

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462599

研究課題名(和文) 頭頸部癌における長鎖遺伝子間ncRNAのエピジェネティック制御について

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of large intergenic non-coding RNA 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌細胞株に自己複製能を有する転写因子であるSALL4遺伝子のsiRNAを導入し、mRNAを抽出し次世代シーケンサー発現解析をおこなった。それぞれの細胞株のsiSALL4導入前と導入後と比較し、平均で2倍以上の増減を認めたnon-coding RNAを抽出し解析した。SALL4遺伝子は、頭頸部癌においてエピジェネティックな制御をおこなう転写因子であることが分かっている。SALL4遺伝子をsiRNAでノックダウンすることにより、減増するlincRNAはそれぞれ3.8%、3.6%であった。予測より多い遺伝子が減増していた。

研究成果の概要(英文)：This study examined non-coding RNA profiles of head and neck cancer (HNSCC) cell lines by Sal-like protein (SALL)4 siRNA transfection evaluated their significance and value as a biomarker. SALL4 siRNA transfection was associated with transcriptional inhibition of 3.8% lincRNA and was correlated with transcriptional increment of 3.6% lincRNA by next-generation sequencing analysis.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 DNAメチル化 SALL4遺伝子 non-coding RNA エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、頭頸部癌において染色体 18 番長腕の LOH の存在が予後に相関することを 2000 年に報告した。18 番長腕において 18q23 の LOH の頻度が D18S 70 において高頻度(75%)であった。この D18S70 に位置している GALR1 遺伝子に着目し研究をすすめ頭頸部癌における DNA メチル化解析ならびに癌抑制機能を調べた。代表研究者は、2002 - 2005 年まで、ミシガン大学 TE Carey ラボにて、2005 年からは浜松医科大学にて頭頸部癌における癌抑制遺伝子の DNA メチル化解析を継続的に行っており、18q23 に位置している他の遺伝子(ADNP2, CBLN2, CYB5, DOK6, NFATC1, TSHZ1, SALL3)についてもメチル化解析を行ってきた。その中で、SALL3 遺伝子において高頻度に DNA メチル化を認め、予後と相関することを確認し現在、癌抑制機能解析を行っている。また平成 23-25 年度の基盤研究(研究代表者)では、ポリコム群複合体(PCR)と呼ばれる、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するタンパク質複合体について研究を行い、BMI-1(PCR1 の主要構成分子)と、EZH2(PCR2)の異常高発現を BMI-1 は 29.6%、EZH2 は 24.1%に認めた。これらの高発現症例群は予後不良であり($p < 0.05$)、GALR1、SALL3 などの癌抑制遺伝子の DNA メチル化を高頻度($p < 0.05$)に認め、ポリコム群複合体と DNA メチル化について調べた。

最近のゲノム解析からの知見で、タンパク質情報を持たない non-coding RNA が多数発見されている。20 塩基程度の低分子量のものから、100 kb にも至るような様々な non-coding RNA が報告されている。その分子量の違いから推測されるように、機能分子としての non-coding RNA は、その生理機能も多様であることが分かっている。低分子量の micro-RNA は、細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基ほどの RNA をいい、他の遺伝子の発現を調節する機能を有しており癌の研究において最近数多くの報告がある。

一方、比較的長い配列の長鎖遺伝子間 non-coding RNA(Large intergenic non-coding RNA)の分子機能は不明な点が多かったが、種の多様性を生み出す重要な要素の一つと考えられ最近注目されている。

2. 研究の目的

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。近年、トランスクリプトーム解析によって同定された遺伝子間領域から転写される大小さまざまな非コード RNA(non-coding RNA)群が、ヒストン修飾酵素複合体と結合し、特異的な標的遺伝子の発現制御にかかわっていることが明らかにされつつある。

