

SMYD2 overexpression is associated with tumor cell proliferation and a worse outcome in HPV-unrelated head and neck carcinomas.

(ヒト乳頭腫ウイルス非関連頭頸部癌において SMYD2 高発現は腫瘍増殖と予後不良に関連する。)

大友 梨恵

山口大学大学院医学系研究科
情報解析医学系専攻 病理形態学分野

平成 27 年 12 月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	5
4. 方法	5
5. 結果	8
6. 考察	15
7. 結語	16
8. 謝辞	16
9. 参考文献	17

1. 要旨

頭頸部扁平上皮癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)はしばしば多重癌が発生するという特色をもつ癌である。一部の症例ではヒト乳頭腫ウイルス(human papillomavirus, HPV)が発癌に関与しており、それらでは癌化の機構がよく解明されており、治療反応性が良好で予後もよいことが示されている。しかし HPV が関連しない HNSCC については発癌機構や原因遺伝子や分子について十分には理解されていない。また予後や治療方針を決定しうる確立されたマーカーは存在しておらず、適切な治療の選択ができない現状がある。

今回そのようなマーカーの候補として SMYD2 に着目した。SMYD2 とは SET and MYND domain containing protein 2 で、ヒストン H3K36 や p53 の K370 に対するリジンメチルトランスフェラーゼである。食道扁平上皮癌において発癌を促進する遺伝子として報告されている。本研究では SMYD2 が HPV 非関連の非多重癌および多重癌 HNSCC 症例において発癌因子として作用するかについて検討した。

215 例の HPV 非関連 HNSCC 症例では SMYD2 タンパクの過剰発現は非多重癌症例では 80/142 (56.3%)、多重癌症例では 53/73 (72.6%)にみられた。非多重癌症例では SMYD2 の過剰発現は予後と有意に相関した($p = 0.001$)。SMYD2 が過剰発現した患者は、発現していない患者に比べ生存率が低く($p = 0.004$, log-rank test)、多変量解析においても SMYD2 タンパク陽性は独立した予後不良因子であった($p = 0.034$)。一方多重癌症例では SMYD2 の過剰発現は高齢者 (≥ 60 歳, $p = 0.033$)、TNM 分類でより進んだ T ($p < 0.001$), N ($p = 0.045$), Stage ($p = 0.004$)と相関していたが、予後との有意な相関はみられなかった。HPV 非関連の HNSCC 細胞株の幾つかでは *SMYD2* の messenger RNA やタンパクの高発現が認められたが、染色体 1q32–41.1 での増幅は明らかではなかった。HNSCC 細胞の増殖は *SMYD2* 遺伝子のノックダウンによって阻害された。これらから HPV 非関連の非多重癌症例において SMYD2 は腫瘍の増殖に重要な働きをし、有効な予後予測因子であることが示された。さらに治療標的分子になる可能性もある。

2. 研究の背景

頭頸部扁平上皮癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)は全世界では6番目の発生頻度の癌である[1]。その発癌の外因子としてはタバコ、アルコール、ヒト乳頭腫ウイルス(human papillomavirus, HPV)への感染が挙げられ、また内因子としてはFanconi貧血などが知られている[2]。HNSCCはヘテロな疾患であるため有効な治療方針の決定が難しく、また予後の予測も困難なことが多い。しかし腫瘍遺伝子である*E6*や*E7*を含んだハイリスクタイプのHPVに関連したHNSCCは現在では独立した1つのエンティティと考えられている[3]。HPVに関連したHNSCC、とりわけ中咽頭癌は、HPV非関連性のHNSCCと比べて化学療法や放射線療法への反応がよく、予後も良好であることが知られている[3, 4]。この一群では細胞周期を制御するp53やretinoblastoma(RB)の腫瘍抑制因子が*E6*や*E7*によって抑制されることによって癌化する[3]。一方でHPV非関連HNSCCの分子学的な機序については解明されていない点が多く様々な経路が関与していることが想定されている。

HNSCCの別の特徴的な側面は‘field cancerization phenomenon’である。これは高い再発率や上気道や上部消化管の二次原発扁平上皮癌(second primary squamous cell carcinoma)につながる。後者は最初の癌に関連するジェネティックもしくはエピジェネティックな異常を持った、広範囲の前癌的な素因を持った粘膜から発生する。このような癌が発生するリスクはタバコやアルコールの趣向がある人で2倍になると言われる[5]。最初のHNSCCが早期癌であって治療を行った患者であっても‘field cancerization’のために二次原発癌を生じ、日常生活に支障をきたし、生存率も低下する[6]。

*TP53*といった腫瘍抑制遺伝子や*epidermal growth factor receptor (EGFR)*といった腫瘍遺伝子の異常はHNSCCにおいても高頻度に認められるが、HNSCCにおける癌化の機序は複雑であり、これらの遺伝子の異常が亜分類するための十分なパラメーターとはならない。HPV非関連HNSCCにおいて、効果的な治療方針の決定や、再発もしくは二次原発癌の発生の予測のための意義あるマーカーの確立が求められている。

その一つの候補がSET and MYND domain-containing protein 2 (SMYD2)である。SMYD2はリジンメチルトランスフェラーゼであり、ヒストンにおいてヒストン3のリジン36(H3K36)のメチル化を通して転写を調節することが当初示された[7]。続いてSMYD2はp53のリジン370(K370)のメチル化を介してp53を阻害することが分かり[8]、このことはSMYD2がp53の転写促進を阻害することで細胞増殖または分化を促進することにつながる。p53とその標的分子は細胞周期やDNAダメージに続くトリガーアポトーシスを調整する。変異によってp53が不活性化されることによってHNSCCなどの癌が生じる。つまりHNSCCにおいてSMYD2の活性化が重要な役割を果たしp53の阻害を介して細胞増殖や予後に影響を及ぼしている可能性が考えられる。さらに、SMYD2は、DNAダメージに反応して細胞周期の前進や細胞分化を調整する、腫瘍抑制因子であるRBのリジン860をメチル化することも知られている[9]。

食道重層扁平上皮癌(sophageal squamous cell carcinoma, ESCC)では細胞株および外科切除症例においてSMYD2 mRNAやタンパクが高頻度に過剰発現したことが示されている[10]。SMYD2が過剰発現したESCC患者では、過剰発現しなかった症例よりもより予後が悪い。*TP53*の変異とは関係せずにESCC細胞の増殖はSMYD2の過剰発現によって促進されたのに対して、SMYD2のノックダウンはESCC細胞の増殖を阻害した。

HNSCCとESCCの患者はアルコールやタバコの趣向といったしばしば共通した背景をもち、中にはこの解剖学的に近接した2つの領域の癌を両方患う患者もいる。そのためSMYD2がESCCと同じようにHNSCCにおいてもp53の阻害を介して腫瘍の増殖や予後に関与する可能

性が考えられる。

3. 目的

本研究の目的は、外科的に切除された HPV 非関連の HNSCC 症例を多重癌と非多重癌症例に分けて SMYD2 の発現状況を調べ、臨床病理学的な意義や予後因子としての評価をすることである。また HNSCC において SMYD2 が発癌因子として作用するかを調べるために HNSCC 細胞株で SMYD2 が腫瘍細胞増殖を促進するかについても調べる。

