

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592594

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるゲノム網羅的なエピジェネティック解析

研究課題名(英文) Methylation analysis by using next generation DNA sequencer in HNSCC.

## 研究代表者

峯田 周幸 (Mineta, Hiroyuki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40190714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌におけるゲノム網羅的なエピジェネティック解析という研究テーマで遂行した。近年、DNAのメチル化を始めとするエピジェネティックな変化が、RNA合成、ひいてはタンパク質の発現を抑制することから、癌化機構の一つとして認識されている。最近、ゲノム全体のメチル化状態を明らかにするメチル化DNA解析は、次世代シーケンサーの登場で網羅性と解像度に大きな向上がみられている。特にゲノム網羅的エピゲノム解析法の登場で、いままで困難であった網羅性を実現することができるようになってきている。MAL, SLC5A5, NUP85遺伝子を候補とした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we prospectively analyzed HPV related oropharyngeal cancer and normal side tonsil by using next generation DNA sequencer. We analyzed the promoter methylation of 3 genes (MAL, SLC5A5, NUP85) in 133 HNSCC and in matching 42 normal tissues.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：ゲノム網羅的メチル化解析 頭頸部癌 中咽頭癌 HPV 次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療は、現在、外科の治療を中心に放射線治療・化学療法が行われている。最近の新しい放射線治療・抗癌剤・分子標的薬などにより、多くを占める進行例の局所制御率の向上がみられる。しかしながら、頭頸部癌全体の生存率改善までには至っておらず、新たな治療法・診断法の開発はもちろんのこと、予後因子や個別化治療のためのマーカーの確定は頭頸部癌の治療を行う上で大切であると考えられる。

### 2. 研究の目的

近年、DNA のメチル化を始めとするエピジェネティックな変化が、RNA 合成、ひいてはタンパク質の発現を抑制することから、癌化機構の一つとして認識されている。最近、ゲノム全体のメチル化状態を明らかにするメチル化 DNA 解析は、次世代シーケンサーの登場で網羅性と解像度に大きな向上がみられている。特にゲノム網羅的エピゲノム解析法の登場で、いままで困難であった網羅性を実現することができるようになってきている。

今回我々は、次世代シーケンサーを使ったゲノム網羅的エピゲノム解析によって、頭頸部癌の分化、発生に関連するエピゲノム異常の知見を蓄積していきたい。

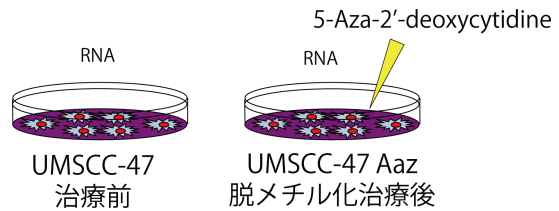
### 3. 研究の方法

本研究は頭頸部癌におけるゲノム網羅的シーケンスを行ない、頭頸部癌の網羅的メチル化解析を行っていく。

- (1) DNA 脱メチル化後の頭頸部癌細胞の mRNA 発現量の解析
- (2) 臨床検体を使っての DNA ゲノム網羅的エピゲノム解析
- (3) ゲノム網羅的エピゲノム解析から得られたデータの解析
- (4) 中咽頭癌に特異的メチル化マーカーの確認

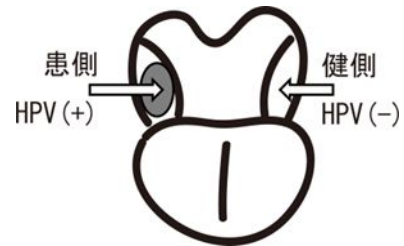
### 4. 研究成果

- (1) 5-aza-2-deoxycytidine 治療と次世代シーケンサーによる mRNA 発現解析



UMSCC47 を 5-aza-2-deoxycytidine で脱メチル化を行った。mRNA の発現の変化を調べる。

- (2) 臨床検体を使っての DNA ゲノム網羅的エピゲノム解析



臨床検体の癌側と正常側を使って DNA メチル化解析を行った。癌側でメチル化度の高い遺伝子を調べた。

- (3) ゲノム網羅的エピゲノム解析から得られたデータの解析

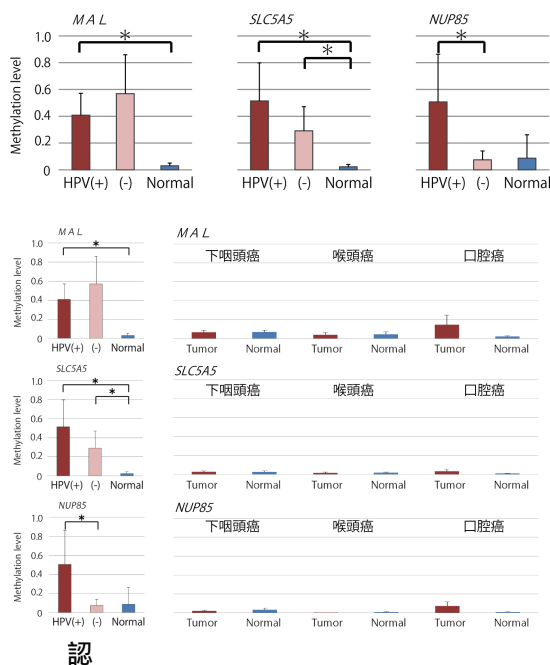
Chromosome	メチル化度 (癌部/正常部)(%)	Symbol
chr11	100	POLD3
chr14	100	NEMF
chr20	100	MKKS
chr10	99	FGF8
chr17	97	NUP85
chr5	96	NDUFA2
chr6	95	EXOC2
chr2	91	POLR2D
chr19	90	EPOR
chr19	89	SLC5A5
chr7	87	TAF6
chr3	86	C3orf55
chr17	84	LINC00674
chr2	84	RGPD2
chr15	80	AAGAB
chr6	79	TUBB
chr22	79	IL17REL
chr1	78	ACOT7
chr19	78	MIR769
chr17	76	MAP3K14-AS1

表1

(1)(2)の結果を統合し抽出された SLC5A5, NUP85 遺伝子と子宮頸癌のメチル化マーカー

一である MAL 遺伝子を抽出した。

(4) 中咽頭癌に特異的メチル化マーカーの確



MAL, SLC5A5, NUP85 遺伝子が中咽頭癌 53 症例にて癌部で高メチル化で、HPV 関連中陰等がでより高メチル化であることがわかった。下咽頭癌、喉頭癌、口腔癌との比較では、これらの 3 遺伝子は高メチル化を認めなかった。MAL, SLC5A5, NUP85 遺伝子が HPV 関連中咽頭癌の特異的メチル化マーカーであると考えられた。

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 5 件)

1. 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 Oncol*; 139:879-889, 2013
2. 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

3. Misawa Y, Misawa Kiyoshi\*, Kanazawa T, Uehara T, Endo S, Mochizuki D, Yamatodani T, Carey TE, Mineta H: Tumor suppressor activity and inactivation of galanin receptor type 2 by aberrant promoter methylation in head and neck cancer *Cancer* ; 120(2):205-213, 2014
4. Misawa Kiyoshi\*, Kanazawa T, Imai A, Endo S, Mochizuki D, Fukushima H, Misawa Y, Mineta H : Prognostic value of Type XXII and XXIV collagen mRNA expression in head and neck cancer patients. *Molecular and Clinical Oncology* 2(2):285-291. 2014
5. Misawa Kiyoshi\*, Misawa Y, Kondo H, Mochizuki D, Imai A, Fukushima H, Uehara T, Kanazawa T, Mineta H : Aberrant methylation inactivates somatostatin and somatostatin receptor type 1 in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* ; 10(3):e0118588. 2015

[学会発表](計 13 件)

1. 三澤 清、今井篤志、遠藤志織、望月大極、三澤由幾、高橋吾郎、金澤丈治、峯田周幸 : 頭頸部癌におけるオレキシン遺伝子の発現とプロモーター領域のメチル化との関連について 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会

2. 三澤 清、新井宏幸、石川竜司、岡村純、瀧澤義徳、三澤由幾、袴田桂、金澤丈治、峯田周幸：中咽頭癌症例の HPV 解析と DNA メチル化解析 第 38 回日本頭頸部癌学会
3. 三澤 清、遠藤志織、望月大極、橋本雄一、森田浩太郎、細川誠二、峯田周幸：下咽頭原発混合型小細胞癌症例の一例 第 75 回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 三澤 清：頭頸部癌におけるエピジェネティック分子機構について 第 25 回気管食道科学会専門医大会 パネルディスカッション
5. 三澤 清、金澤丈治、今井篤志、三澤由幾、上原貴行、遠藤志織、望月大極、杉山健一、高橋吾郎、峯田周幸：頭頸部癌におけるソマトスタチン遺伝子の発現とプロモーター領域のメチル化との関連について 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会 2013 年 札幌
6. 三澤 清、高橋吾郎、三澤由幾、杉山健一、瀧澤義徳、今井篤志、金澤丈治、峯田周幸：頭頸部癌における臨床検体の腫瘍部と正常部の DNA メチル化解析について 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013 年 東京
7. 三澤 清、金澤丈治、峯田周幸：Hypermethylation of tachykinin-1 and tachykinin receptor type 1 is a potential biomarker for head and neck cancer. 第 71 回日本癌学会 2013 年 横浜
8. Misawa K, Kanazawa T, Mineta H: Expression changes in BMI-1 and EZH2 are associated with DNA methylation changes in Head and Neck cancer. 20th IFOS World Congress: Seoul
9. 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ーム

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 2012 年 新潟

10. 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 GALR2 遺伝子の発現解析および DNA メチル化解析と予後について 第 36 回日本頭頸部癌学会 2012 年 松江
11. 三澤 清、金澤丈治、峯田周幸: Galanin and Galanin receptors are Frequently Inactivated by Aberrant Promoter Methylation in Head and Neck Cancer. 第 71 回日本癌学会 2012 年 札幌
12. Misawa K, Kanazawa T, Carey TE : Galanin has a Tumor Suppressor Activity and is Frequently Inactivated by Aberrant Promoter Methylation in Head and Neck Cancer. 103rd AACR Annual Meeting 2012 Chicago
13. Misawa K, Kanazawa T, Hosokawa S, Sugiyama K, Imai A, TE. Carey, Mineta H: Galanin receptor type 2 has Tumor Suppressor Activity and is Frequently Inactivated by Aberrant Promoter Methylation in Head and Neck Cancer. AHNS 8th International Conference 2012 Toronto

〔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

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

### (2)研究分担者

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

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：