今回我々は、長鎖遺伝子間 non-coding RNA(lincRNA)に注目し、頭頸部癌におけるエ

ピジェネティック制御における lincRNA の役割について調べ、エピゲノム異常の知見を蓄積していきたい。

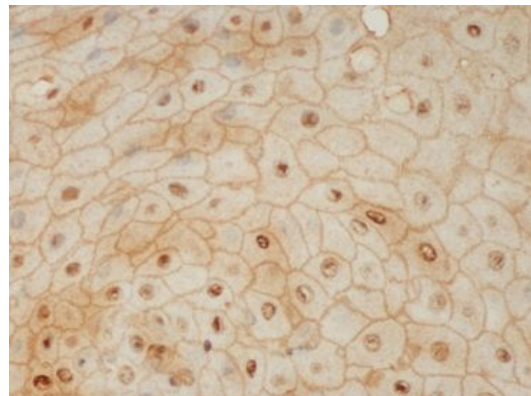
3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌細胞株 FaDu, UM-SCC-6, UM-SCC-6 に自己複製能を有する転写因子である SALL4 遺伝子の siRNA を導入し、mRNA を抽出し次世代シーケンサー発現解析をおこなった。それぞれの細胞株の siSALL4 導入前と導入後を比較し、平均で 2 倍以上の増減を認めた non-coding RNA を抽出し解析した。

4. 研究成果

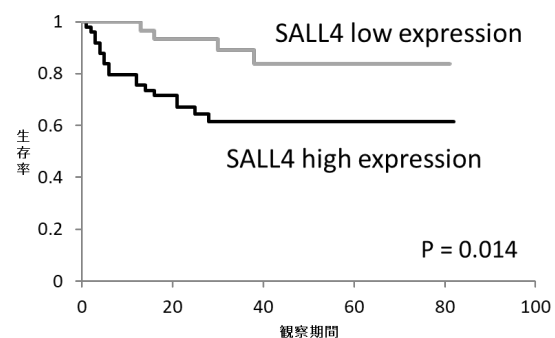
(1) SALL 遺伝子は SALL1 から SALL4 がヒトには存在する転写因子である。頭頸部癌 94 症例の癌部、正常部の mRNA 発現解析では、SALL1、SALL3 は癌部で有意に発現低下、SALL4 遺伝子蛋白は癌部で有意に発現上昇を認めた。(図 1)

図 1 SALL4 遺伝子の免疫染色(舌癌症例)



(2) SALL4 mRNA の発現上昇している症例は予後不良であることを確認した。(図 2)

図 2 SALL4 mRNA 発現による予後解析。



(3) siRNA で SALL4 をノックダウンすると癌細胞の増殖能低下を認めた。そして、mRNA を抽出し次世代シーケンサー発現解析をおこなった。(図 3、図 4、図 5、図 6)

図 3. FaDu の散布図。

SALL4 siRNA の導入により減少する遺伝子、増加する遺伝子は大きな偏りがないことが分かった。

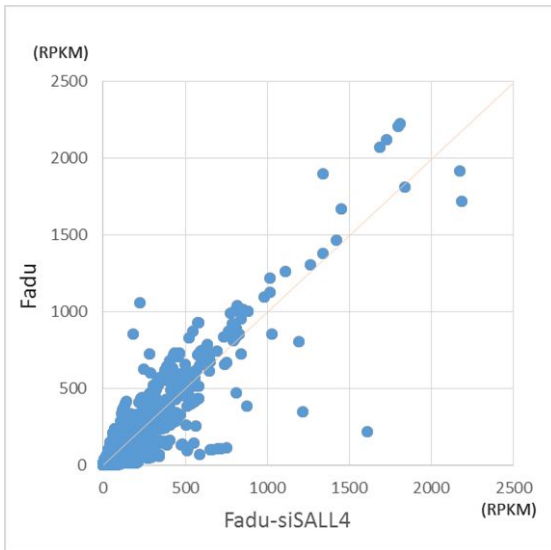


図4. シークエンスした RNA の内訳

mRNA が 70.9% と大部分を占めた。その次に、miRNA が 7.1%、lincRNA が 3.3%、snRNA が 1.4% であった。

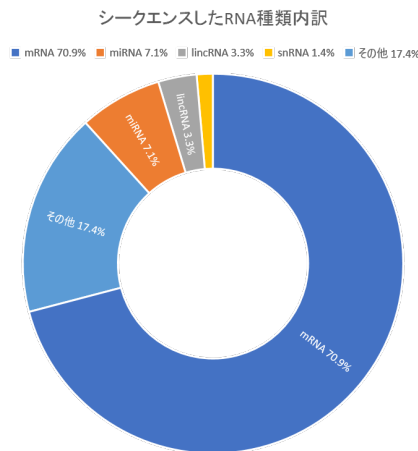


図5. 減少した RNA の内訳

3 細胞株の siSALL4 導入前と導入後と比較し、平均で 2 倍上の増減を認めたものは、増加 3.2%、減少 6.7% だった。減少した RNA の内訳は、mRNA 61.7%、miRNA 11.2%、lincRNA 3.8%、snRNA 3.5% であった。

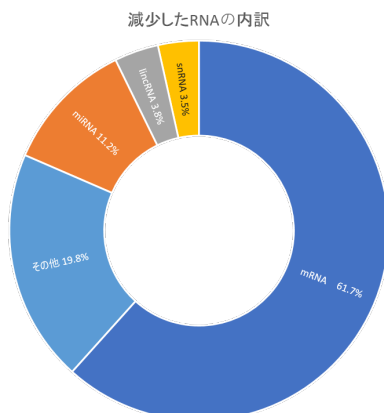
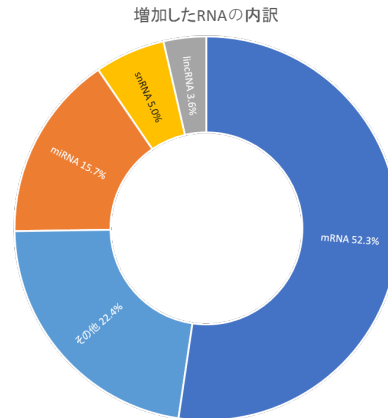


図6. 増加した RNA の内訳

3 細胞株の siSALL4 導入前と導入後と比較し、平均で 2 倍上の増加した RNA の内訳は、mRNA 52.3%、miRNA 15.7%、lincRNA 3.6%、snRNA 5.9% であった。



考察：ALL4 遺伝子は、頭頸部癌においてエピジェネティックな制御をおこなう転写因子であることが分かっている。SALL4 遺伝子を siRNA でノックダウンすることにより、減増する lincRNA はそれぞれ 3.8%、3.6% であった。予測より多い遺伝子が減増しており、SALL4 遺伝子と lincRNA が相互に細胞内で遺伝子の発現調整を行い、頭頸部癌の発生、進行に関わっていることが予想された。

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 18 件)

1. Misawa K, Mochizuki D, Imai A, Endo S, Mima M, Misawa Y, Kanazawa T, Carey TE, Mineta H: Prognostic value of aberrant promoter hypermethylation of tumor-related genes in early-stage head and neck cancer. *Oncotarget*;24: 26087-26098. 2016
2. Misawa K, Mochizuki D, Endo S, Mima M, Misawa Y, Imai A, Shinmura K, Kanazawa T, Carey TE, Mineta H: Site-specific methylation patterns of the GAL and GALR1/2 genes in head and neck cancer: potential utility as biomarkers for prognosis. *Molecular Carcinogenesis*, 2016 Sep 29. doi: 10.1002/mc.22577.
3. Misawa K, Misawa Y, Kanazawa T, Mochizuki D, Imai A, Endo S, Carey TE, Mineta H: Epigenetic Inactivation of Galanin and Galanin Receptor 1/2 associated with Clinical outcome in Head and Neck Cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*. 33(2): 187-95. 2016
4. Misawa K, Kawasaki H, Matsuo R,

