MIR4761,MIR649, MIR6816,MRPL40,P2RX6,P2RX6P,PI4KA, POM121L4P,PRODH,RANBP1,RTL10,RTL4R, SCARF2,SEPT5GP1BB,SERPIND1,SLC25A1,SLC7A4, SNAP29,SNORA77B,TANGO2,TBX1,THAP7,THAP7A, TMEM191A,TRMT2A,TSSK2,TUBA3FP,TXNRD2, UFD1,ZDHHC8,ZNF74

(表 3.放射線照射によって耐性株のみ CNV の消失を認めた領域)

条件 4)放射線照射によって感受性株のみ消失した遺伝子。
下記の通り、KOSC-2 株の放射線照射のみで消失を認めた領域。同領域には、SPANXB1 が存在した。(表.4)

copy number	Ho-1-u-1				KOSC2				Gene
	N1	N2	RT1	RT2	N1	N2	RT1	RT2	
chrX	3	3	3	3	2	2	x	x	SPANXB1

(図 4.放射線照射によって感受性株のみ CNV の消失を認めた領域)

(4).まとめ

本研究では、放射線耐性口腔癌細胞に対して、次世代シーケンスにて検索し、TD 領域やコピー数多型 CNV について検討しその原因となりうる候補遺伝子を同定することを目的とした。当科で保有する 9 種の細胞株に対して放射線照射を行い、放射線耐性株 (Ho-1-u-1) および放射線感受性株 (KOSC-2) を同定し、次世代シーケンスにて解析を行った。解析結果より各種細胞間で個体差のない共通した遺伝子数を検索し、放射線照射前後で CNV の変異の生じた領域を抽出した。さらに、CNV の変異の仕方によって場合分けを行い、それぞれの領域で特異的に発現している遺伝子を抽出した。これらの遺伝子は放射線照射によって出現、消失、コピー数の増加あるいは減少しているものであり、放射線耐性および感受性に関与している可能性がある。今後、qRT-PCR 行い、遺伝子の同定を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------