

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18271

研究課題名(和文) HPV関連頭頸部扁平上皮癌のクロマチン構造解析による発癌分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of carcinogenesis by chromatin structure analysis of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

美馬 勝人(Mima, Masato)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：40866109

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)：HPV陽性頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)におけるエピゲノム異常の関与を解明するため、エピゲノムと遺伝子発現量を網羅的に統合解析した。HPV陽性HNSCC細胞株のUPCI-SCC-090では、4C-seqにより、挿入HPVゲノムと相互作用する0.5～40MbのHPV相互作用領域(HPVIRs)が同定された。HPVIRsではH3K27acレベルが上昇し遺伝子発現は亢進していた。中でも、WNT経路に関係するITPR3は特異的なスーパーエンハンサーにより発現亢進し細胞増殖に寄与していたことが機能解析により示され、HPVIRsにおけるエピジェネティックな活性化のHNSCC形成への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではITPR3のノックダウンによる頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖抑制に加えて、エンハンサー領域を削除するゲノム編集によってITPR3の発現抑制、細胞増殖の抑制を明らかとした。このことから、ITPR3タンパク質だけでなく、ITPR3遺伝子のエンハンサー領域を標的とするエピゲノムの観点から治療戦略に繋がる新規知見を得られたことに学術的意義が高いと考える。実際、ゲノム編集技術の臨床応用については様々な疾患で治験が進行中であり、HPV陽性頭頸部扁平上皮癌においてもこうした技術が個別化医療の構築へ寄与する社会的意義を有しているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human papillomavirus (HPV) is involved in the development of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). To elucidate involvement of epigenetic dysregulation in tumorigenesis, we performed integrated analyses of the epigenome, transcriptome and interactome using ChIP-seq, RNA-seq and Hi-C and 4C-seq for HPV(+) HNSCCs. In HPV(+) HNSCC cell line UPCI-SCC-090, 4C-seq revealed 0.5 to 40 Mb of HPV-interacting regions (HPVIRs) where host genomic regions interacted with integrated HPV genomes. The non-amplified HPVIRs were found to show a significant increase in H3K27ac levels and an upregulation of genes associated with signaling by WNT. Among those genes, ITPR3 was significantly upregulated by UPCI-SCC-090-specific super-enhancer formation. The knockdown of ITPR3 by siRNA or CRISPR deletions of the enhancer region led to a significant suppression of cell proliferation. These data indicate that epigenetic activation in HPVIRs contributes, at least partially, to genesis of HPV(+) HNSCC.

研究分野：頭頸部悪性腫瘍

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 Human papillomavirus がんエピゲノム ヒストン修飾 クロマチン構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (HPV) は頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) の危険因子であり、喫煙や飲酒により発症する HPV (-) HNSCC とは異なる分子病態を有し、患者数は世界で増加傾向にある。HPV (+) HNSCC のなかでも中咽頭癌患者は一般に化学放射線療法に感受性があるが治療抵抗群の存在も報告されている。したがって新規治療戦略を開発するためには、その背景にある分子機構を解明する事が重要である。

HPV (+) HNSCC の半数以上はヒトゲノムに HPV が挿入しており、挿入部位周辺の増幅をともなって E6、E7 といったウイルス性癌遺伝子の発現亢進、更には増幅領域内に宿主の癌遺伝子が存在した場合はその高発現をきたす事が報告されている。一方で、HPV (+) HNSCC に共通する HPV 挿入部位は発見されておらず単一の遺伝子変異は存在しない。

また、HPV による癌化には転写異常も関与していることが子宮頸癌で報告されている。子宮頸癌では挿入 HPV 周辺にスーパーエンハンサー (SE) が形成され E6、E7 や近傍の癌遺伝子 (ERBB2、TP63 など) の転写活性化をきたす事が示されている。

このように HPV は挿入した局所での遺伝子増幅やエピゲノム異常を来すことで腫瘍化の原因となることが示されているが、立体構造を考慮した宿主ゲノム側の包括的な転写制御異常については不明なままである。

