

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19239

研究課題名(和文) 口腔がん悪性度に關与するDLEU1の作用機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Functional analysis and clinical application of DLEU1 in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

畠中 柚衣 (Yui, Hatanaka)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60815265

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)：我々はDLEU1が口腔扁平上皮がんにおいて高発現することを明らかにした。本研究では、DLEU1が口腔がん細胞のエピゲノムに与える影響を解析した。その結果、DLEU1ノックダウンが、ヒストン修飾の変化を誘導すること、特に多数のインターフェロン応答遺伝子(ISG)のH3K4me3/H3K27acおよび発現レベルを低下させることを明らかにした。DLEU1により影響を受けるISGの一つIFITM1は、口腔がんにおいて高発現し、かつ増殖、遊走、浸潤を促進する働きを示した。これらのことから、DLEU1の腫瘍促進機能の少なくとも一部は、ISGの発現誘導を介することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんの5年生存率は約50%であり、さらなる治療標的の同定が求められている。近年、長鎖非コードRNA(lncRNA)のがんにおける役割が注目されており、研究報告数が増加している。しかし、1～2万種類存在するlncRNAの多くは、その機能が未だ不明である。これまで我々はDLEU1というlncRNAが口腔がんにおいて発現上昇し、かつ腫瘍促進的に機能することを明らかにしてきた。本研究では、DLEU1が口腔がん細胞のエピゲノム制御に関わること、DLEU1がインターフェロンシグナルを活性化すること、DLEU1によって活性化される下流標的遺伝子が腫瘍促進的に働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that DLEU1 is one of the long noncoding RNAs (lncRNAs) overexpressed in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells, where it exhibits oncogenic activity. Chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) analysis revealed that DLEU1 knockdown induced significant changes in the levels of histone H3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3) and H3K27 acetylation (H3K27ac) in OSCC cells. DLEU1 knockdown suppressed levels of H3K4me3/ H3K27ac and expression of a number of interferon-stimulated genes (ISGs), while ectopic DLEU1 expression activated these genes. Western blot analysis and reporter assays suggested that DLEU1 upregulates ISGs through activation of JAK-STAT signaling in OSCC cells. IFITM1, one of the ISGs induced by DLEU1, was frequently overexpressed in primary OSCC tumors, and its knockdown inhibited OSCC cell proliferation, migration and invasion. Our findings suggest that DLEU1 exerts its oncogenic effects, at least in part, through activation of ISGs in OSCC cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮がん noncoding RNA lncRNA エピゲノム がん遺伝子シグナル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮がん(OSCC の治療法として、外科手術、化学療法、放射線療法、免疫療法が行われている。しかし OSCC の 5 年生存率はいまだ約 50% であり、新たな治療法の開発や、治療標的分子の同定が求められている。

近年、長鎖非コード RNA (long noncoding RNA, lncRNA) のがんにおける働きが注目されており、多数の研究結果が報告されている。これまで我々は、lncRNA の一つである Deleted in lymphocytic leukemia 1 (DLEU1) が OSCC において高発現すること、DLEU1 が OSCC 細胞の増殖、遊走、浸潤を促進すること、そして DLEU1 が HAS3、CD44、TP63 などのがん遺伝子発現を制御することで、腫瘍促進的に働くことを報告した(Cell Death Dis, 2018)。

### 2. 研究の目的

今回我々は、DLEU1 の分子機能をさらに解明し、DLEU1 を標的とした治療法の開発につなげることを目的とした。そのために、DLEU1 が OSCC 細胞のエピゲノムに与える影響を解析することとした。さらに DLEU1 の標的シグナルや標的遺伝子を明らかにし、その機能を解析することとした。

### 3. 研究の方法

#### 細胞株および組織サンプル

OSCC 細胞株 (HSC3、Ca9-22、KON、HOC512) を解析対象とした。また 32 例の OSCC 原発巣臨床検体と、17 例の隣接する正常組織検体から RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出した。

#### 定量 RT-PCR 解析

OSCC 細胞株から抽出した RNA を用いて cDNA を合成し、遺伝子発現を定量 RT-PCR 法により解析した。内在性コントロールとして B2M 遺伝子を用いた。

#### ノックダウンと過剰発現

DLEU1 および IFITM1 (interferon-induced transmembrane protein 1) に対する siRNA と Negative control siRNA を、リポフェクション法を用いて OSCC 細胞株に導入した。DLEU1 の過剰発現は、レンチウイルスベクターを用いて行った。比較対照には empty vector を用いた。レンチウイルスベクターを OSCC 細胞株に感染させ、2 週間 blasticidin による選択培養を行った。

#### マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

DLEU1 をノックダウンまたは過剰発現させた細胞株から RNA を抽出し、遺伝子発現をマイクロアレイによって網羅的に解析した。データ解析には GeneSpring GX ソフトウェアを使用した。

#### Chromatin immunoprecipitation (ChIP) によるヒストン修飾解析

DLEU1 のノックダウンあるいは過剰発現を行った OSCC 細胞株を用いて、ヒストン H3 リジン 27 アセチル化(H3K27ac)、およびヒストン H3 リジン 4 トリメチル化(H3K4me3) に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降産物を Ion Proton システムでディープシーケンシングした(ChIP-seq)。結果の検証のため、ChIP-qPCR を行った。

#### 細胞増殖、遊走、浸潤アッセイ

DLEU1 を過剰発現させた OSCC 細胞株または IFITM1 に対する siRNA を導入した OSCC 細胞株の増殖能を、Cell Counting kit-8 により評価した。IFITM1 ノックダウン時の遊走能および浸潤能を Boyden chamber assay と Matrigel invasion assay により評価した。

#### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

DLEU1 を過剰発現させた OSCC 細胞株に Interferon-stimulated response element(ISRE) のレポーターベクターを導入し、24 時間後に Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter assay system を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

#### タンパク質発現解析

STAT1、リン酸化 STAT1 (p-STAT1)、IFITM1 のタンパク質発現をウエスタンブロット法により解析した。β-actin と GAPDH を内在性コントロールとして用いた。

### 4. 研究成果

#### DLEU1 のノックダウンによる OSCC 細胞におけるヒストン修飾変化の解析

DLEU1 の下流標的遺伝子を同定するために、DLEU1 のノックダウンにおけるゲノムワイドなヒストン修飾状態を解析した。H3K4me3 および H3K27ac の 2 つのヒストン修飾について ChIP-

seqにより解析した結果、全 RefSeq 遺伝子の転写開始点近傍における H3K27ac の低下が認められた。H3K27ac の変動が大きかった上位 300 遺伝子を抽出し Gene Ontology 解析、Pathway 解析を行ったところ、インターフェロンシグナル経路に関連する遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。ChIP-seq、ChIP-qPCR によって複数のインターフェロン誘導遺伝子(interferon-stimulated genes: ISGs)の転写開始点における H3K27ac と H3K4me3 の低下が認められた。

#### DLEU1 のノックダウンによる ISGs の発現変動

ヒストン修飾の変化が遺伝子発現の変化に関与するのかを調べるため、3 種の OSCC 細胞における遺伝子発現マイクロアレイの結果を解析したところ、DLEU1 のノックダウンにより複数の ISGs の発現量の低下が認められた。Gene Set Enrichment Analysis において、DLEU1 のノックダウンによってインターフェロンシグナル経路に関連する遺伝子セットの発現低下が認められた。2 つの異なる siRNA を用いて DLEU1 をノックダウンし、定量 RT-PCR でインターフェロン関連遺伝子の発現量を検証したところ、複数の ISGs の発現量の低下が認められた。

#### DLEU1 の過剰発現による ISGs の発現変動とヒストン修飾の変化

DLEU1 過剰発現させた OSCC 細胞における遺伝子発現レベルの変化を遺伝子発現マイクロアレイで解析した。DLEU1 ノックダウン時に発現量が低下した遺伝子と過剰発現時に発現量が上昇した遺伝子に共通する 301 プローブ (227 遺伝子) を抽出し、Pathway 解析を行ったところ、インターフェロン  $\alpha/\beta$  シグナル経路に関連する遺伝子が多く含まれていた。遺伝子発現マイクロアレイおよび定量 RT-PCR 解析により、DLEU1 の過剰発現によって複数の ISGs の発現量の上昇が認められた。ChIP-qPCR では DLEU1 の過剰発現によって複数の ISGs における H3K27ac の上昇が認められた。

#### DLEU1 によるインターフェロン受容体発現、JAK-STAT 経路への影響

遺伝子発現マイクロアレイの結果から、DLEU1 のノックダウンによってインターフェロン受容体の発現量に変化が認められた。定量 RT-PCR によりさらに検証した結果、DLEU1 のノックダウンによって IFNAR1 と IFNGR2 の発現量の低下が認められ、DLEU1 の過剰発現によってそれらの発現上昇を認めた。DLEU1 をノックダウンした OSCC 細胞において p-STAT1 の発現をウエスタンブロットで解析したところ、p-STAT1 の低下を認めた。対照的に DLEU1 を過剰発現させた OSCC 細胞においては p-STAT1 の上昇を認めた。ISRE のレポーターベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイでは、DLEU1 過剰発現による JAK-STAT 経路の活性化が認められた。