4. 方法

a. 症例と組織材料

国立がん研究センター中央病院において 2003 年から 2009 年の間に外科的に切除された 223 例の HNSCC 症例(中咽頭癌 80 例、下咽頭癌 71 例、喉頭癌 72 例)を対象とし、ホルマリン固定パラフィン包埋組織を使用した。患者への説明と同意を得て、また同施設の倫理委員会の承認を得た(承認番号 2010-075)。各々の代表組織切片を再度検鏡し、組織学的診断については WHO 基準に基づいて確定させた。臨床的な記録を再見し、また International Union against Cancer(第 7 版)[11]の TNM 分類に基づいて切除検体のステージングを行った。既往歴がなく、かつ術後の経過観察期間に second primary HNSCC を生じなかった 150 例を非多重癌症例群とした。残りの 73 例は多重癌群とした。非多重癌群の経過観察期間中央値は 49.0 ヶ月(範囲 0.4-110 ヶ月)、多重癌群は 58.6 ヶ月(範囲 0.3-98 ヶ月)であった。

b. HPV の PCR による検索

各症例の代表組織切片を脱パラフィンシヘマトキシリンで染色して。各々の癌組織成分を切り取り 100 μ l の DNA 抽出緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5% (v/v) Tween 20, 200 \cdot g/mL proteinase K)、55°C でインキュベートした。その後 100°C 10 分で proteinase K を失活させ PCR に直接供した。既知の HPV16 の子宮頸癌組織および HeLa 細胞株組織を各々 HPV16 と HPV18 の陽性コントロールとした。PCR は、GP5+/6+ の HPV consensus primer[12]、また HPV16 と HPV18 の型特異的なプライマーを用いて行った[13, 14]。 β アクチン(*ACTB*)は DNA 抽出が確実に行われているかのコントロールとして使用した。PCR 産物は 2% (w/v) のエチレンブロマイド染色をしたアガロースゲルで電気泳動し紫外線により可視化した。

c. 免疫組織染色

各症例から代表ブロックを選別し、4 μ m の厚さの切片にカットした。脱パラフィン処理した切片を 0.3% 過酸化水素に 15 分間曝露して内因性ペルオキシダーゼ活性を遮断した。クエン酸バッファー (pH 6.0) を使用して、121°C で 10 分間、スライドをオートクレーブして抗原不活化を行った。この解析では一次抗体として、抗 SMYD2 (1:100)、抗 p53 (DO7 ; 1:100 希釈、Dako 社 ; デンマーク、グロストルupp)、および抗 p16 (G175-405 ; 1:10 希釈、BD Pharmingen 社 ; 米国ニュージャージー州フランクリン・レイクス)を使用した。ヒト SMYD2 (HPYISEIKQIESH ; Operon Biotechnology、日本、東京) から得た 14 アミノ酸ペプチドに対して抗 SMYD2 ポリクロナール抗体 (ウサギポリクロナール抗体) を産生し、アフィニティ

一カラムによって精製した。各抗体に ESCC 細胞株の適切な陽性対照と陰性対照を用いた。自動染色装置 (Dako 社) を製造業者発行の手順書に従って用いて染色を行った。検出は ChemMate EnVision キット (Dako 社) を用いて行った。SMYD2 発現については以前の発表と同じように点数をつけた [10]。SMYD2 を発現した細胞集団の染色強度 (0 点: なし、1 点: 弱、2 点: 中、3 点: 強) および陽性細胞占有率 (proportion score: PS) (<10%: 0 点、10-33%: 1 点、33-67%: 2 点、・67%: 3 点) を症例毎に評価した。高倍率の顕微鏡 (×200) で SMYD2 の発現を陽性 (染色強度と陽性細胞占有率の合計が ≥2 の場合) もしくは陰性 (非染色、染色強度と陽性細胞占有率の合計=0) の何れかに分類した。p53 に関しては、腫瘍細胞の ≥10% に認められた独特の核免疫反応性を陽性と判断した。p16 に関しては、癌細胞の ≥ 80% で核と細胞質の両方に認められた独特の染色を陽性と判断した。

d. 細胞培養

5 つの HNSCC 細胞系を使用した。HTB-43 (FaDu) [15] および CCL-138 (Detroit 562) [16] は咽頭扁平上皮癌由来、UM-SCC-4 [17] は中咽頭癌由来、UM-SCC-17B [17] は喉頭癌由来、UM-SCC-47 [18] は口腔癌由来であった。UM-SCC 系は Dr TE Carey (ミシガン大学) のご厚意により提供を受けた。HTB-43 (FaDu) および CCL-138 (Detroit 562) は米国培養細胞系統保存機関 (ATCC、バージニア州マナッサス) から得た。以前のデータ [10] と比較するために 4 つの ESCC 細胞株も用いた。ヒューマンサイエンス研究資源バンク (日本、大阪) から得た KYSE30 [19] および KYSE150 [19] と、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター (日本、仙台) から提供を受けた TE6 [20] と TE10 [20] も使用した。培地としては 100U/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシンおよび 100 μM 可決アミノ酸に、UM-SCC 系、HTB-43、および CCL-138 では 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を添加した DMEM を、KYSE30 および KYSE150 には 2% FBS を添加した RPMI1640 と Ham' s F12 培地 (1/1) を、TE 系には 10% FBS を添加した RPMI1640 を使用した。

e. リアルタイム RT-PCR

全 RNA から作成した一本鎖 cDNA を各遺伝子に特異的なプライマーで増幅した。製造業者のマニュアルに従って、TaqMan Gene Expression Assays (SMYD2 用 Hs00220210_m1、Life Technologies 社) を用いて、定量リアルタイム蛍光検出方法と Applied Biosystems StepOne™ リアルタイム PCR システム (カリフォルニア州カールスバッド、Life Technologies 社) を併用して mRNA 発現レベルの測定を行った。遺伝子発現値は、当該遺伝子と内部参照遺伝子 (GAPDH 用 Hs02758991_g1、Life Technologies 社) の比率として計算した。それを標本から単離した RNA 量の正規化因子とし、次に対照群の数値で規準化した (相対発現レベル)。

f. ウェスタンブロット

免疫組織化学的検査と同様に抗 SMYD2 抗体を使用した。抗 p21 および抗 GAPDH 抗体は、Santa Cruz Biotechnology (カリフォルニア州サンタクルーズ) から購入した。細胞を溶解し、タンパク質を M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific 社、マサチューセッツ州、ウォルサム) を用いて抽出した。1 レーン当たり 20 μg でタンパク質の電気泳動を行った。

g. siRNA による機能喪失と細胞増殖の解析

SMYD2 遺伝子の転写産物を標的とする siRNA (SMARTpool #M-020291-00; Dharmacon 社、

コロラド州ラファイエット) と、その対照としてルシフェラーゼ (Luc, 5'-CGUACGCGGAUACUUCGA-3'; Sigma 社、日本東京) を用いて機能喪失に関するスクリーニングを行った。siRNA (10 nM) はそれぞれ、製造業者のマニュアルに従って、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen 社、ミズーリ州セントルイス) を用いて UM-SCC-17B 細胞にトランスフェクションした。標的遺伝子のノックダウンはウェスタンブロットで確認した。トランスフェクション後の各時点における生細胞の数は、以前の発表と同様に、水溶性テトラゾリウム塩 (WST) による比色分析 (Cell counting kit-8; 同仁化学研究所、日本、熊本) で評価した[21]。

h. Transwell 細胞遊走・浸潤アッセイ

Transwell migration and invasion assays (細胞遊走・浸潤アッセイ) は、直径 6.4mm のフィルターと $8\mu\text{m}$ の多孔を有する 24 ウェルの改良型 Boyden チャンバー (transwell-chamber、BD Transduction 社、ニュージャージー州、フランクリン・レイクス) で行った。浸潤アッセイでは、フィルターの上面をマトリゲル (BD Transduction 社) でプレコーティングした。siRNA でトランスフェクトした細胞 (2×10^4 cells/ウェル) を上部チャンバー内に導入した。インキュベーションから 48 時間後にフィルターの下面上に遊走細胞もしくは浸潤細胞を固定し、ディフ・クイック染色 (Diff-Quik stain: シスメックス株式会社、日本、神戸) で染色した。染色した細胞の核を直接的に 3 回数えた。以前に発表したように[22, 23]、試験細胞と対照細胞の両方で、マトリゲルでコーティングしたフィルターを通り、コーティングしていないフィルターへ移動する細胞の割合を計算して、当該細胞の細胞外基質を通過する能力を評価した。

i. 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH)

1q41 (オレンジ) に *SMYD2* 遺伝子を有する BAC クローン RP11-103 (163 kb) と対照の BAC クローン (染色体 1 セントロメア、*CEN1*) (緑) を培養した細胞を含む $4\mu\text{m}$ の厚さのホルマリン固定パラフィン包埋ブロックとハイブリッド形成させた。上記プローブは有限会社クロモソームサイエンスラボ (日本、札幌) から購入した。FISH は上記プローブの製造業者のマニュアルに従って実施し、この解析は Metafer システム (Carl-Zeiss 社、ドイツ、オーバーコッヘン) と Isis ソフトウェア (MetaSystems 社、ドイツ、アルトルスハイム) を用いて行った。細胞系それぞれにおいて、20 個の細胞を数え、細胞 1 個あたりの *SMYD2* の平均のシグナルと *SMYD2/CEN1* の平均比率を計算した。KYSE30 と KYSE150 をそれぞれ *SMYD2* 遺伝子増幅の陰性対照、陽性対照として使用した[10]。細胞 1 個あたりの平均 *SMYD2* シグナルが ≥ 6.0 、もしくは *SMYD2/CEN1* の平均比率が ≥ 2.0 であった場合 *SMYD2* 遺伝子の増幅があると判断した。

j. 統計解析

患者に関する臨床病理学的パラメーターが統計学的に有意かは、カイ二乗検定もしくは Fisher の正確確率検定で解析した。生存解析のために単変量予測因子を基として群別に Kaplan-Meier 生存曲線を描き、ログランク検定で群間の差を計算した。単変量および多変量生存解析は、層別化したコックス比例ハザードモデルの尤度比検定を用いて行った。サブグループ間の差はノンパラメトリックマンホイットニー U 検定で計算した。複数の群の比較は、一元配置分散分析、続いて Scheffe post hoc test を用いて行った。差は両側検定で評価し p 値は 0.05 未満で有意差ありと判断した。

5. 結果

a. HNSCC 症例での HPV-DNA 検出

223 の HNSCC 症例中 8 例が、PCR において G5+/G6+が陽性で、かつ HPV16-DNA が陽性であった。その 8 例を HPV 関連 HNSCC と判断し今回の検討から除外した。なお 8 例ともが中咽頭癌であり、免疫組織学的にも p16 陽性であった。残りの 215 例(うち下咽頭癌が 72 例、喉頭癌が 71 例、中咽頭癌が 72 例)については G5+/G6+陰性でかつ HPV16 と HPV18 の型特異的なプライマーでも陰性であったため HPV 非関連 HNSCC とした。その 215 例中 18 例(8.3%)のみが免疫組織学的に p16 陽性であった。

b. HPV 非関連 HNSCC 症例での SMYD2 タンパクの発現

215 例の HPV 非関連 HNSCC 症例の組織切片で SMYD2 の発現を評価したところ、陽性は 133 例(61.9%)、陰性は 82 例(38.1%)であった(図 1)。

c. HPV 非関連 HNSC 症例における SMYD2 タンパク発現と臨床病理学的な関係

臨床病理学的な評価項目として、年齢、性別、タバコやアルコール摂取、TNM 分類、組織分化度、静脈侵襲を挙げ、さらに非多重癌群および多重癌群とに分けて評価した(表 1)。非多重癌と多重癌の両群の間では、癌の局在が異なり($p = 0.032$)、またアルコール摂取は多重癌症例でより高頻度に認められた($p < 0.001$)。p16 免疫染色性については両群の間で差は見られなかったが($p = 0.080$)、SMYD2 と p53 の発現については非多重癌群よりも多重癌群の方が高頻度に認められた(各々 $p = 0.0020$ 、 $p = 0.037$)。

SMYD2 タンパクの発現と臨床病理学的評価項目との間の関係性は非多重癌群と多重癌群とで異なっていた(表 2)。非多重癌群では SMYD2 タンパクの発現はより短い生存と関連していた($p = 0.001$)。一方多重癌群では SMYD2 の発現は生命予後とは関連せず($p = 0.0829$)、しかしながらより高齢であること(60 歳以上、 $p = 0.033$)、進行した pT($p < 0.001$)や pN($p = 0.45$)、pStage($p = 0.004$)であることと関連していた。Kaplan-Meier 生存曲線では、非多重癌症例において SMYD2 陽性と SMYD2 陰性では有意な差が認められたが(図 2A, log-rank 検定 $p = 0.004$)、一方多重癌群では有意差はなかった(図 2B, log-rank 検定 $p = 0.704$)。

Cox-hazard モデル(表 3)では、単変量解析で非多重癌症例では SMYD2 タンパクの発現($p = 0.035$)、静脈侵襲($p < 0.001$)が予後不良と関連していたが、多重癌症例では喫煙習慣($p = 0.023$)、静脈侵襲($p < 0.001$)が予後不良と関連していた。性別、年齢、アルコール飲酒、組織分化度、TMN 分類の pT, pN, pStage, p53 や p16 の免疫染色性については単変量解析では相関を認めなかった。

単変量解析で予後に対して有意もしくはそれに近い関連性が認められたパラメーターおよび TMN 分類の pStage について Cox 回帰多変量解析を行った(表 4)。非多重癌では pStage($p = 0.002$)や SMYD2 タンパクの免疫反応性($p = 0.034$)、p53 の免疫反応性($p = 0.043$)が全生存率に対する独立した予測因子であった。一方多重癌群では、静脈侵襲のみ($p = 0.005$)が有意な因子であった。

d. HPV 非関連 HNSCC 症例での SMYD2 と p53 の関係

215 例の HPV 非関連 HNSCC で p53 の免疫染色が陽性となったのは 88 例(40.9%)であり、52 例の非多重癌と 37 例の多重癌が含まれていた(表 1)。非多重癌群と多重癌群の両群において p53 免疫染色陽性と SMYD2 の免疫染色陽性については有意な相関を認めなかった(各々 $p = 0.432$ と $p = 0.261$, 表 2)。Kaplan-Meier 生存曲線では p53 の発現は全生存率と多少は関

連性があるようであったが有意ではなかった(log-rank 検定で各々 $p = 0.064, 0.66$; 図 2C, 2D)。非多重癌群と多重癌群の各々を p53 と SMYD2 の免疫染色の陰性・陽性によって 4 つの亜群にそれぞれ分けた。非多重癌群では 4 つの亜群の中で生存率に有意な差が認められた(log-rank 検定 $p = 0.039$ 、図 2E)。つまり p53 陽性で SMYD2 陽性の亜群が最も予後が悪くそして SMYD2 が陽性の 2 つの亜群は SMYD2 が陰性の 2 つの亜群よりも予後が悪かった。多重癌群では p53 陰性で SMYD2 陽性の亜群と p53 陽性で SMYD2 陽性の亜群との間に有意差を認めた(log-rank 検定 $p = 0.017$ 、図 2F)。

e. HNSCC 細胞系における *SMYD2* 過剰発現

5 つの HNSCC 細胞系と 4 つの ESCC 細胞系に定量 RT-PCR 解析を行った。また、KYSE150 細胞系を *SMYD2* mRNA 高発現対照群、TE10 細胞系を *SMYD2* mRNA 低発現対照群に使用した[10]。5 つの HNSCC 細胞系のうち、CCL-138、UM-SCC-4、UM-SCC-17B、および UM-SCC-47 に *SMYD2* mRNA 高発現が認められた(図 3A)。ウェスタンブロットでは、SMYD2 タンパク質発現は、5 HNSCC 細胞系のうち 3 つの細胞系(CCL-138、UM-SCC-4、UM-SCC-17B)で認められた mRNA 発現と相関関係にあるようであったが、UM-SCC-47 では mRNA 発現とタンパク質発現にはなかった(図 3B)。これらの細胞系の *TP53* 変異については以前に次のように報告済みである。HTB-43[24]、CLL-138[24]、UM-SCC4[24]、KYSE150[10]、TE6[10]、および TE10[10]には *TP53* 変異が認められたが、一方 UM-SCC-17B[18]、UM-SCC-47[18]、および KYSE30[10, 18]は *TP53* 野生型であった。*SMYD2* mRNA とタンパク質の発現レベルは *TP53* 変異とは無関係で、この所見は ESCC 細胞系の以前の結果と一致していた[10]。HPV に関しては、UM-SCC-47 は HPV16 *E6* と *E7* が以前の報告[20]と同様に陽性であること、他の 4 つの HNSCC 細胞系は HPV-DNA 陰性であることを PCR で確認した[25, 26]。

