

令和元年5月10日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05829

研究課題名(和文) 上咽頭癌の早期診断マーカーの確立と中国南部フィールドワークを通しての実験的検証

研究課題名(英文) Establishment of early diagnostic markers for nasopharyngeal carcinoma and experimental verification through fieldwork in southern China

研究代表者

村田 真理子 (Murata, Mariko)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10171141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は中国南部地域において多発するEpstein-Barrウイルス(EBV)感染上咽頭癌を早期診断できるマーカーを探索し、フィールドワークへの応用を目指す。上咽頭癌試料において、酸化/ニトロ化DNA損傷塩基、DNAメチル化やmicroRNAなどのゲノム・エピゲノム異常が発がんに関与し、また、診断マーカーとしても有用である可能性を示してきた。遺伝子のDNAメチル化についてゲノムワイド解析を行い、バイオマーカー候補遺伝子を見出した。フィールドにおいて適用できる試料として血液について検討を行い、DNAメチル化率と他のマーカーを組み合わせたことが有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上咽頭癌の発症機構として、炎症に由来する酸化・ニトロ化DNA損傷やエピゲノム異常が重要であり、診断マーカーとしての可能性を示したことは、全がんの25%を占める炎症関連発がんの予防や早期診断のための戦略に資する学術的意義がある。また、血液を試料としてバイオマーカーを探索したことは、リキッドバイオプシーとして診断や治療効果の判定への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus-related nasopharyngeal carcinoma (NPC) is endemic in southern China. The purpose of this study is to explore early diagnostic markers for NPC, which can apply to fieldwork. We examined genetic/epigenetic aberrations, such as oxidative/nitrative DNA lesions, DNA methylation, and microRNA in NPC samples to elucidate carcinogenic mechanisms and to find biomarkers. We performed genome-wide analysis for promoter DNA hypermethylation, and found several candidate genes. We tried to measure DNA methylation rate in blood as an applicable sample in fieldwork. It is suggested that combination of DNA methylation rate and other marker may be more efficient for the screening.

研究分野：環境腫瘍学

キーワード：上咽頭癌 中国南部 Epstein-Barr ウィルス DNA損傷 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウィルス(EBV)感染は、国際がん研究機関 IARC により、「ヒトに対し発がん性あり」(Group 1)と評価され、リンパ腫や胃癌、上咽頭癌の発症に関与する。中国南部においては EBV 感染上咽頭癌が多発し、予後不良であり、重大な健康問題である。ウィルス抗体価によるスクリーニングが当該地域で行われてきたが、より良いスクリーニング方法が必要である。我々は広西医科大学と共同研究により、上咽頭癌患者の生体試料において、酸化/ニトロ化 DNA 損傷塩基、DNA メチル化や microRNA などのゲノム・エピゲノム異常が発がんに関与し、また、診断マーカーとしても有用である可能性を示してきた。

## 2. 研究の目的

本研究は中国南部地域において多発する EBV 感染上咽頭癌を早期診断できるマーカーを確立し、実験的検証を行い、中国における重大な健康問題の解決に資する分子を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

ヒト上咽頭癌培養細胞あるいは患者標本を免疫化学染色法を用いて、DNA 損傷塩基(8-ニトログアニン, 等)、幹細胞マーカー(CD44v6, ALDH1A1, 等)、血管新生などについて解析した。また、培養細胞・患者試料より RNA および DNA を抽出し、cDNA およびバイサルファイト処理 DNA あるいはメチル化感受性/依存性制限酵素処理 DNA を得た。リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現および microRNA 発現を解析し、また、DNA メチル化定量解析を行った。タンパク質を抽出し、アポトーシス、上皮間葉転換、等の関連分子をウェスタンブロットにより解析した。上咽頭癌細胞株に遺伝子発現ベクターあるいは siRNA をトランスフェクションし、候補遺伝子の機能解析を行った。また、ヌードマウス皮下への癌細胞移植により *in vivo* 解析を行った。抗炎症性物質タウリンの効果も培養細胞およびヌードマウスを用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 上咽頭癌におけるニトロ化 DNA 損傷と幹細胞マーカー

炎症により特異的に生じるニトロ化 DNA 損傷に注目し、Epstein-Barr ウィルス感染上咽頭癌組織における幹細胞マーカー陽性細胞での局在について検討した。その結果、がん組織では非がん組織に比べ、ニトロ化 DNA 損傷塩基 8-nitroguanine、幹細胞マーカー CD44v6 および ALDH1A1 の染色スコアが有意に高く、幹細胞マーカー陽性細胞でのニトロ化 DNA 損傷が確認された。さらに、上咽頭癌由来細胞株では上咽頭不死化細胞に比べ、CD44v6 および ALDH1A1 の陽性細胞率が高く、フローサイトメーターによりダブルポジティブ細胞の割合が有意に高いことが確認された (Mediators Inflamm, 2016)。