#### OSCC 細胞における DLEU1 および IFITM1 の機能解析

DLEU1 の過剰発現が OSCC 細胞の増殖に与える影響を調べるため cell viability assay と colony formation assay を行った。DLEU1 過剰発現は、細胞増殖とコロニー形成能を促進させた。OSCC における ISGs の発現を解析するため、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の頭頸部扁平上皮癌の遺伝子発現データを用いて解析を行ったところ、複数の ISGs の発現量が正常組織に比べてがん組織において上昇していた。また、当科で切除された OSCC 臨床検体では、ISGs の一つである IFITM1 の発現が上昇している傾向が認められ、IFITM1 と DLEU1 の発現量は正の相関を示した。IFITM1 に対する siRNA を使用し、機能解析を行ったところ、IFITM1 のノックダウンにより細胞増殖能、遊走・浸潤能の低下が認められた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hatanaka Yui, Niinuma Takeshi, Kitajima Hiroshi, Nishiyama Koyo, Maruyama Reo, Ishiguro Kazuya, Toyota Mutsumi, Yamamoto Eiichiro, Kai Masahiro, Yorozu Akira, Sekiguchi Shohei, Ogi Kazuhiro, Dehari Hironari, Idogawa Masashi, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi, Miyazaki Akihiro, Suzuki Hiromu	4. 巻 11
2. 論文標題 DLEU1 promotes oral squamous cell carcinoma progression by activating interferon-stimulated genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99736-5	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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畠中柚衣, 新沼猛, 西山廣陽, 北嶋洋志, 山本英一郎, 甲斐正広, 萬頭, 関口翔平, 荻和弘, 宮崎晃巨, 鈴木拓.
2. 発表標題 DLEU1はインターフェロン関連遺伝子の発現とヒストン修飾を制御し口腔扁平上皮癌の進行を促進する.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関口翔平, 萬頭, 山本英一郎, 新沼猛, 高澤啓, 須藤豪太, 小池和茂, 畠中柚衣, 吉戸文乃, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 高野賢一, 宮崎晃巨, 鈴木拓.
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮がんの腫瘍微小環境におけるAEBP1の解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新沼猛, 北嶋洋志, 畠中柚衣, 関口翔平, 萬頭, 久保俊之, 佐々木基, 原田拓, 甲斐正広, 仲瀬裕志, 鈴木拓.
2. 発表標題 新規頭頸部癌関連long non-coding RNAの同定と機能解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠中柚衣、新沼猛、西山廣陽、北嶋洋志、山本英一郎、甲斐正広、関口翔平、荻和弘、宮崎晃亘、鈴木拓
2. 発表標題 Analysis of the oncogenic function of a long noncoding RNA DLEU1 in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小池和茂、出張裕也、西山廣陽、荻和弘、笹谷聖、土橋恵、畠中柚衣、塚原智英、鳥越俊彦、宮崎晃亘
2. 発表標題 Prognostic impact of HLA class II expression and its association with CD8+T-cell density in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 萬頭、関口翔平、山本英一郎、新沼猛、高澤啓、須藤豪太、畠中柚衣、北嶋洋志、甲斐正広、小山内誠、宮崎晃亘、高野賢一、鈴木拓
2. 発表標題 Analysis of AEBP1 in the microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畠中柚衣、新沼猛、西山廣陽、北嶋洋志、山本英一郎、甲斐正広、関口翔平、荻和弘、宮崎晃亘、鈴木拓
2. 発表標題 Analysis of the oncogenic function of a long noncoding RNA DLEU1 in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第122回北海道医学大会腫瘍系分科会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畠中袖衣、新沼猛、北嶋洋志、西山廣陽、萬頭、山本英一郎、甲斐正広、宮崎晃亘、鈴木拓
2. 発表標題 口腔扁平上皮がんにおける長鎖非コードRNA DLEU1のがん遺伝子の機能の解析
3. 学会等名 第14回エビジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠中袖衣、新沼猛、西山廣陽、北嶋洋志、山本英一郎、甲斐正広、荻和弘、宮崎晃亘、鈴木拓
2. 発表標題 Long noncoding RNA DLEU1はHA-CD44経路を介して口腔扁平上皮がんの発生に関与する
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池和茂、出張裕也、荻和弘、清水翔太、小林淳一、西山廣陽、土橋恵、畠中袖衣、宮崎晃亘
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における制御性T細胞の発現に関する免疫組織化学的検討
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
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
---------	---------