2. 研究の目的

本研究は、網羅的エピゲノム、インタラクトーム統合解析により、HPV 挿入部位と空間的に近接するヒトゲノムにおける発現制御異常と機能を解明し、HPV (+) HNSCC におけるエピジェネティックな癌化分子機構を同定する事で新規治療標的の発見に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

公共データベースを用い、HPV (+) HNSCC の臨床検体における発現解析を行った。発現分子機構の解明目的に、HPV (+) HNSCC 細胞株である UPCI-SCC-090、UM-SCC-47、UM-SCC-104 を使用して RNA-seq 法での遺伝子発現解析、ChIP-seq 法でのヒストン修飾状態 (H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac) Hi-C および 4C-seq 法での 3D ゲノム構造を解析した。比較対象としては HPV (-) HNSCC 細胞株である FaDu、不死化上皮細胞株である NP69SV40T を使用した。これらを統合し HPV 近傍のエピゲノム異常と活性化遺伝子の機能解析を行った。機能解析では、siRNA による活性化遺伝子のノックダウンによる細胞増殖能を、また、CRISPR/Cas9 システムを用いたエンハンサー削除による標的遺伝子の発現動態並びに細胞増殖能を評価した。

4. 研究成果

(1) 挿入 HPV を含む転写活性領域における遺伝子発現亢進

HPV16 の挿入部位が同定されている HNSCC (n = 19) の RNA-seq データを TCGA より入手し、再解析した。これまでに、挿入 HPV 周辺では活性ヒストン修飾の上昇が報告されていることから、NP69SV40T の Hi-C 解析を行い、上皮細胞のオープンクロマチン状態 (A コンパートメント) とヘテロクロマチン状態 (B コンパートメント) を算出した。挿入 HPV とエピジェネティックな特徴を解明すべく、挿入 HPV がどちらのコンパートメントに多く存在するか確認した。結果、84% の症例 (16/19) で A コンパートメントを構成する活性領域に挿入 HPV を有している事が判明した (図 1)。

また、TCGA のデータセットから取得した正常組織の遺伝子発現量と比較すると、挿入 HPV を有する活性領域において 75% の症例 (12/16) で遺伝子の発現亢進を認めた。この割合は症例ごとのコピー数変異 (CNV) を考慮しても変わらず、非増幅遺伝子も発現亢進していた。さらに、これら発現亢進した非増幅遺伝子群は、各症例で活性化している癌関連シグナル (Cell cycle、Cell migration など) に属する遺伝子を含んでおり、その活性化に寄与している事が判明した。

(2) 細胞株を用いた HPV 近接関連領域 (HPVIR) の同定と同領域内の非増幅遺伝子の発現亢進

UPCI-SCC-090 における HPV 挿入部位を網羅的に探索すると 4 本の染色体上に分布していた。次に、挿入 HPV ゲノムと相互作用する宿主ゲノム領域を同定し、HPV 近接関連領域

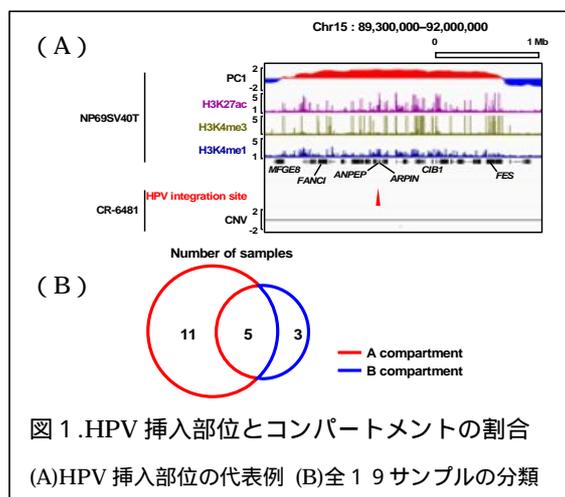


図 1. HPV 挿入部位とコンパートメントの割合

(A) HPV 挿入部位の代表例 (B) 全 19 サンプルの分類

(HPVIR)を定義するため4C-seqを実施した。その結果、HPVIRは4本の染色体すべてのHPV挿入部位周辺に存在し、領域範囲は0.5-40Mbであった(図2)。