f. HNSCC 細胞系における *SMYD2* の in vitro での役割

SMYD2 が腫瘍遺伝子として機能するか否かを確認するため、*SMYD2* に特異的な siRNA を用いて細胞増殖アッセイを行って、*SMYD2* のノックダウンが HNSCC 細胞の増殖を抑制するか否かを調べた。*SMYD2* mRNA とタンパク質の発現レベルが高く、野生型 *TP53* を有する UM-SCC-17B 細胞系では、対照の siRNA-Luc と比較すると siRNA-SMYD2 トランスフェクション後 24~72 時間以内にタンパク質レベルで SMYD2 がノックダウンされていた(図 4A)。siRNA-SMYD2 をトランスフェクションした UM-SCC-17B 細胞の増殖率は siRNA-Luc をトランスフェクションした細胞よりも、72 時間後の時点では 64.3%低かった(図 4B)。また p21 発現も、SMYD2-siRNAs 導入後タンパク質レベルで誘導された(図 4A)。

次に、Transwell 細胞遊走・浸潤アッセイを行って、siRNA-SMYD2 をトランスフェクションした UM-SCC-17B 細胞が多孔を通過する能力を調べた。細胞遊走アッセイにはコーティングされていない膜を使用し、浸潤アッセイにはマトリゲルコーティングした膜を用いた。いずれの条件下でもチャンバーの下層に遊走した siRNA-SMYD2 トランスフェクション細胞の数は siRNA-Luc トランスフェクション細胞よりもはるかに少なかった。ことから *SMYD2* は HNSCC 細胞の遊走や浸潤能力を増強させることが示唆された(図 5)。

g. HNSCC 細胞株における *SMYD2* 遺伝子の増幅

KYSE30 において 1 細胞あたりの *SMYD2* 平均信号と平均 *SMYD2/CEN1* 比はそれぞれ 2.3 と 1.07 であり、また KYSE150 では 8.6 と 3.89 であった。5 つの HNSCC 細胞株で *SMYD2* 遺伝子の増幅は認められなかった(表 5、図 6)

表 1. HPV 非関連 HNSCC での臨床病理学的パラメーターとの関係

パラメーター	症例数 (%)			p
	計	非多重 HNSCC	多重 HNSCC	
がんの部位				
中咽頭	72	42 (58)	30 (42)	0.032
下咽頭	71	44 (62)	27 (38)	
喉頭	72	56 (78)	16 (22)	
年齢(歳)				
<60	55	32 (58)	23 (42)	0.153
≥60	160	110 (69)	50 (31)	
性別				
男性	190	123 (65)	67 (35)	0.263
女性	25	19 (76)	6 (34)	
タバコ				
喫煙歴なし	41	28 (68)	13 (32)	0.735
喫煙歴あり	174	114 (66)	60 (34)	
アルコール摂取				
非習慣性摂取	61	52 (85)	9 (15)	<0.001
習慣性摂取	154	90 (58)	64 (41)	
pT				
T1	19	10 (53)	9 (47)	0.121
T2	93	56 (60)	37 (40)	
T3	54	39 (72)	15 (28)	
T4	49	37 (75)	12 (25)	
pN				
N0	108	65 (60)	43 (40)	0.263
N1	31	21 (68)	10 (32)	
N2	75	55 (73)	20 (27)	
N3	1	1 (100)	0 (0)	
pStage				
I	12	5 (42)	7 (58)	0.006
II	56	29 (52)	27 (48)	
III	39	27 (69)	12 (31)	
IV	108	81 (75)	27 (25)	
組織分化度				
高分化から中分化	142	94 (66)	48 (34)	0.948
低分化	73	48 (66)	25 (34)	
組織学的静脈侵襲				
あり	44	32 (73)	12 (27)	0.294
なし	171	110 (64)	61 (36)	
転機				
死亡	90	55 (61)	35 (39)	0.194
生存	125	87 (70)	38 (30)	
SMYD2 免疫染色				
陽性	133	80 (60)	53 (40)	0.020
陰性	82	62 (76)	20 (24)	
p53 免疫染色				
陽性	88	52 (59)	37 (41)	0.037
陰性	127	90 (71)	36 (29)	
p16 免疫染色				
陽性	18	16 (89)	3 (11)	0.080
陰性	197	126 (64)	70 (36)	
合計	215	142	73	

統計学的に有意な値に下線を引いた。p値についてはカイ二乗検定もしくはフィッシャーの正確検定<0.05のものを有意とした。多重症例のTMN分類については現行の1つの癌についてを評価した。

表 2. HPV 非関連 HNSCC での SMYD2 免疫染色性と臨床病理学的パラメーターとの関係

パラメーター	非多重 HNSCC		p	多重 HNSCC		p
	症例数 (%)	SMYD2 (+)		症例数 (%)	SMYD2 (+)	
年齢(歳)						
<60	32	18 (56)	0.990	23	21 (91)	0.033
≥60	110	62 (56)		50	42 (84)	
性別						
男性	123	67 (54)	0.253	67	48 (72)	0.538
女性	19	13 (68)		6	5 (83)	
タバコ						
喫煙歴なし	28	16 (57)	0.923	13	8 (62)	0.323
喫煙歴あり	114	64 (56)		60	45 (75)	
アルコール摂取						
非習慣	52	33 (63)	0.151	27	18 (34)	0.448
習慣	90	47 (52)		44	33 (62)	
がんの部位						
中咽頭	42	28 (67)	0.171	30	26 (87)	0.060
下咽頭	44	26 (59)		27	18 (67)	
喉頭	56	26 (46)		16	9 (56)	
pT						
T1	10	4 (40)	0.635	9	8 (89)	<0.001
T2	56	32 (57)		37	30 (81)	
T3	39	21 (54)		15	12 (80)	
T4	37	23 (62)		12	3 (25)	
pN						
N0	71	35 (49)	0.295	47	38 (81)	0.045
N1	21	10 (48)		10	7 (70)	
N2	55	36 (65)		20	10 (50)	
N3	1	1 (100)		0	0 (-)	
pStage						
I	5	2 (40)	0.381	7	6 (86)	0.004
II	29	16 (55)		27	23 (85)	
III	27	12 (44)		12	11 (92)	
IV	81	50 (62)		27	13 (48)	
組織分化度						
高から中分化	94	52 (56)	0.731	48	34 (71)	0.638
低分化	48	28 (58)		25	19 (76)	
組織学的静侵襲						
あり	32	18 (56)	0.944	12	9 (75)	0.973
なし	110	60 (55)		61	43 (70)	
予後						
死亡	55	40 (80)	0.001	35	25 (71)	0.829
生存	87	40 (46)		38	28 (74)	
p53 免疫染色						
陽性	51	31 (61)	0.423	37	29 (78)	0.261
陰性	91	49 (54)		36	24 (67)	
p16 免疫染色						
陽性	16	11 (69)	0.287	3	2 (67)	0.670
陰性	126	69 (55)		70	51 (73)	
合計	142	80 (56)		73	53 (73)	

統計学的に有意な値に下線を引いた。p値についてはカイ二乗検定もしくはフィッシャーの正確検定<0.05のものを有意とした。多重症例のTMN分類については現行の1つの癌についてを評価した。

