

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861990

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における脱アセチル化酵素SIRT1発現の細胞生物学的意義の検討

研究課題名(英文) A cellular biological study on assessment of the deacetylase SIRT1 expression in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

野口 映 (Noguchi, Akira)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：10456395

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)：頭頸部扁平上皮癌437症例のFFPE検体を用い、SIRT1発現を免疫組織学的に評価した。その結果、SIRT1の発現は79.6%の症例においてみられ、独立した予後良好因子であった。一方、胃腺癌557症例を対象とした同様の検討では、逆に予後不良因子であった。そこで、口腔扁平上皮癌由来の培養細胞株を用い、SIRT1の発現をRNA干渉法により抑制し、上皮細胞の分化、およびstemness維持に関する遺伝子の発現の変動を検討した。結果、SIRT1の発現を抑制することにより、TAp63の発現が低下することを見出した。SIRT1はp63を介した機序により癌の悪性度に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：SIRT1 expression was assessed by immunohistochemistry conducted using samples from 437 consecutive HNSCC patients. IHC revealed 79.6% staining of SIRT1 in HNSCC. Multivariate analyses revealed that expression of SIRT1 was an independent and good indicator of prognosis. In contrast with HNSCC, high expression of SIRT1 was associated with progression and prognosis in 557 gastric cancer patients. Therefore, we examined whether SIRT1 promotes differentiation in HNSCC cells by evaluating the correlation between the expression of SIRT1 and several genes implicated in stemness or differentiation in HNSCC derived cell lines. RNA interference-mediated reduction of SIRT1 showed that SIRT1 supports the expression of TAp63, which has been implicated in tumor suppression, in addition to epithelial differentiation. It was possible that SIRT1 contributes to cancer progression by supporting the transcription of tumor-suppressive TAp63.

研究分野：口腔外科学

キーワード：頭頸部癌 口腔癌 扁平上皮癌 ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC

1 . 研究開始当初の背景

多くのがんは遺伝子の変異に加え、エピジェネティックな変化によって生じる。申請者らは、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)の発生・進展をエピジェネシスの視点から研究を継続しており、ING (Inhibitor of growth) family 遺伝子産物 (転写活性化に関わるヒストン 3 リジン 4 のトリメチル化を認識) の研究で成果を挙げてきた(Li XH, Noguchi A, Takano Y. et al. Oral Oncol. 47:217-23, 2011 ; Li XH, Noguchi A, Takano Y. et al. Histol Histopathol. 26:597-607, 2011 ; Li XH, Noguchi A, Takano Y. et al. J Cancer Res Clin Oncol. 136:1573-83, 2010) その過程で ING family 蛋白の調節機構に SIRT1 が重要な役割を果たしている(Unoki M, Harris CC et al. Cancer Sci. 100:1173-9, 2009)ことを確認し、SIRT1 が HNSCC の発生に果たす役割を検討することとした。

SIRT1 はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD) 依存性に作用するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)で、Class III に分類される。一般に、ヒストンがアセチル化された領域では遺伝子の活性があり、ヒストンが脱アセチル化されると遺伝子が不活化される。特に、Class III に分類される SIRT1 は non-histone deacetylase としての活性も持ち、正常組織においてはカロリー制限により発現が誘導され、肝臓における糖の新生や膵細胞でのインスリン分泌を制御することが知られている。近年、老化関連代謝性疾患を中心として多数の報告がされている一方で、細胞増殖、DNA 修復、酸化ストレス制御などに深く関与していることも知られており、p53 をはじめとした腫瘍抑制遺伝子や癌遺伝子を脱アセチル化することにより、癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子として機能するという二律背反性を示すこととも明らかになっている。しかしながら、頭頸部扁平上皮癌における SIRT1 の発現の臨床的意義については未だ報告されていない。

2 . 研究の目的

本研究では、頭頸部扁平上皮癌における SIRT1 発現とその機能を解析し、頭頸部扁平上皮癌における SIRT1 発現の意義を明らかにすることを目的とする。そして、SIRT1 の発現は、有効な治療法の開発や予後予測バイオマーカーとなり得るのか検討した。

3 . 研究の方法

(1)1995 年 1 月から 2008 年 12 月までに頭頸部癌の診断で神奈川県立がんセンターにおいて治療された症例のうち、扁平上皮癌と診断された一次症例 437 例を対象とした。臨床病理学的検討を行うためにホルマリン固定パラフィン包埋切片から組織マイクロアレイ標本作製し、SIRT1 の免疫染色を行い臨床病理学的因子と比較検討した。加えて、同検体で p53, H3K9Ac, H4K16Ac の免疫組織

