



Tumorigenic activation around HPV integrated sites in head and neck squamous cell carcinoma

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-04-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 美馬, 勝人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004353

博士（医学）美馬 勝人

論文題目

Tumorigenic activation around HPV integrated sites in head and neck squamous cell carcinoma

（頭頸部扁平上皮がんにおける HPV 挿入部位周辺のがん原性活性化）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ヒトパピローマウイルス（HPV）感染は頭頸部扁平上皮がん（HNSCC）の重要な危険因子として知られ、タバコやアルコール暴露が原因である非感染 HNSCC と異なるサブタイプである。HPV 感染 HNSCC は治療抵抗性を示す症例群を含め増加傾向にあり、治療戦略の構築に向けた発がん分子機構解明が喫緊の課題となっている。

ヒトゲノムに挿入された HPV ゲノムは、周辺領域も含めてゲノム増幅され E6、E7 など発がん性ウイルス遺伝子が高発現する事が知られる。子宮頸がんでは HPV 挿入部位周辺の増幅領域にスーパーエンハンサーが形成され E6、E7 やホストのがん遺伝子が高発現する。一方で、これら活性化エンハンサー領域におけるゲノム高次構造や、非増幅領域ヒトゲノムの発がん機構への関与は不明である。そこで網羅的エピゲノム、インタラクトーム統合解析により、HPV 挿入部位近傍の非増幅領域ヒトゲノムが果たす発現制御異常と発がん分子機構を解明する事を研究目的とした。

〔材料ならびに方法〕

浜松医科大学を含む多機関共同研究を千葉大学の生命倫理審査委員会で申請し承認を得ている（No. 1193）。また、千葉大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定に則りゲノム編集実験（遺 G・28-12）、千葉大学病原体等管理（BT28-8）の承認を得ている。公共データベースを用い、HPV 感染 HNSCC の臨床検体の発現解析を行った。HPV (+) HNSCC 細胞株（UPCI-SCC-090、UM-SCC-47、UM-SCC-104）を用い、RNA-seq 法により遺伝子発現解析、ChIP-seq 法によりヒストン修飾状態、Hi-C および 4C-seq 法により 3D ゲノム構造を解析した。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。

〔結果〕

正常扁平上皮細胞株を Hi-C 解析し、ゲノム全体を活性化領域（A コンパートメント）と不活化領域（B コンパートメント）に大きく分類した。HNSCC 臨床検体（19 例）の HPV 挿入部位は 84%（16/19）が A コンパートメントであり、75%（12/16）で HPV が挿入したコンパートメント内の非増幅領域の遺伝子が発現亢進していることを同定した。細胞周期（GO: 0007049）や上皮間葉転換の正の制御（GO: 0010718）に関連する遺伝子が有意に濃縮しており、非増幅領域に

もがん活性化に寄与する遺伝子が含まれ、また有意に発現亢進していることが分かった。

次に HPV 挿入部位周辺における遺伝子発現亢進の原因を解明するため、HNSCC 細胞株を用いてエピゲノム・インタラクトーム統合解析を行った。UPCI-SCC-090 を 4C-seq 解析し、HPV 近接領域を 4 か所 (0.5–40 Mb) 同定した。Hi-C 解析を行い A/B コンパートメントを算出すると、UPCI-SCC-090 細胞においても HPV 挿入部位は臨床検体と同様に A コンパートメント優位だった。A コンパートメント内の HPV 近接領域の遺伝子は発現亢進しており、非増幅領域の遺伝子 536 個に WNT 経路関連遺伝子の有意な濃縮を認めた ($P=1\times 10^{-25}$)。ChIP-seq 解析を行い、UPCI-SCC-090 細胞の HPV 近接領域内では、活性化エンハンサーの数が正常細胞や HPV (-) HNSCC 細胞と比べて有意に増加しており、活性化エンハンサーの集簇であるスーパーエンハンサーに着目した。HPV 近接領域内のスーパーエンハンサーの標的遺伝子を 207 個抽出すると WNT 経路関連遺伝子の有意な濃縮を認めた ($P=1\times 10^{-9}$)。最も発現亢進した inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (*ITPR3*) に着目すると、HPV 感染 HNSCC 臨床検体の RNA-seq データで *ITPR3* 遺伝子の高発現を確認した。*ITPR3* 遺伝子の 75-79kb 下流にあるエンハンサー領域は UPCI-SCC-090 細胞で異常活性化してスーパーエンハンサーを形成しており、*ITPR3* 遺伝子プロモーターと近接関係を形成することを Hi-C にて同定した。siRNA によるノックダウンでの細胞増殖抑制、エンハンサー削除実験による *ITPR3* 遺伝子の発現低下と細胞増殖抑制を認めた。

[考察]

本研究により HPV 近接領域内の非増幅活性領域におけるエンハンサーの異常活性化およびスーパーエンハンサー形成と、それによるがん原遺伝子 *ITPR3* の発現亢進が細胞増殖の増加に寄与していることが示唆された。HNSCC において WNT 経路亢進は生存率低下やリンパ節転移と関連することが報告されている。*ITPR3* 遺伝子は WNT/カルシウムイオン伝達経路の一部で細胞内カルシウムイオンを制御し転写因子の活性化に関係している。UPCI-SCC-090 細胞で認めた HPV 近接領域内の非増幅領域におけるエピゲノム活性化は、他の HPV 感染 HNSCC 細胞株においても認め、広く HPV 感染 HNSCC 発がんの一因であることが示唆された。

本研究では臨床検体での検証は HPV 挿入部位および周辺の遺伝子発現解析に限られ、今後エンハンサーのエピゲノム状態や 3D クロマチン構造も検証する必要がある。

[結論]

HPV 挿入部位周辺の非増幅領域におけるエンハンサーの異常活性化およびスーパーエンハンサー形成を確認し、HPV 感染 HNSCC 発生に重要ながん原遺伝子のエピジェネティックな発現亢進が示唆された。