表 3. Cox-hazard モデルでの全生存についての単変量解析

パラメーター	非多重癌 HNSCC			多重癌 HNSCC		
	Hazard 比	95% 信頼区間	p	Hazard 比	95% 信頼区間	p
男性 対 女性	0.73	0.35–1.50	0.401	1.20	0.28–5.14	0.800
60 歳未満 対 60 歳以上	1.42	0.76–2.65	0.266	1.16	0.55–2.46	0.688
喫煙歴なし 対 喫煙歴あり	1.45	0.80–2.63	0.217	2.59	1.13–5.94	0.023
アルコール非習慣性 対 習慣性摂取	1.11	0.54–2.27	0.763	0.45	0.18–1.10	0.082
pT category pT2-4 対 pT1	1.90	0.46–7.84	0.375	0.71	0.23–2.12	0.544
pN1-3 対 pN0	1.58	0.80–3.12	0.187	1.55	0.50–4.75	0.437
pStage III + IV 対 I + II	1.84	0.74–4.58	0.189	1.51	0.46–4.96	0.492
静脈侵襲 あり 対 なし	2.72	1.56–4.72	<0.001	4.18	1.92–9.09	<0.001
SMYD2 陽性 対 陰性	1.87	1.04–3.34	0.035	1.25	0.60–2.61	0.544
p53 陽性 対 陰性	1.57	0.92–2.68	0.095	1.68	0.83–3.41	0.145
p16 陽性 対 陰性	0.53	0.18–1.60	0.265	0.46	0.02–10.0	0.627

統計学的に有意な値に下線を引いた。 p 値についてはカイニ乗検定もしくはフィッシャーの正確検定 < 0.05 のものを有意とした。多重癌症例の TMN 分類については現行の 1 つの癌についてを評価した。

表 4. Cox 回帰多変量解析による全生存についての多変量解析

パラメーター	非多重癌 HNSCC			多重癌 HNSCC		
	Hazard 比	95% 信頼区間	p	Hazard 比	95% 信頼区間	p
喫煙者 対 非喫煙者				0.64	0.25–1.60	0.347
アルコール非習慣性 対 習慣性摂取				1.60	0.70–3.63	0.257
pStage III + IV 対 I + II	3.89	1.64–9.20	0.002	1.31	0.58–2.94	0.509
静脈侵襲 あり 対 なし	1.21	0.62–2.38	0.565	3.29	1.42–7.58	0.005
SMYD2 陽性 対 陰性	1.88	1.04–3.39	0.034			
p53 陽性 対 陰性	1.72	1.01–2.92	0.043			

統計学的に有意な値に下線を引いた。 p 値についてはカイニ乗検定もしくはフィッシャーの正確検定 < 0.05 のものを有意とした。多重癌症例の TMN 分類については現行の 1 つの癌についてを評価した。

表 5. HNSCC と ESCC 細胞株での SMYD2 とクロモソーム 1 セントロメア (CEN1) の平均コピー数と SMYD2/CEN1 比

細胞株	平均コピー数		SMYD2/CEN1 比
	SMYD2	CEN1	
HTB-43	4.2	2.3	1.84
CCL-138	2.4	2.0	1.21
UM-SCC-4	2.9	1.5	1.97
UM-SCC-6	2.2	2.4	0.94
UM-SCC-11B	2.5	1.8	1.4
UM-SCC-17B	1.5	1.7	0.88
UM-SCC-25	1.0	1.7	0.59
UM-SCC-47	1.8	1.8	1.00
KYSE30 (コントロール)	2.3	2.2	1.07
KYSE150 (コントロール)	8.6	2.2	3.89

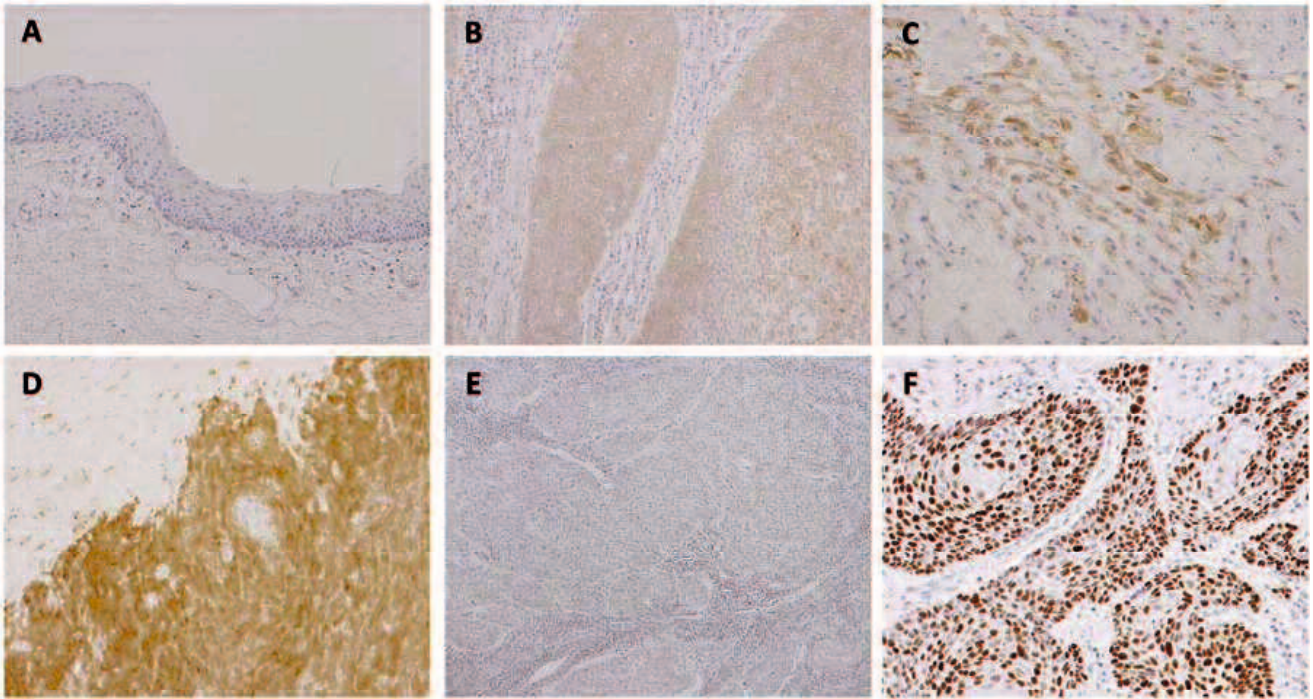


図1 HNSCC 症例と非腫瘍性咽頭粘膜での SMYD2 と p53 の免疫組織染色像

(A) 非腫瘍性咽頭粘膜は SMYD2 陰性である(強度スコア 0 ; x 200)。(B-D) 各々異なる HNSCC 症例での SMYD2 の染色結果で各々軽度(強度スコア 1 ; x 200)、中等度(強度スコア 2 ; x 200)、強度(強度スコア 3 ; x 200)である。(E、F) 各々 p53 染色陰性の代表的な像(E ; x 100)と核染色性が 10%以上の腫瘍細胞で認められ p53 陽性と判断したもの(F ; x 200)。