- Sugiyama K, Mochizuki D, Endo S, Imai A, et al.: Human papillomavirus associated small cell carcinoma neuroendocrine carcinoma of the oropharynx: A report of two cases. SpringerPlus, 2016 in press
5. Izumi C, Misawa K, Endo S, Sugiyama K, Mochizuki D, Imai A, et al.: Late recurrence of breast carcinoma metastasis to the hypopharynx: a case report. SpringerPlus, 11;5:599. 2016
 6. Endo S, Mizuta K, Takahashi G, Nakanishi H, Yamatodani T, Misawa K, Hosokawa S, Mineta H: The effects of ventilation tube insertion or trans-tympanic silicone plug insertion on a patulous Eustachian tube. Acta Oto-Laryngologica, 136(6):551-5. 2016
 7. Shinmura K*, Kato H, Kawanishi Y, Igarashi H, Goto M, Tao H, Inoue Y, Nakamura S, Misawa K, Mineta H, Sugimura H: Abnormal expressions of DNA glycosylase genes NEIL1, NEIL2, and NEIL3 are associated with somatic mutation loads in human cancer. Oxid Med Cell Longe, 2016: 1546392. 2016
 8. 三澤 清、峯田周幸: HPV 陽性癌と陰性癌の宿主因子と環境因子の違いは? JOHNS, 32(3): 284-286. 2016
 9. Misawa K, 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. PLoSONE; 10(3):e0118588. 2015
 10. Misawa K, Kawasaki H, Endo S, Mochizuki D, Morita K, Hashimoto Y, Kikuchi H, Kanazawa T, Iwashita T, Mineta H: Primary combined small and squamous cell carcinoma of the hypopharynx: a case report. Molecular and Clinical Oncology. 4(5): 709-714. 2015
 11. Kanazawa T, Misawa K, Misawa Y, Uehara T, Fukushima H, Kusaka G, Maruta M, Carey TE: G-Protein-Coupled Receptors: Next Generation Therapeutic Targets in Head and Neck Cancer? Toxins; 7(8):2959-84. 2015(*equally contributed)
 12. Mochizuki D, Adams A, Warner KA, Zhang Z, Pearson A, Misawa K, McLean SA, Wolf GT, Nor JE: Anti-tumor effect of inhibition of IL-6 signaling in mucoepidermoid carcinoma. Oncotarget; 6(26): 22822-22835, 2015
 13. Kanazawa T, Komazawa D, Indo K, Akagi Y, Yogaku L, Nakamura N, Matsushima Y, Kunieda C, Misawa K, Nishino H, Watanabe Y. Phonological outcome after a single injection of basic fibroblast growth factor for severe vocal fold lesions and vocal fold paralysis under local anesthesia. Laryngoscope; 125(10): E338-344, 2015
 14. Misawa K, 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
 15. Misawa Y, Misawa K, 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
 16. Uehara T, Kanazawa T, Mizukami H, Uchibori R, Tsukahara T, Kume A, Misawa K, Carey TE, Suzuki M, Ichimura K, Ozawa K: Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. Cancer Science; 105(1):72-80. 2014
 17. Kanazawa T, Misawa K, Misawa Y, Maruta M, Uehara T, Shimada M, Nagatomo T, Ichimura K: Galanin Receptor 2 has the Different Signaling Pathway to Suppresses Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Head and Neck Cancer Cells. Molecular Medicine Reports; 10(3):1289-94. 2014
 18. Kanazawa T, Watanabe Y, Komazawa D, Indo K, Misawa K, Nagatomo T, Himada M, Iino Y, Ichimura K: Learning Curve and Phonological Outcome of Laryngeal Framework Surgery by Different Anesthesia: a single-surgeon experience. Acta Oto-Laryngologica ; 132(2):193-200. 2014
- [学会発表](計 18 件)
1. Misawa K, Takeharu K, Misawa Y, Mineta H: Prognostic value of aberrant promoter hypermethylation of tumor-related genes in early-stage head and neck cancer; AHSNS 9th International Conference 2016.7 Seattle
 2. 三澤 清、今井篤志、望月大極、遠藤志織、近藤玄樹、三澤由幾、金澤丈治、峯田周幸: 頭頸部癌における神経ペプチド受容体遺伝子のプロモーター領域のメチル化について 第117回日本耳鼻咽喉科学会総会 名古屋 5月
 3. 三澤 清、望月大極、今井篤志、岡村純、三澤由幾、金澤丈治、峯田周幸: 頭頸部癌における DNA メチル化解析の手法につ