HPVIRはゲノム増幅だけでなくエピジェネティックな活性化を伴う可能性があるため、HPVIRをCNV状態(増幅、非増幅)とエピジェネティック状態(活性、不活性)で分類し、4種類のHPVIRそれぞれにおける遺伝子の抽出を行った。活性領域では、増幅領域(n=65)と非増幅領域(n=536)のいずれにおいても遺伝子は発現亢進していた。さらに非増幅遺伝子群を対象にGO解析を行ったところWNTシグナルをはじめとする癌関連シグナルが有意に含まれた(-log₁₀P>4)。

また、UPCI-SCC-090細胞におけるWNTシグナルの活性化を検証するため、GSEAを用いてWNTシグナルに関連する遺伝子の発現をFaDuおよびNP69SV40Tと比較した結果、WNTシグナルの活性化が確認された(図3)。

(3) HPVIR内スーパーエンハンサー(SE)の標的であるWNTシグナル関連遺伝子

HPVIRの非増幅領域における遺伝子発現亢進が、がん関連シグナルの活性化に寄与していることから、HPVIRのエピジェネティックな活性化を評価した。具体的には、活性ヒストン修飾のChIP-seqを行い、エンハンサーとプロモーター数を算出した。活性化エンハンサー(H3K4me1(+), H3K27ac(+), H3K4me3(-)領域)は増幅領域よりも非増幅領域で2.5-2.9倍多く検出した。活性化プロモーター(H3K4me3(+)+H3K27ac(+))領域は、2つの独立したChIP-seq解析により、増幅領域よりも非増幅領域で5.9-6.2倍多く検出され、HPVIRの中でも非増幅領域は、よりエピジェネティックに活性化されていた。

エンハンサーの集簇として定義されるスーパーエンハンサー(SE)は癌細胞において、癌遺伝子を標的とする事が知られているため、SEをH3K27acのChIP-seqを用いて算出した。HPVIRの活性領域におけるSEの全体的な分布を明らかにするために、CNVによってSEを分類したところ、約2/3は非増幅領域に存在した。次に、UPCI-SCC-090のTADを算出し、SEと同じTADにある遺伝子をSEの標的遺伝子として抽出した。HPVIRの非増幅領域に存在するSEの標的遺伝子(n=207)を用いたGO解析の結果、97の有意なGOタームを認め(-log₁₀P>4)その中にWNTシグナルが含まれていた(図4)。

(4) UPCI-SCC-090特異的SEが標的とするWNTシグナル関連ドライバー遺伝子ITPR3の機能解析

HPVIRの非増幅領域において、UPCI-SCC-090特異的SE標的のWNTシグナル関連遺伝子の中でITPR3は最も発現亢進していた。TCGAデータセットおよび自験例のRNA-seqデータにより、ITPR3が臨床HPV(+)/HNSCCで発現亢進していることを確認した。

UPCI-SCC-090細胞におけるITPR3の機能を解析するためsiRNAによりノックダウンすると、有意な増殖抑制を認めた。さらに、ITPR3プロモーターに近接するUPCI-SCC-090特異的SEの機能を解析するために、CRISPR/Cas9システムを用いたエンハンサー削除実験を行った。シングルガイドRNA(sgRNA)は、SEを構成するエンハンサーの4箇所設計した。エンハンサー領域の欠失は、4箇所全てにおいてITPR3の発現を有意に抑制し、コントロール細胞と比較して増殖を有意に低下させた(図5)。