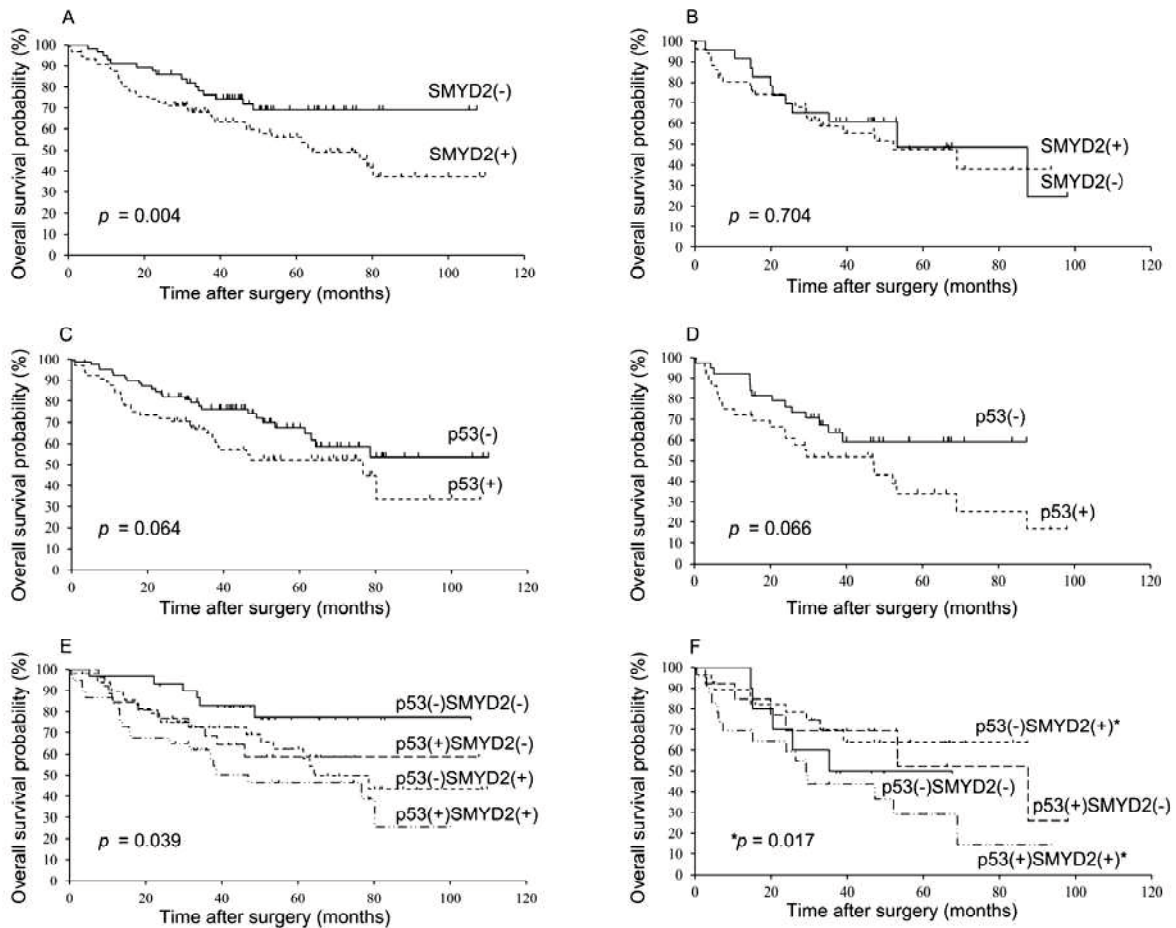


図2. HPV 非関連 HNSCC の非多重癌群と多重癌群での全生存曲線

(A) 非多重癌では腫瘍細胞における SMYD2 の発現は有意に短い全生存期間と相関していた(log-rank 検定、 $p = 0.040$)。(B) 多重癌群では SMYD2 の免疫染色性は全生存期間とは関連していなかった($p = 0.704$)。(C) 非多重癌群では p53 の免疫染色性は全生存率の低さと関連する傾向にあったが統計学的には有意でなかった($p = 0.064$)。(D) 同様に多重癌群では p53 の免疫染色性は全生存率の低さと関連する傾向にあったが統計学的には有意でなかった($p = 0.066$)。(E) 非多重癌群を p53 と SMYD2 の免疫染色性で 4 つの亜群に分けた。4 つの群には有意差がみられ($p = 0.039$)、p53 陽性かつ SMYD2 陽性の亜群が最も予後が悪かった。(F) 非多重癌群を p53 と SMYD2 の免疫染色性で 4 つの亜群に分けたところ、p53 陰性かつ SMYD2 陽性の亜群と p53 陽性かつ SMYD2 陽性の亜群との間で有意差が認められた($p = 0.017$)。Time after surgery (month), 術後経過期間(月); Overall survival probability, 全生存率。

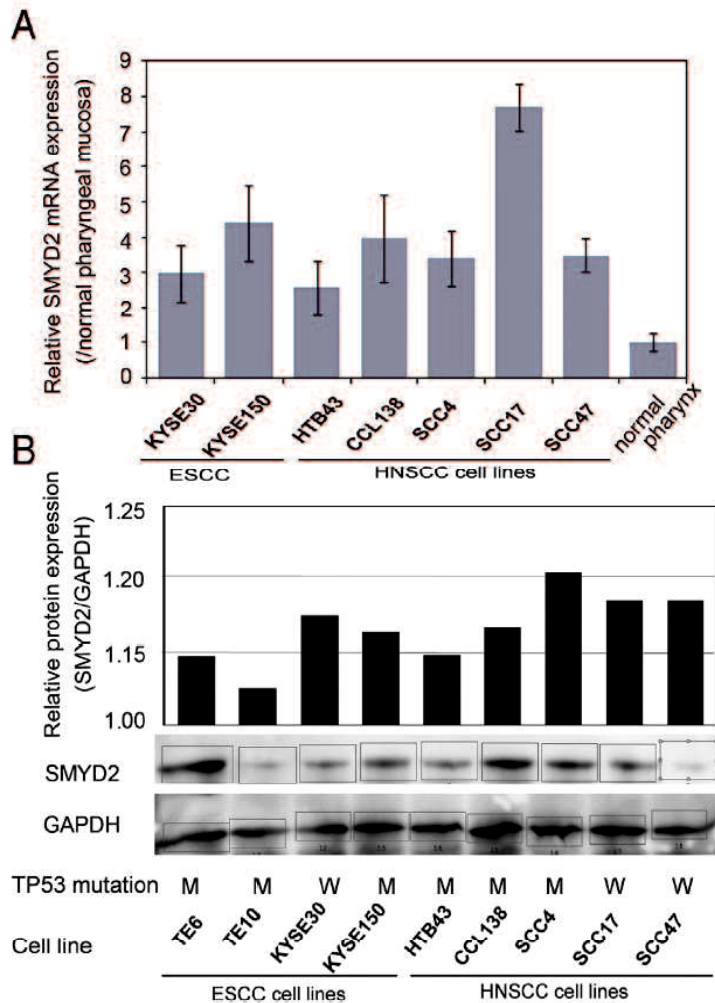


図3 HNSCC と ESCC での *SMYD2* mRNA 発現と *SMYD2* タンパク発現、*TP53* 変異についてのパネル

(A) *SMYD2*mRNA については定量リアルタイム PCR を使って測定した。中間値および中央値はそれぞれ灰色および黒色のバーで示した。比較のために用いた ESCC 細胞株のうち TE6 と KYSE30、KYSE150 は *SMYD2*mRNA 高発現であったが TE10 は低発現であった。HNSCC では 5 つの細胞株中、CCL-138 と UM-SCC-4、UM-SCC-17B、UM-SCC-47 の 4 つが高発現であった。(B) *SMYD2* 蛋白の発現についてはウエスタンブロッティングによって測定した。5 つの HNSCC のうち、CCL-138 と UM-SCC-4、UM-SCC-17B の 3 つが mRNA の発現状態と一致した。*TP53* mutation (変異) は M, mutant type (変異型); W, wild type (野生型)。

