

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592524

研究課題名(和文) 頭頸部癌における癌幹細胞の役割と新規治療法の探索

研究課題名(英文) The role of a cancer stem cell and search of a new treatment in head and neck cancer

研究代表者

三澤 清 (Misawa, Kiyoshi)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90334979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコム群蛋白の主要構成分子であるBMI1とEZH2は、いくつかの癌腫において発癌に強く関わっていることが分かっている。今回の研究で、頭頸部癌においてBMI1とEZH2が高発現していることがわかった。さらに、BMI1とEZH2の高発現症例は予後の悪い頭頸部癌であることが分かった。さらに、癌抑制遺伝子のDNAメチル化も高頻度に認め、histone deacetylase inhibitorsによる細胞治療でBMI1とEZH2の発現が減少することが分かった。以上のことから、BMI1とEZH2をターゲットとした頭頸部癌治療は予後を改善する有効な治療になりうるということが分かった。

研究成果の概要(英文)：The polycomb proteins BMI1 and EZH2 are characteristic components of the PRC1 and PRC2 repressor complexes, respectively, that modify chromatin. The polycomb proteins are overexpressed in several human malignancies. Moreover, BMI1 and EZH2 may influence DNA methylation by direct interaction with DNA methyltransferases. BMI1 and EZH2 expression were examined using quantitative RT-PCR. The methylation status of 9 genes was studied using methylation-specific PCR. Aberrant EZH2 and BMI1 mRNA expression was observed in 27 (29.7%) and 22 (24.2%), respectively. Aberrant BMI1 and EZH2 expression was significantly associated with shorter disease-free survival of the patients ($P = .031$ and $P = .028$, respectively). In addition, aberrant BMI1 expression was associated with DNA hypermethylation in HNSCC tissues. Furthermore, we show that histone deacetylase inhibitors downregulate expression of BMI1 and EZH2. It is conceivable that inhibitors of BMI1 and EZH2 are likely to have high therapeutic value.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、耳鼻咽喉科学

キーワード：癌幹細胞 頭頸部癌 メチル化

1. 研究開始当初の背景

近年、癌幹細胞の存在が、頭頸部扁平上皮癌においても報告され、この癌幹細胞の特性の理解をもとに、癌幹細胞を標的とした様々な治療法が考案されている。今回われわれは新たな治療法の開発と頭頸部癌の発癌メカニズムの解析を目指した。

2. 研究の目的

頭頸部癌においても癌幹細胞を標的とした新規治療法の導入に向け基礎的研究を行うことを第一の目的とする。第二の目的は、頭頸部癌と関連する癌幹細胞因子と癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化度の関連を調べ、頭頸部癌幹細胞マーカーの確定を目指す。

3. 研究の方法

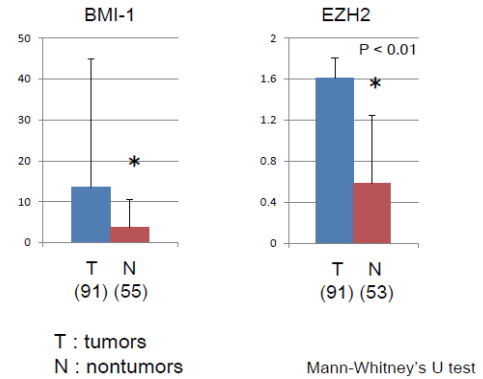
ポリコム群複合体(PCR)と呼ばれる遺伝子発現調節タンパク質複合体は、核内でヒストン修飾やDNAメチル化などのエピジェネティックな転写制御を通じて、幹細胞に特異的な遺伝子発現の維持を行うことが知られている。PCR1の主要構成分子のBMI-1、PCR2のEZH2などが癌幹細胞マーカーとして固形腫瘍においても異常発現を認めることが報告されている。今回BMI-1、EZH2の発現解析と癌抑制遺伝子のメチル化解析を行い頭頸部癌症例との関連を調べた。

- (1) 臨床検体からRNAを抽出しQ-PCR法にてBMI-1、EZH2のmRNA発現解析をした。
- (2) 同じく臨床検体からのDNAをバイサルファイト処理し9遺伝子のメチル化解析を行った。
- (3) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC)にて細胞を治療しBmi1、EZH2のmRNA発現の変化を確認した。
- (4) 臨床病理学的評価、生存率解析。