### (2) 上咽頭癌における Glutaredoxin 3 高発現と上皮間葉転換

Glutaredoxin 3 (GLRX3)は抗酸化酵素であり、細胞内の活性酸素 (ROS)を低く保つ働きがあり、がん転移に寄与することが知られている。免疫組織染色および遺伝子発現解析により、我々は上咽頭癌において GLRX3 が高発現していることを明らかにした。上咽頭癌培養細胞において、GLRX3 をノックダウンし、機能解析を行った。その結果、細胞増殖、コロニー形成、細胞遊走・浸潤が抑制された。また、ヌードマウス皮下への癌細胞移植による腫瘍形成が低下した。その機構として、EGFR/Akt 経路が重要であり、上皮間葉転換に寄与することを示した (Oncotarget, 2016)。

### (3) 上咽頭癌における DNA メチル化異常

我々は、DNA メチル化異常に注目し、Methyl Cap sequencing 法と遺伝子発現マイクロアレイを組み合わせて、がん組織においてプロモーター高メチル化・低発現遺伝子候補をゲノムワイドに探索した。さらに、標的遺伝子について Bisulfite Amplicon Sequencing (BAS)法により、各 CpG のメチル化率を高精度に測定し、当該領域において癌患者群と非癌患者群のメチル化率は有意に差がある遺伝子を見いだした。すなわち、これらの候補遺伝子の DNA メチル化率が上咽頭癌患者をスクリーニングするバイオマーカーとなる可能性を示した (BMC Cancer, 2017)。

上咽頭癌組織で RERG (RAS like estrogen regulated growth inhibitor)遺伝子のプロモーター領域が有意にメチル化され、発現が低下していることを見いだしている。また、メチル化感受性/依存性制限酵素処理を併用した簡便な定量 PCR 法により、上咽頭癌組織での有意に高い RERG のメチル化率を確認しており、スクリーニング方法として有意な ROC 曲線を得られ、その妥当性が示された。また、機能解析のために、RERG 発現ベクターを上咽頭癌細胞株に安定導入したところ、RERG は細胞増殖および細胞遊走を抑制した。同細胞のヌードマウス皮下への移植により、腫瘍形成、血管新生および上皮間葉転換が抑制されることを確認し、RERG 遺伝子ががん抑制作用を有することを明らかにした (J Exp Clin Cancer Res, 2017)。

マイクロアレイや RNA seq の公開データベースを用いて、メチル化率差がある遺伝子を探索し、より検出精度の高いバイオマーカーを検討している。その一つとして、growth differentiation factor 10 (GDF10)を見出し、上咽頭癌における発がんへの関与を検討した。上咽頭癌において有

意に発現が低下し、プロモーター領域の高 DNA メチル化が明らかになった。また、病期 III～IV では、病期 I～II に比べ GDF10 遺伝子発現レベルが低かった。上咽頭癌細胞に GDF10 を導入したところ、細胞遊走および浸潤が抑制され、GDF10 が上皮間葉転換を阻害し、がん抑制作用を持つことが示唆された（第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年 9 月；論文準備中）。

上咽頭癌および非がん患者の組織および血漿を用いて、DNA を抽出し、メチル化感受性および依存性制限酵素で処理し、メチル化定量 PCR 法によりメチル化率を定量した。上咽頭癌組織および血漿での候補遺伝子メチル化率は、いずれも癌患者で有意に高い値が得られた。スクリーニング方法として、DNA メチル化率は有意な ROC 曲線 AUC を得られたが、組織に比べ血漿試料では十分に高い感度と特異度は得られなかった。フィールドにおいて血漿中の DNA メチル化率により上咽頭癌を判別するには、他のマーカーとの組み合わせることが有用であることが示唆された（第 89 回日本衛生学会総会、2019 年 2 月；論文準備中）。

#### (4) 上咽頭癌への抗炎症物質タウリンの抗がん効果

タウリンは遊離アミノ酸の一種であり、抗炎症作用、抗がん作用があるとの報告がある。ヒト正常上咽頭および上咽頭癌から樹立された細胞株を用いて、タウリンのがん抑制効果について検討した。タウリンは上咽頭癌細胞の増殖を抑制したが、正常細胞株においては細胞毒性作用がほとんど認められなかった。また、タウリンは上咽頭癌細胞においてコロニー形成を抑制し、アポトーシスを誘導した。タウリンは PTEN の発現を誘導し、Akt の活性化を抑制することでアポトーシスを誘導することが示唆された（*Amino Acids*, 2018）。

ヌードマウス皮下に上咽頭癌細胞を移植し、数ミリの腫瘍形成が確認された後、マウスを 2 群に分け、タウリンおよび水を経口摂取させ、腫瘍径および重量を測定した。その結果、タウリン投与群で有意に腫瘍径が小さく、腫瘍重量が軽かった（第 89 回日本衛生学会総会、2019 年 2 月）。現在、タウリンの抗がん機構を検討中である。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 23 件)

Suwannakul N, Ma N, Thanan R, Pinlaor S, Ungarreevittaya P, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Kawanishi S, Murata M. Overexpression of CD44 variant 9: a novel cancer stem cell marker in human cholangiocarcinoma in relation to inflammation. *Mediators Inflamm*, 4867234, 査読有, 2018.