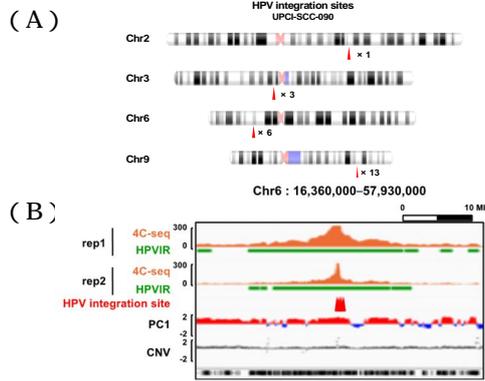


図2.挿入 HPV の分布と HPVIR (Chr 6)
(A)挿入 HPV の網羅的検出 (B)HPVIR 算出 (代表例)

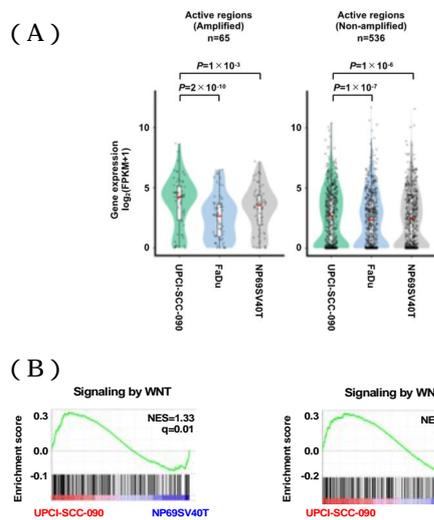


図3.HPVIR内の遺伝子発現亢進
(A)CNVで分類 (B)WNTシグナル活性化

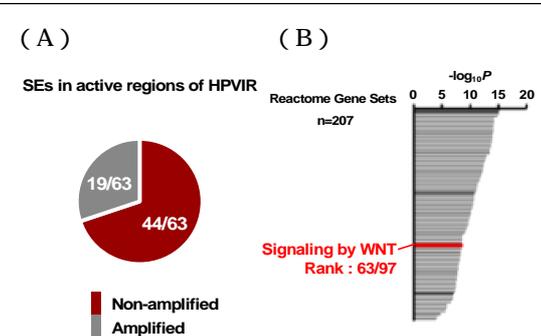


図4.非増幅領域に存在するSEの標的遺伝子
(A)SEは非増幅領域に多い
(B)GO解析でWNTシグナル浮上

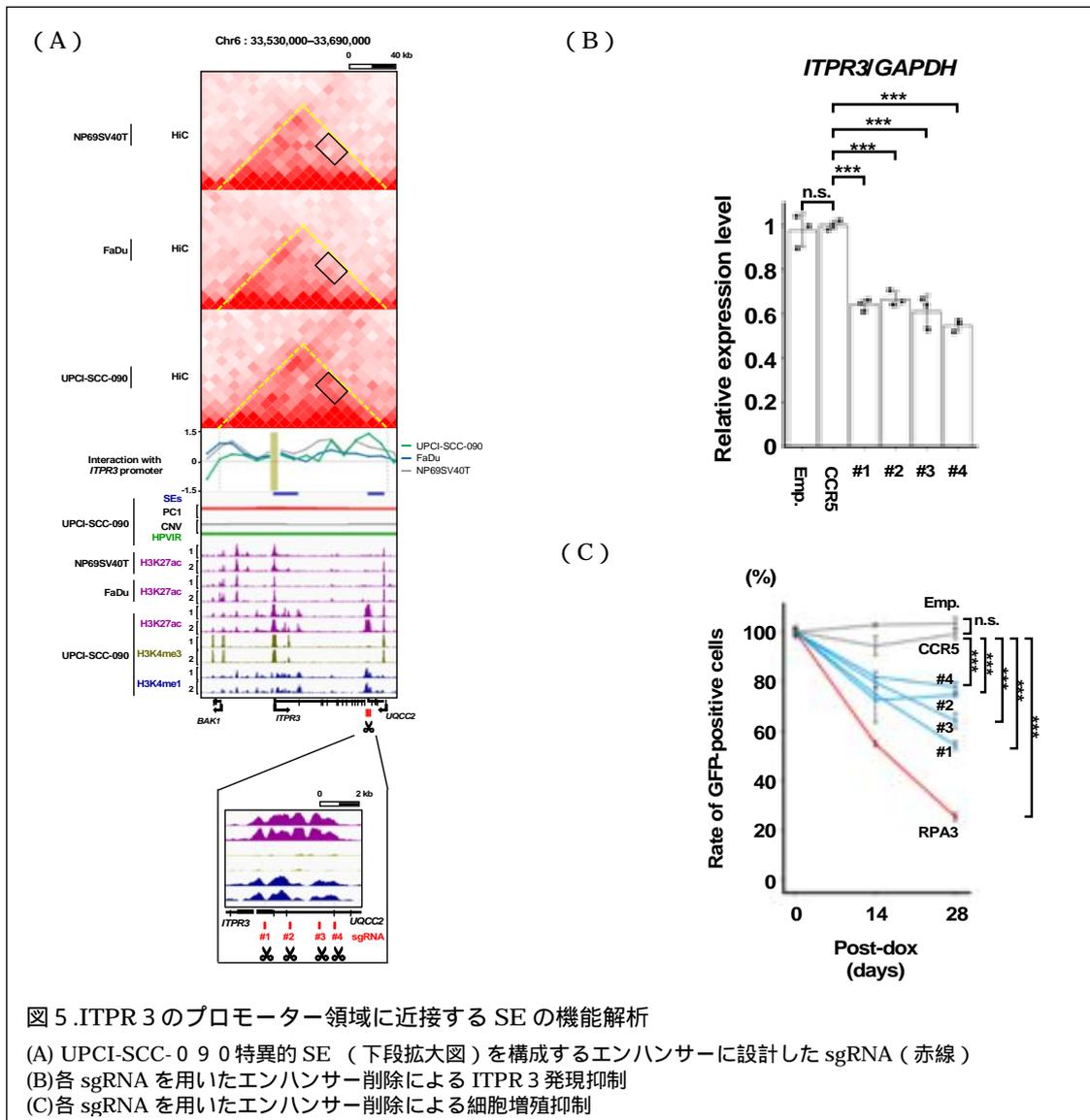


図5 .ITPR 3 のプロモーター領域に近接する SE の機能解析
 (A) UPCI-SCC-090 特異的 SE (下段拡大図) を構成するエンハンサーに設計した sgRNA (赤線)
 (B) 各 sgRNA を用いたエンハンサー削除による ITPR 3 発現抑制
 (C) 各 sgRNA を用いたエンハンサー削除による細胞増殖抑制

(5) HPV がエピジェネティックに活性化していることの検証

UPCI-SCC-090 により明らかとなった上記エピジェネティックな活性化を検証するために UM-SCC-47、UM-SCC-104 でも同様に HPV を同定し、遺伝子発現動態とエピゲノム状態を調べた。挿入 HPV は UM-SCC-47 では 3 番染色体、UM-SCC-104 では 17 番染色体に存在し、4 C-seq により HPV は UPCI-SCC-090 と同様に HPV 挿入部位周辺に存在することが明らかとなった。

次に、各細胞株の HPV 内の遺伝子発現量を、FaDu および NP69SV40T の発現量と比較した。UM-SCC-47 の活性領域の 198 遺伝子は FaDu ($P = 5 \times 10^{-3}$) または NP69SV40T ($P = 3 \times 10^{-9}$) と比較して有意に発現が上昇し、UM-SCC-104 の活性領域の 40 遺伝子は FaDu ($P = 4 \times 10^{-5}$) または NP69SV40T ($P = 3 \times 10^{-5}$) と比較して有意に上昇した。