4. 研究成果

- (1) 臨床検体のQ-PCR法によるBMI-1、EZH2のmRNA発現解析

図1. Bmi1、EZH2のmRNA発現解析



BMI-1、EZH2ともに癌組織でmRNAの発現が有意に高発現を認めた。

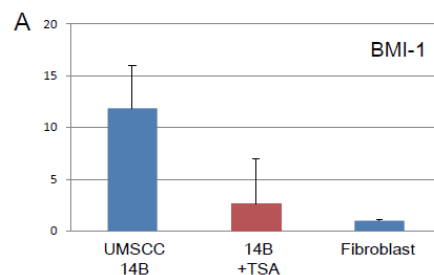
(2) 臨床検体の9遺伝子のDNAメチル化解析。

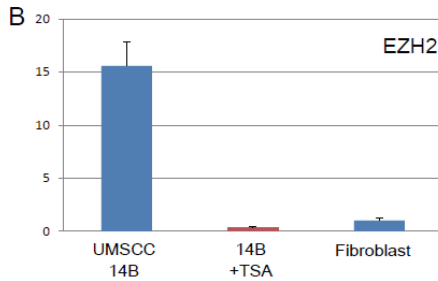
メチル化の頻度 (n=91)		Methylation index		P*
P16	55%	BMI-1 expression		
TAC1	55%	High (27)	4.37	0.036
DAFK	46%	Low (64)	3.40	
E-cadherin	44%	EZH2 expression		NS
H-cadherin	44%	High (22)	4.14	
GALR1	42%	Low (69)	3.55	
MGMT	31%	BMI-1/EZH2 expression		0.013
DCC	30%	Both High (10)	4.90	
RASSF1A	20%	Both Low (52)	3.38	
		JARID1B expression		NS
		High (19)	4.37	
		Low (65)	3.51	
		BMI-1/JARID1B expression		NS
		Both High (17)	4.35	
		Both Low (55)	3.35	
		EZH2/JARID1B expression		NS
		Both High (4)	5.00	
		Both Low (48)	3.35	

Methylation index; (9遺伝子中、メチル化のある遺伝子数の平均) Mann-Whitney's U test

BMI-1の高発現群は、癌抑制遺伝子の9遺伝子のメチル化インデックスが有意に高かった。

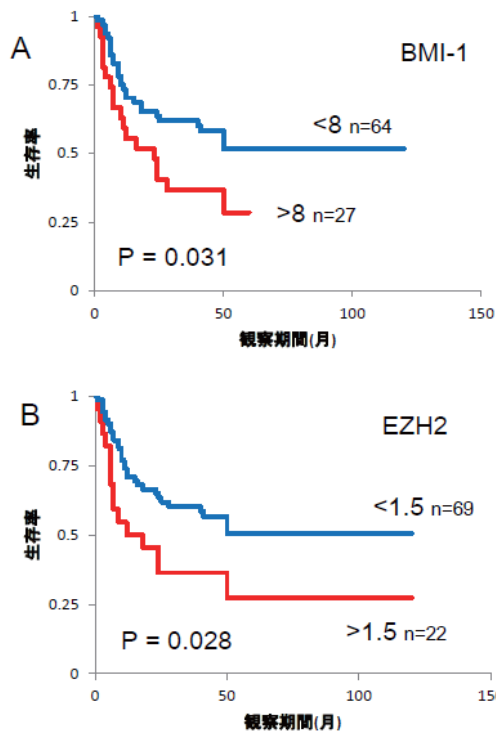
(3) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC)TSAによるBMI-1、EZH2のmRNA発現の変化





ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC)TSA により BMI-1、EZH2 の mRNA 発現は有意に低発現になった。頭頸部癌の治療に有効である可能性を示した。

(4) 生存率解析。



BMI-1, EZH2 とともに mRNA 高発現群が有意に予後不良である結果を示した。つまり、BMI-1, EZH2 は、頭頸部癌の進展、予後に大きな役割を担っている可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1, Misawa Kiyoshi*, Kanazawa T, Misawa Y, Imai A, Endo S, Hakamada K, Mineta H

Hypermethylation of Collagen 2(I) Gene (COL1A2) is a Potential Biomarker in Head and Neck Cancer. Cancer Biomarkers 10:135-144. 2012

2, Misawa Kiyoshi*, Kanazawa T, Misawa Y, Imai A, Uehara T, Mochizuki D, Endo S, Takahashi G, Mineta H : Frequent promoter hypermethylation of tachykinin-1 and tachykinin receptor type 1 is a potential biomarker for head and neck cancer. J Cancer Res Clin ; 139:879-889, 2013

3, Misawa Kiyoshi*, Kanazawa T, Misawa Y, Uehara T, Imai A, Takahashi G, Takebayashi S, Cole A, Carey TE, Mineta H : Galanin has tumor suppressor activity and is frequently inactivated by aberrant promoter methylation in head and neck cancer. Translational Oncology ; 6(3):338-346, 2013

[学会発表](計3件)

1, Kiyoshi Misawa, Takeharu Kanazawa, Hiroyuki Mineta. Expression changes in BMI-1 and EZH2 are associated with DNA methylation changes in Head and Neck cancer. 20th IFOS World Congress. Seoul 2013/6/1

2, 三澤 清、金澤丈治、今井篤志、杉山健一、瀧澤義徳、高橋吾郎、細川誠二、峯田周幸: 頭頸部癌におけるポリコム群複合体遺伝子の発現と癌抑制遺伝子のメチル化の関連とその予後について 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会 新潟 2013年5月18日

3, 三澤 清: 新しい頭頸部癌治療の展望-幹細胞治療 第 35 回日本頭頸部癌学会 名古屋シンポジウム 2012年6月11日

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三澤 清 (MISAWA, Kiyoshi)
浜松医科大学 医学部附属病院 講師
研究者番号：90334979

(2) 研究分担者

峯田周幸 (MINETA, Hiroyuki)
浜松医科大学 医学部 教授
研究者番号：40190714

(3) 連携研究者

()

研究者番号：