DOI: 10.1155/2018/4867234

He F, Ma N, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Zhang Z, Huang G, Takeuchi K, Murata M. Taurine exhibits an apoptosis-inducing effect on human nasopharyngeal carcinoma cells through PTEN/Akt pathways in vitro. *Amino Acids*, 50(12):1749-1758, 査読有, 2018.

DOI: 10.1007/s00726-018-2651-2

Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med*. 23(1):50. 査読有, 2018

DOI: 10.1186/s12199-018-0740-1

Hou B, Ishinaga H, Midorikawa K, Nakamura S, Hiraku Y, Oikawa S, Ma N, Takeuchi K, Murata M. Let-7c inhibits migration and epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma by targeting IGF1R and HMGA2. *Oncotarget*, 9(10):8927-8940. 査読有, 2018.

DOI: 10.18632/oncotarget.23826

Afroz T, Hiraku Y, Ma N, Ahmed S, Oikawa S, Kawanishi S, Murata M. Nitrate DNA damage in cultured macrophages exposed to indium oxide. *J Occup Health*, 60(2):148-155, 査読有, 2018.

DOI: 10.1539/joh.17-0146-OA

Armarmuntree N, Murata M, Techasen A, Yongvanit P, Loilome W, Namwat N, Pairojkul C, Sakonsinsiri C, Pinlaor S, Thanan R. Prolonged oxidative stress down-regulates Early B cell factor 1 with inhibition of its tumor suppressive function against cholangiocarcinoma genesis. *Redox Biol*, 14:637-644, 査読有, 2018.

DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.011

Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M. Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*, 18(8). 査読有, 2017.

DOI: 10.3390/ijms18081808

Zhao W, Ma N, Wang S, Mo Y, Zhang Z, Huang G, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Takeuchi K. RERG suppresses cell proliferation, migration and angiogenesis through ERK/NF- $\kappa$ B signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 36, 88, 査読有, 2017.

DOI: 10.1186/s13046-017-0554-9

Zhao W, Mo Y, Wang S, Midorikawa K, Ma N, Hiraku Y, Oikawa S, Huang G, Zhang Z, Murata M, Takeuchi K. Quantitation of DNA methylation in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma by bisulfite amplicon sequencing. *BMC Cancer* 17, 489, 査読有, 2017.

DOI: 10.1186/s12885-017-3482-3

Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Nitrate and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. *Genes Environ*. 38:26,

査読有, 2017.

DOI: 10.1186/s41021-016-0055-7

Wang S, Ma N, Zhao W, Midorikawa K, Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S, Zhang Z, Huang G, Murata M. Inflammation-Related DNA Damage and Cancer Stem Cell Markers in Nasopharyngeal Carcinoma. *Mediators Inflamm.*, 2016:9343460. 査読有, 2016.

DOI: 10.1155/2016/9343460

He F, Wei L, Luo W, Liao Z, Li B, Zhou X, Xiao X, You J, Chen Y, Zheng S, Li P, Murata M, Huang G, Zhang Z. Glutaredoxin 3 promotes nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis via EGFR/Akt pathway and independent of ROS. *Oncotarget*. 7(24) 査読有, 2016.

DOI: 10.18632/oncotarget.9454

[学会発表](計72件)

Yifei Xu, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. RERG hypermethylation in circulating cell-free DNA of nasopharyngeal carcinoma: a potential hematological marker for screening. 第89回日本衛生学会学術総会 2019.

Nattawan Suwannakul, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. Predominant expression levels of CD44 variants in cholangiocarcinoma cell line. 第89回日本衛生学会総会 2019.

Feng He, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. Taurine exhibits an anti-proliferation effect on human nasopharyngeal carcinoma cells in vivo. 第89回日本衛生学会学術総会 2019.

Sharif Ahmed, Tahmina Afroz, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, 平工雄介. Nitrate DNA damage in lung epithelial cells exposed to particulate and soluble indium compounds. 第89回日本衛生学会学術総会 2019.