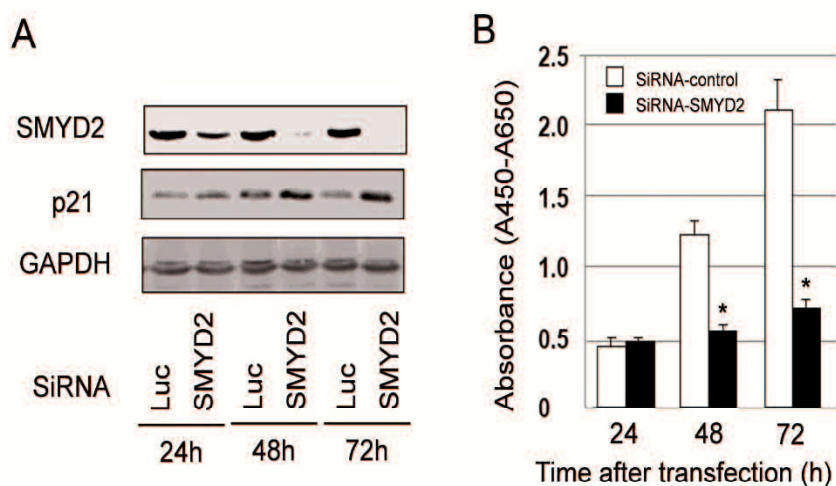


図4 HNSCC 細胞株 UM-SCC-17B で siRNA を用いた *SMYD2* のノックダウンの効果

(A) トランスフェクションから各々 24、48、72 時間後の *SMYD2* および *p21* の蛋白発現。陰性コントロールとして siRNA-Luc を使い、si-RNA-SMYD2 と比較した。(GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素) (B) si-RNA-SMYD2 をトランスフェクションした細胞の増殖能について WST アッセイ (水溶性テトラゾリウム塩アッセイ) を用いて評価した。4 回の実験結果の平均値と標準偏差として示した。Mann-Whitney U 検定を用い * $p < 0.05$ は siRNA-Luc トランスフェクション細胞 (si-RNA コントロール) に対して得られた。

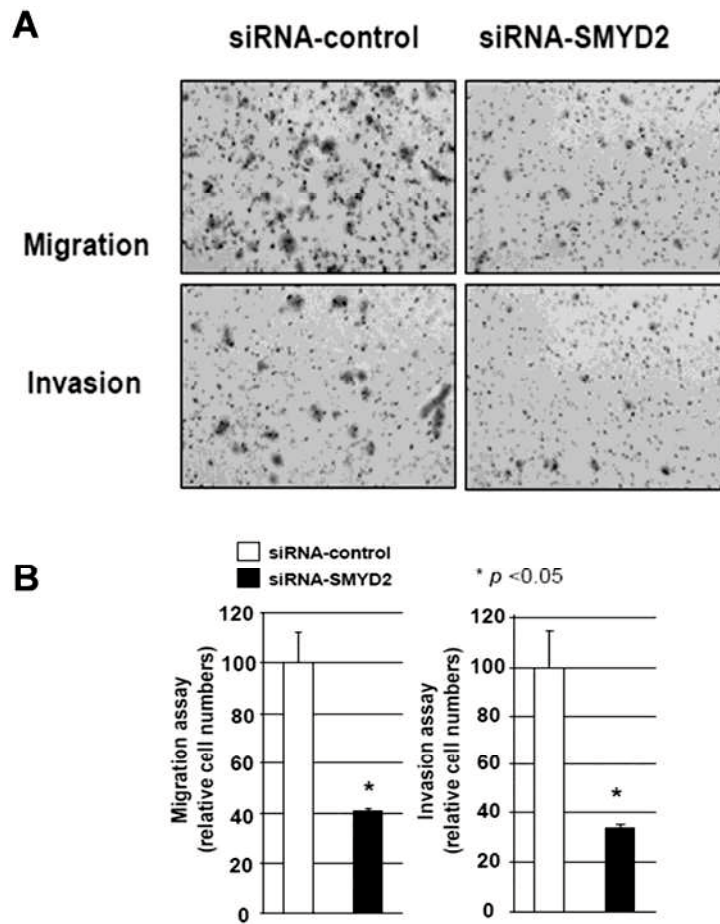


図5 UM-SCC-17B細胞で内因性 *SMYD2* をノックダウンしたことによる遊走や浸潤への影響

(A) siRNA トランスフェクション 48 時間ごの典型的な細胞像。上部のチャンパーには合計 2×10^4 個のトランスフェクションされた細胞が存在する。(B) 遊走および浸潤についての定量的評価。* $p < 0.05$ は siRNA-Luc トランスフェクション細胞 (si-RNA コントロール) に対して得られた。

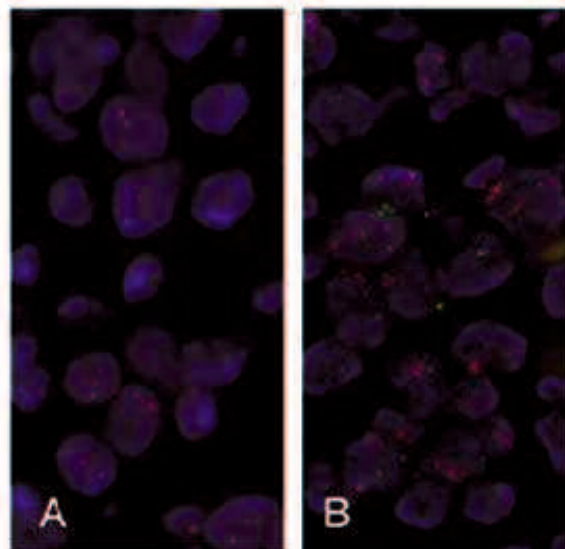


図6 FISH 解析による HTB-43 と KYSE150 細胞株での *SMYD2* 遺伝子のコピー数

核は青く染色される。各々の *SMYD2* 遺伝子コピーはオレンジの点、クロモソーム 1 セントロメア (CEN1) コピーはグーリンの点として認められる。(A) HTB-43 細胞株で *SMYD2*/CEN1 の平均値は 1 細胞あたり 1.84 であった。(B) KYSE150 細胞株では *SMYD2*/CEN1 の平均値は 1 細胞あたり 3.89 であった。

6. 考察

今回の研究で *SMYD2* が HPV 非関連 HNSCC の進展や増殖に関与していることを2つの知見から示した。1つ目は *SMYD2* の免疫組織学的発現は外科的に切除された HPV 非関連非多重癌 HNSCC 症例において予後不良と相関することである。このことは以前の ESCC の報告と一致する。2つ目は HPV 陰性の HNSCC 細胞株において *SMYD2* のノックダウンは増殖や遊走、浸潤を著明に阻害することである。

本研究では HPV-DNA が陰性の臨床症例を対象とした。HPV 関連癌では *E6, E7* 遺伝子が癌化の主要な役割を果たすということが確立されているが、一方で HPV 非関連癌では癌化についての詳細な機序は説明できていない。そのため我々は HPV 非関連 HNSCC において *SMYD2* が発癌因子として機能するかどうかについて調べた。集めた HPV 非関連 HNSCC 臨床症例をまず多重癌症例と非多重癌症例とに分けた。一部の患者では頭頸部領域に2つ目の原発癌 (second primary carcinoma) もしくはそれ以上の数の原発癌を生じることが知られており、そのことによって治療がより困難となり予後不良となってしまう [6, 22]。我々は当初は *SMYD2* が HPV 非関連 HNSCC の多重癌、非多重癌症例の両方において予後不良と相関しているのではないかと仮説を立てていた。しかしながらこの相関関係は非多重癌症例にのみ証明された、つまり *SMYD2* の発現は TNM ステージには依存せずにより短い全生存期間と有意に相関していた。一方で多重癌症例では *SMYD2* の発現例が多かったのにもかかわらず、これらの関係は明らかでなかった。これらのことから HNSCC 多重癌における癌化の機序はより複雑であり、*SMYD2* の癌遺伝子としての働きはより限られたものになるということが考えられた。

HNSCC 細胞の核での p53 の発現に関して、HPV 非関連 HNSCC では p53 が免疫組織学的に陽性となる症例はより予後不良であるという我々の結果は以前の幾つかの報告と一致していた [23]。 *TP53* 遺伝子変異と p53 D0-7 クローン を1次抗体として用いた場合の核の染色性については相関があると報告されており [24]、そのため今回外科的切除検体の *TP53* 変異を類推するために D0-7 抗体を代理的に用いて検討した。我々は非多重癌および多重癌を *SMYD2* と p53 の免疫染色性によって各々4つの群に分けた。非多重癌症例では *SMYD2* 陽性/p53 陽性の群が最も全生存率が悪かった。次に *SMYD2* 陽性/p53 陰性群、*SMYD2* 陰性/p53 陽性群、*SMYD2* 陰性/p53 陰性群の順であった。これは食道での検討と一致していた [10]。p53 陰性腫瘍において *SMYD2* の発現はより予後不良に関連していると言えた。*SMYD2* 陽性の患者が明らかに予後不良であったことから、p53 の発現の有無や *TP53* の変異にかかわらず、*SMYD2* の発現が意義ある予後マーカーであることを示唆する。また *SMYD2* の作用は p53 以外の基質に介在されることで HNSCC の癌化を促している可能性もある。本検討からは p53 と *SMYD2* の免疫組織染色の組み合わせは HPV 非関連性非多重癌の HNSCC 症例の予後予測に役立つと考える。

siRNA を用いた内因性の *SMYD2* のノックダウンでは *SMYD2* の内因性発現を抑制するとともに、HPV 非関連の *TP53* wild type の HNSCC 細胞の増殖や遊走、浸潤が抑制された。さらに、p21 は *SMYD2* のノックダウン後に発現上昇した。これらのことから *SMYD2* が HPV 非関連 HNSCC において *SMYD2* が発癌作用をもっていることが示唆される。

SMYD2 が p53 以外の他のターゲットの DNA をメチル化し、それによって p21 発現を抑制し細胞増殖が阻害されている可能性はある。その p53 以外の基質の候補としてはヒストン H3 と Rb1 が挙げられる。*SMYD2* は *SMYD* 蛋白ファミリー (*SMYD1* から *SMYD5*) の一つで最初はヒストン H3K36 特異的メチルトランスフェラーゼを含む SET/MYND ドメインの1つのスプリットとして同定され [7]、in vitro で HSP90alpha との相互作用を介して H3K4 をメチル化することが分かった [25]。H3K36 のメチル化は翻訳活動とつながってはいるが [26]、翻訳を促進するのか、癌化への意義があるのかは解明されていない。*SMYD* ファミリーの別のメンバーで

ある SMYD3 は乳癌などの他臓器の癌において癌遺伝子として機能し、またヒストン H3K4 メチルトランスフェラーゼであることが分かっている [27]。そのためヒストン H3K4 メチルトランスフェラーゼである SMYD2 と SMYD3 の両方が癌遺伝子として機能することが考えられる。RB 蛋白は膀胱癌の細胞株において SMYD2 によってリジン 860 がメチル化されることが示されており [9]、また RB1 のメチル化は E2F の翻訳機能を促進し、細胞周期を活性化させる [28]。そのようなことから SMYD2 が他臓器の癌においても癌を促進する因子として働くことが想定できる。

ヒストンメチルトランスフェラーゼとして最初に発見された SUV39H1 を皮切りに、SMYD2 のみならずヒストンや他の蛋白のリジンをメチル化するまたは脱メチル化するその他多数の蛋白が同定されてきている [29]。これらの幾つかはその媒介物とともに、癌において主要な役割を果たすことが示されてきたが詳細な機序については不明な点が多い。今後の解明が進むにつれて SMYD2 を含むリジンメチルトランスフェラーゼは癌治療の新世代エピジェネティック薬のターゲットとなる可能性も十分にある。

我々が行った 8 例の HNSCC 由来細胞株の FISH 解析では *SMYD2* 遺伝子の増幅は見られず、また *SMYD2* アレルのポリソミーもみられなかった。そのため HNSCC において *SMYD2* が遺伝子増幅によって活性化した癌遺伝子の一つであるという確証は得られなかった。

7. 結語

HPV 非関連 HNSCC で SMYD2 が進展や増殖に関与することを示した。SMYD2 タンパクは腫瘍において高頻度に認められ、その発現は HPV 非関連の非多重癌の HNSCC において予後不良と相関した。*SMYD2* のノックダウンによって、HNSCC 細胞の増殖や遊走、浸潤に作用していることが示唆された。SMYD2 と p53 や p21 の機能的な関係は不明な点が多く、機序の詳細は解明されていないが、HPV 非関連 HNSCC において SMYD2 は有用な予後マーカーであり、また将来的には分子治療のターゲットとなりうる。

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた山口大学大学院医学系研究科 情報解析医学系学域 病理形態学分野 池田栄二教授に感謝いたします。また関連論文の共著者としてご指導いただいた津田均先生(防衛医科大学校)をはじめ、金井弥栄先生、関根茂樹先生、森泰昌先生、吉本世一先生(以上、国立がん研究センター)、小松周平先生、大辻英吾先生(以上、京都府立医科大学)に御礼申し上げます。

9. 参考文献

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of clinical oncology* 2006;24:2137-50.
2. Kutler DJ, Auerbach AD, Satagopan J, et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 2003;129:106.
3. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92:709-20.
4. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine* 2010;363:24-35.
5. León X, Quer M, Diez S, et al. Second neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head & neck* 1999;21:204-10.
6. Priante AV, Castilho EC, Kowalski LP. Second primary tumors in patients with head and neck cancer. *Curr Oncol Rep* 2011;13:132-7.
7. Brown MA, Sims RJ, 3rd, Gottlieb PD, Tucker PW. Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer* 2006;5:26.
8. Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, et al. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 2006;444:629-32.
9. Saddic LA, West LE, Aslanian A, et al. Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2. *J Biol Chem* 2010;285:37733-40.
10. Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, et al. Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2009;30:1139-46.
11. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press: Lyon, France, 2005.
12. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-62.
13. Riethdorf S, Riethdorf L, Milde-Langosch K, Park TW, Loning T. Differences in HPV 16- and HPV 18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2000;437:491-500.
14. Nishiwaki M, Yamamoto T, Tone S, et al. Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex PCR and clinical applications. *J Clin Microbiol* 2008;46:1161-8.
15. Rangan S. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1972;29:117-21.
16. Peterson W, Stulberg C, Swanborg N, Robinson A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymes in human cell cultures determined by sucrose-agar gel and cellulose acetate zymograms. *Experimental Biology and Medicine* 1968;128:772-6.
17. Grénman R, Carey TE, McClatchey KD, et al. In vitro radiation resistance among cell lines established from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1991;67:2741-7.
18. Bradford CR, Zhu S, Ogawa H, et al. P53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell

carcinoma lines. *Head Neck* 2003;25:654-61.

19. Shimada Y, Imamura M, Wagata T, Yamaguchi N, Tobe T. Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines. *Cancer* 1992;69:277-84.
20. Nishihira T, Hashimoto Y, Katayama M, Mori S, Kuroki T. Molecular and cellular features of esophageal cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* 1993;119:441-9.
21. Yu W, Imoto I, Inoue J, et al. A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene* 2006;26:1178-87.
22. Kashimoto K, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Overexpression of TRIM44 contributes to malignant outcome in gastric carcinoma. *Cancer science* 2012;103:2021-6.
23. Nishimura Y, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma. *British journal of cancer* 2013;108:1324-31.
24. Caamano J, Zhang SY, Rosvold EA, Bauer B, Klein-Szanto AJ. p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1993;142:1131-9.
25. Zhao M, Sano D, Pickering CR, et al. Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clin Cancer Res* 2011;17:7248-64.
26. Bradford CR, Zacks SE, Androphy EJ, et al. Human papillomavirus DNA sequences in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;104:303-10.
27. Chuang SC, Scelo G, Tonita JM, et al. Risk of second primary cancer among patients with head and neck cancers: A pooled analysis of 13 cancer registries. *Int J Cancer* 2008;123:2390-6.
28. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Journal of oral pathology & medicine* 2000;29:413-25.
29. Saunders ME, MacKenzie R, Shipman R, et al. Patterns of p53 gene mutations in head and neck cancer: full-length gene sequencing and results of primary radiotherapy. *Clinical cancer research* 1999;5:2455-63.
30. Abu-Farha M, Lanouette S, Elisma F, et al. Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J Mol Cell Biol* 2011;3:301-8.
31. Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, et al. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:17732-6.
32. Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature cell biology* 2004;6:731-40.
33. Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, et al. RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia* 2012;14:476-86.
34. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000;406:593-9.