HPV の活性領域の UM-SCC-47 と UM-SCC-104 の活性エンハンサーにおける H3K27ac/input 比は、NP69SV40T や FaDu と比べて有意に高かった。さらに、HPV の活性領域を増幅領域と非増幅領域に分類すると、非増幅領域でもエンハンサー領域での H3K27ac/input 比が有意に高かった (図 6)。以上のことから UPCI-SCC-090 細胞で認めた HPV 内の非増幅領域におけるエピゲノム活性化は、他の

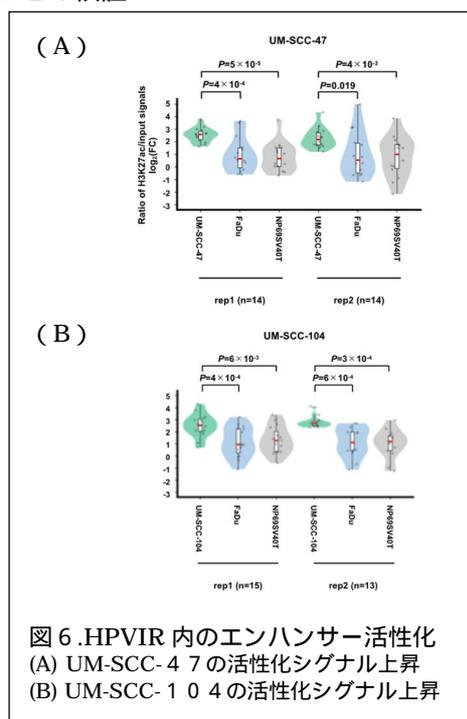


図6 .HPV 内のエンハンサー活性化
 (A) UM-SCC-47 の活性化シグナル上昇
 (B) UM-SCC-104 の活性化シグナル上昇

HPV(+)HNSCC細胞株UM-SCC-47、UM-SCC-104においても認め、広くHNSCC発癌の一因であることが示唆された。今後のHPV(+)HNSCC治療戦略を構築するうえでの礎となる新規知見であり、本研究結果は学術誌へ投稿済みである ([Mima](#), et al. Int J Cancer. doi: 10.1002/ijc.34439.)

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 0件）

1. 著者名 Mima Masato, Okabe Atsushi, Hoshii Takayuki, Nakagawa Takuya, Kurokawa Tomoya, Kondo Satoru, Mizokami Harue, Fukuyo Masaki, Fujiki Ryoji, Rahmutulla Bahityar, Yoshizaki Tomokazu, Hanazawa Toyoyuki, Misawa Kiyoshi, Kaneda Atsushi	4. 巻 152
2. 論文標題 Tumorigenic activation around HPV integrated sites in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1847 ~ 1862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34439	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 美馬勝人
2. 発表標題 HPV関連頭頸部扁平上皮癌に対する3次元クロマチン構造解析
3. 学会等名 第123回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美馬勝人
2. 発表標題 Epigenetic activation of regions surrounding HPV integrated sites contributes to tumorigenesis of HNSCC
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美馬勝人、中川拓也、黒川友哉、近藤悟、溝上晴恵、三澤清、峯田周幸
2. 発表標題 HPV関連頭頸部扁平上皮癌のクロマチン3次元構造解析
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 美馬勝人、岡部篤史、中川拓也、黒川友哉、近藤悟、溝上晴恵、福世真樹、縄井バハテヤリラヒムトラ、星居孝之、三澤清、金田篤志
2. 発表標題 Molecular mechanism of carcinogenesis induced by HPV insertion in head and neck squamous cell carcinoma
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 美馬 勝人、岡部 篤史、中川 拓也、黒川 友哉、近藤 悟、福世 真樹、バハテヤリ ラヒムトラ、星居 孝之、三澤 清、峯田 周幸、金田 篤志
2. 発表標題 Features of 3-D chromatin structure in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美馬 勝人、岡部 篤史、星居 孝之、中川 拓也、黒川 友哉、近藤 悟、福世 真樹、Bahityar Rahmutulla、藤木 亮次、三澤 清、峯田 周幸、金田 篤志
2. 発表標題 HPV関連頭頸部扁平上皮癌のクロマチン3次元構造解析
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------