村田真理子. 炎症関連発がん機構の解明とその予防. 日本産業衛生学会 東海地方会 産業衛生技術部会 第10回講演会 2018.

Feng He, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Zhe Zhang, Guangwu Huang, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. GDF10 is a candidate tumor suppressor gene inactivated by promoter hypermethylation in human nasopharyngeal carcinoma. 第77回日本癌学会学術総会 2018.

Nattawan Suwannakul, Ning Ma, Raynoo Thanan, Somchai Pinlaor, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. A novel cancer stem cell biomarker CD44v9 in liver fluke-related cholangiocarcinoma. 第77回日本癌学会学術総会 2018.

Yifei Xu, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Zhe Zhang, Guangwu Huang, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. DNA methylation in circulating cell-free DNA of nasopharyngeal carcinoma. 第77回日本癌学会学術総会 2018.

Feng He, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. Taurine induces Apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells through PTEN-mediated inhibition of Akt pathway in Vitro. The 21st International Taurine Meeting, 瀋陽・大連, 2018.

村田真理子. 炎症関連発がん機構の解明とその予防. 日本衛生学会学会賞受賞講演. 第88回日本衛生学会総会 2018.

Feng He, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Taurine inhibits proliferation and colony formation in nasopharyngeal carcinoma cells. 第88回日本衛生学会総会 2018.

Yifei Xu, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Novel epigenetic markers for Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. 第88回日本衛生学会総会 2018.

Nattawan Suwannakul, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. Expression of a novel cancer stem cell biomarker, CD44 variant 9, in human cholangiocarcinoma. 第88回日本衛生学会総会 2018.

Weilin Zhao, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yingxi Mo, Zhe Zhang, Guangwu Huang, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. RERG suppresses cell proliferation and angiogenesis by inhibiting the ERK/NF- $\kappa$ B/MMPs signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. 第76回日本癌学会学術総会 2017.

Feng He, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. Inhibitory effects of taurine on the proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. 第76回日本癌学会学術総会 2017.

Bo Hou, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma, Mariko Murata. Let-7c inhibits migration and epithelial-mesenchymal transition by targeting IGF1R and HMGA2 in head and neck cancer cells. 第76回日本癌学会学術総会 2017.

Weilin Zhao, Kaoru Midorikawa, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Quantitative comparison of DNA methylation for biomarker in Epstein-Barr virus-associated

nasopharyngeal carcinoma. 第 87 回 日本衛生学会学術総会 2017.

Feng He, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma, Mariko Murata. Increased expression of Glutaredoxin 3 promotes the proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. 第 87 回日本衛生学会学術総会 2017.

Weilin Zhao, Shumin Wang, Kaoru Midorikawa, Zhe Zhang, Yingxi Mo, Guangwu Huang, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. PRKCB, a tumor suppressor, is epigenetically inactivated in nasopharyngeal carcinoma 第 75 回日本癌学会学術総会 2016.

Bo Hou, Kaoru Midorikawa, Hajime Ishinaga, Ning Ma, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. Let-7c functions as a tumor suppressor by targeting HMGA2 in head and neck cancer. 第 75 回日本癌学会総会 2016.

②① Weilin Zhao, Shumin Wang, Kaoru Midorikawa, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Hypermethylation of RERG promoter in nasopharyngeal carcinoma. 第 86 回日本衛生学会学術総会 2016.

②② Bo Hou, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma, Mariko Murata. Let-7c functions as a tumor suppressor by targeting IGF1R in head and neck cancer. 第 86 回日本衛生学会学術総会 2016.

②③ Bo Hou, Hajime Ishinaga, Kaoru Midorikawa, Ning Ma, Weilin Zhao, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata Tumor suppressing roles of let-7c in head and neck cancer. The 7<sup>th</sup> EMBO meeting 2016, Congress Center Rosengarten Ma Nnheim, Ger Ma Ny. 2016.

②④ 村田真理子, 発がんにおける DNA 損傷とエピゲノム異常の役割: 上咽頭癌での検討. 日本耳鼻咽喉科学会中部地方会連合会 2016.

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 及川 伸二

ローマ字氏名: (OIKAWA, shinji)

所属研究機関名: 三重大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 10277006

研究分担者氏名：平工 雄介  
ローマ字氏名：(HIRAKU, yusuke)  
所属研究機関名：福井大学  
部局名：学術研究院医学系部門  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：30324510

研究分担者氏名：翠川 薫  
ローマ字氏名：(MIDORIKAWA, kaoru)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：大学院医学系研究科  
職名：リサーチアソシエイト  
研究者番号(8桁)：20393366

研究分担者氏名：馬 寧  
ローマ字氏名：(MA, nei)  
所属研究機関名：鈴鹿医療科学大学  
部局名：医療科学研究科  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：30263015

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。