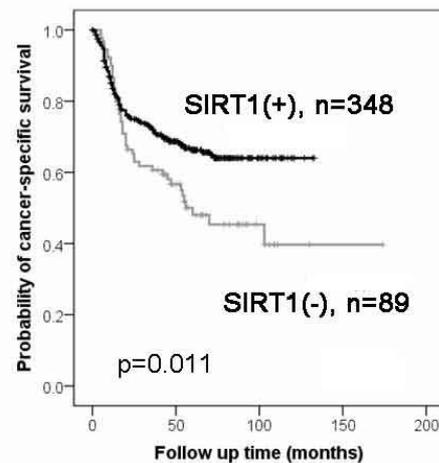
染色も施行し、両者の相関を評価した。

SIRT1 は以前より臓器 (組織) 特異的な behavior を示すことが知られている。そのため、胃腺癌 557 症例を対象とし、頭頸部扁平上皮癌と同様に SIRT1 の発現を免疫組織化学あるいはウエスタンブロット法にて評価した。

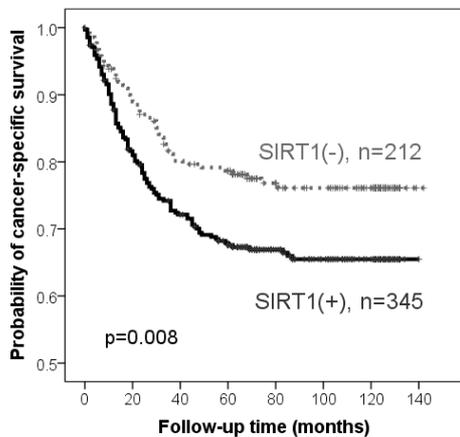
(2) 口腔扁平上皮癌由来の培養細胞株を用い、SIRT1 の発現を RNA 干渉法により抑制し、上皮細胞の分化、および stemness 維持に関する 12 遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。

4 . 研究成果

(1) 内訳は、男女比 356 : 81, 平均年齢 63.7 ± 11.0 才、咽頭 101 例、喉頭 143 例、口腔 193 例であった。組織型は、高分化型 184 例、中分化型 162 例、低分化型 90 例であった。病理学的病期は、stage I が 68 例、stage II が 114 例、stage III が 55 例、stage IV が 200 例であった。治療は、手術単独が 91 例、手術と CRT109 例、CRT 単独が 230 例であった。その結果、SIRT1 の発現は 79.6% の症例においてみられ、年齢が高いほど高率で、リンパ節転移、病理学的病期とは負の相関を示した。即ち、癌の進展に比例して低率となった。また、SIRT1 発現は、HNSCC 症例にとって有意な予後良好因子であった (p = 0.011) 。多変量解析でも SIRT1 発現は独立した予後良好因子であった。

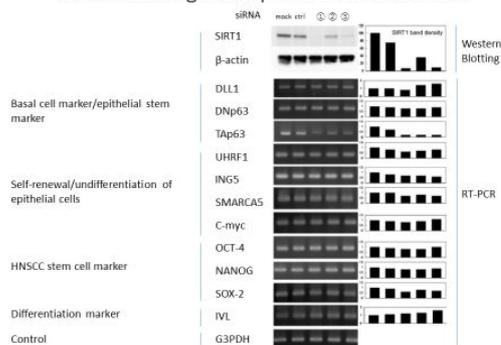


次に胃癌における結果を示す。SIRT1 の発現は 61.9% の症例においてみられ、リンパ節転移、脈管侵襲、病理学的ステージと正の相関を示し、予後不良因子であることがあきらかとなった。つまり、前述の頭頸部扁平上皮癌症例における検討とは controversial な結果であった。SIRT1 は腺癌と扁平上皮癌では全く異なる役割を果たしているのではないかと推察された。