- いて 第40回日本頭頸部癌学会 さいたま 6月
4. 三澤 清、金澤 丈治、峯田 周幸 : Prognostic value of aberrant promoter hypermethylation of tumor-related genes in early-stage head and neck cancer 第75回日本癌学会 9月 横浜
 5. 三澤由幾、三澤 清、金澤 丈治、峯田 周幸 : 頭頸部癌における血管内皮細胞増殖因子受容体遺伝子のプロモーター領域のメチル化について 第40回日本頭頸部癌学会 さいたま 6月
 6. Kiyoshi Misawa, Hideya Kawasaki, Shiori Endo, Daiki Mochizuki, Kotaro Morita, Yuichi Hashimoto, Yuki Misawa, Hirotohi Kikuchi, Takeharu Kanazawa, Toshihide Iwashita, Hiroyuki Mineta: Primary combined small and squamous cell carcinoma of the hypopharynx: a case report; AHNS Annual Meeting 2015.4 Boston
 7. Kiyoshi Misawa, Takeharu Kanazawa, Yuki Misawa, Daiki Mochizuki, Atsushi Imai, Kazuhiro Noda, Ryuji Ishikawa, Aki Ohkubo, Jun Okamura, Hiroyuki Mineta: Methylation analysis of neuropeptide genes in HNSCC; ASHNO 2015.6 Kobe
 8. 三澤 清 : パネルディスカッション 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 宇都宮 2月
 9. 三澤 清 : シンポジウム ベンチからクリニックへ 癌のエピジェネティック解析と治療 第77回耳鼻咽喉科臨床学会 浜松 6月
 10. 三澤 清、今井篤志、望月大極、遠藤志織、近藤玄樹、三澤由幾、金澤 丈治、峯田 周幸 : 頭頸部癌における neuropeptide 受容体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116回日本耳鼻咽喉科学会総会 東京 5月
 11. 三澤 清、金澤 丈治、三澤由幾、望月大極、今井篤志、野田和洋、石川竜司、大久保亜季、岡村純、峯田 周幸 : 頭頸部癌におけるニューロペプチド遺伝子のメチル化解析 第39回日本頭頸部癌学会 神戸 6月
 12. 三澤 清、金澤 丈治、峯田 周幸 : Methylation analysis of neuropeptide genes in HNSCC 第74回日本癌学会 名古屋 9月
 13. 三澤由幾、三澤 清、金澤 丈治、峯田 周幸 : 中咽頭癌における HPV16 遺伝子の CpG メチル化解析 第39回日本頭頸部癌学会 神戸 6月
 14. 三澤由幾、三澤 清 : 頸部転移により血清 NSE 値が上昇した嗅神経芽細胞腫例 第76回耳鼻咽喉科臨床学会 浜松 6月

15. 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 福岡 5月
16. 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 福岡 5月
17. 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 盛岡 6月
18. 三澤 清 : パネルディスカッション 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 宇都宮 2月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

遠藤志織 (ENDO, Shiori)

浜松医科大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：10625205

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()