(2) 口腔扁平上皮癌由来の細胞株 HSC-2, KOSC2 において RNA 干渉法により SIRT1 の発現を抑制した結果, p53 と結合して Bax を誘導するとされる TAp63 の発現が低下することを見出した。興味深いことに, 同アイソフォームである Np63 (p40) では変化がみられなかった。p63 は扁平上皮の分化・形成に必須の蛋白であり, SIRT1 は p63 を介した機序により癌の悪性度に寄与している可能性が示唆された。また, SIRT1 がさまざまな蛋白質を脱アセチル化することを考えると, SIRT1 は TAp63 の発現を維持・亢進させてがん抑制的に作用する以外にさまざまな細胞内プロセスに影響を及ぼしており, 細胞の性質・挙動は最終的にはそれらの総和として決定されるものと考えられた。

Semi-quantitative analysis of the effect of SIRT1 reduction on gene expression in HSC2 cells



当初の予定では, これらに加えて in vivo での実験系を行う計画をしており, SIRT1 定常発現株を樹立する予定であったが, 作製することができなかった。通法に加え, TET-ON 3G システムを用いるなど, 種々の手法に挑戦したが, 成し遂げることができなかった。今後の検討課題である。

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9件)

1 . K Ono, N Yokota, E Yoshioka, A Noguchi, K Washimi, K Kawachi, Y Miyagi, H Kato, T Yokose.

Metastatic large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a pitfall in lung cancer diagnosis. *Pathology - Research and Practice* 2016 ; Apr 2. pii: S0344-0338(16)30044-9.

doi:10.1016/j.prp.2016.03.009

2 . Kikuchi K, Noguchi A, Kasajima R, Miyagi Y, Hoshino D, Koshikawa N, Kubota A, Yokose T, Takano Y.

Association of SIRT1 and tumor suppressor gene TAp63 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biology* 2015 ; Sep;36(10):7865-72. doi: 10.1007/s13277-015-3515-y. Epub 2015 May 7.

3 . T Chijiwa, K Kawai, A Noguchi, H Sato, A Hayashi, H Cho, M Shiozawa, T Kishida, S Morinaga, T Yokose, M Katayama, N Takenaka, H Suemizu, R Yamada, Y Nakamura, T Ohtsu, Y Takano, K Imai, Y Miyagi, M Nakamura.

Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice. *International journal of oncology* 2015 ; 47 : 61-70. doi: 10.3892/ijo.2015.2997

4 . K Washimi, T Yokose, A Noguchi, Kyoko Ono, Kae Kawachi, Yasuyo Maruyama, Rieko Kawase, H Kato, Y Kameda.

Diagnosis of primary pure signet-ring cell carcinoma of the cervix. *Pathology International* 2015 ; 65 : 393-395. doi: 10.1111/pin.12275

5 . A Noguchi , K Kikuchi , H Zheng , H Takahashi , Y Miyagi , I Aoki , Y Takano.

SIRT1 expression is associated with a poor prognosis , whereas DBC1 is associated with favorable outcomes in gastric cancer. *Cancer Medicine* 2014 ; 3 : 1553-1561 .doi: 10.1002/cam4.310. Epub 2014 Aug 21.

6 . Kikuchi K , Noguchi A , Takahashi H , Zheng H , Kameda Y , Sekiguchi H , Akaike M , Miyagi Y , Takano Y.

High SIRT1 expression and low DBC1 expression are associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Journal of Cancer Therapeutics and Research* 2013 ; 2 : 1-8 . doi : 10.7243/2049-7962-2-1

7 Noguchi A , Li X , Kubota A , Kikuchi K , Kameda Y , Zheng H , Miyagi Y , Aoki I , Takano Y.

SIRT1 expression is associated with good prognosis for head and neck squamous cell carcinoma patients. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology 2013 ; 115 : 385-92.

8 . Noguchi A , Kikuchi K , Ohtsu T , Yoshiwara M , Nakamura Y , Miyagi Y , Zheng H , Takano Y.

Pulmonary tumors associated with the JC virus T-antigen in a transgenic mouse model. Oncology Reports 2013 ; 30 : 2603-2608 . doi : 10.3892/or.2013.2782. Epub 2013 Oct 2.

9 .Zheng HC ,Noguchi A ,Kikuchi K ,Ando T , Nakamura T , Takano Y.

Gene expression profiling of lens tumors , liver and spleen in α -crystallin/SV40 T antigen transgenic mice treated with Juzen-taiho-to. Molecular Medicine Reports 2014 ; 9 : 547-52. doi : 10.3892/mmr.2013.1854. Epub 2013 Dec 10.

〔学会発表〕(計 件)

〔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

野口 映 (Noguchi Akira)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所), がん生物学部, 研究員

研究者番号 : 10456395

(2)研究分担者 ()

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :