

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16842

研究課題名（和文）NETCAGEによる婦人科癌のエンハンサーに特化した転写制御領域地図の作成

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism of transcriptional regulatory function of enhancer for gynecologic cancer by NET-CAGE

研究代表者

吉田 恵美子（Emiko, Yoshida）

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90825788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：従来NET-CAGE法には核内RNAの抽出精製を要するが、検体必要量が多いという欠点があった。そこで簡易型のNET-CAGEを開発し、従来より少量かつ簡便な手法での実施が可能となった。さらに簡易型ではenhancer RNAがより濃縮しており、enhancer解析としても優位であり、19,297のenhancerを検出した。その半分以上(13,035)は新規enhancerであった。さらに明細胞癌ではプロモーター発現レベルでクラスタリングすると、大きく二つのクラスターに分離され、同一の病理組織型でも異なる遺伝子発現分布があり、臨床的サブタイプと関連する遺伝子発現分布の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

婦人科癌でも様々な大規模な統合的ゲノム解析は実施されてきたが、エンハンサーによる遺伝子の転写制御が婦人科癌の腫瘍形成およびその特性の細分化に中心的な役割を果たしている可能性は未だ十分に検証されていない。本研究では、臨床データ、ゲノム情報、RNA発現、そして活性化エンハンサー領域を含む統合解析により、エンハンサーに特化した転写制御領域地図の作成を試みた。活性情報の充実した転写制御領域地図は、発生・維持の根源的な分子メカニズムを解明や、臨床応用を考慮した新規の治療標的や診断バイオマーカーの同定に発展する可能性だけでなく、今後のヒトゲノムの機能を更に考えるうえで重要な基盤になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Conventional NET-CAGE method requires extraction and purification of nuclear RNA, but it requires a large amount of tissue sample. Therefore, we succeeded to develop a simple NET-CAGE, which can be implemented in a smaller amount and with a simpler method than before. Furthermore, in the simplified method, enhancer RNA is more enriched, which is also superior for enhancer analysis, and 19,297 enhancers were detected. More than half (13,035) were novel enhancers. Furthermore, focussing on clear cell carcinoma, when clustered at the promoter expression level, it was classified into two clusters. Even with the same histopathological type, they have different gene expression distributions. It suggests that the possibility of gene expression distributions that correlate with clinical subtypes.

研究分野：婦人科腫瘍

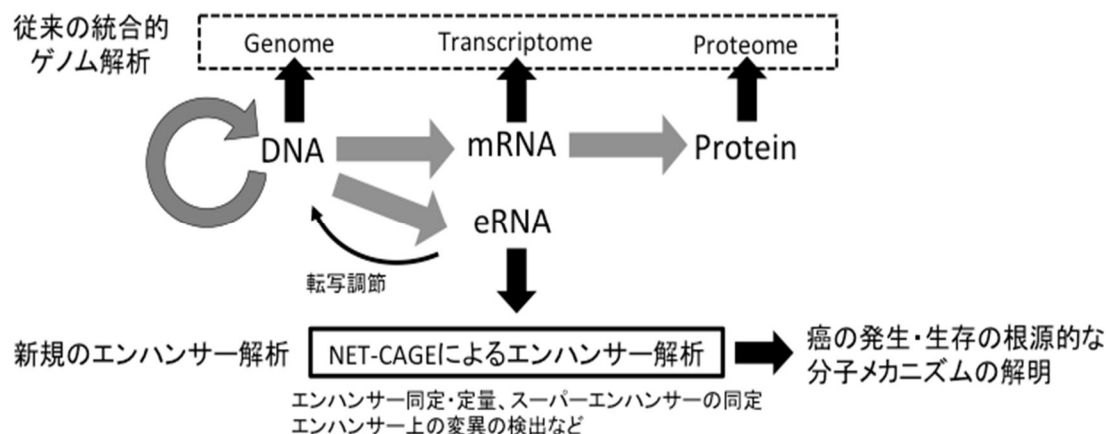
キーワード：卵巣癌 エンハンサー NETCAGE プロモーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年多くの癌種で遺伝子検査が多数開発され、治療法選択の新たな判断基準の提供という個別化医療への貢献が実施されている。これに対して婦人科癌は増加傾向にもかかわらず、遺伝子情報に基づいた個別化医療の実践は他癌種に及ばないのが現状である。

子宮体癌の発生機構の解明は、従来考えられてきた多段階発癌機構のみでは十分に説明できていなかった。しかし2013年になって、The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトにより子宮体癌の統合的ゲノム解析が発表され(Douglas A. Levine & TCGA, Nature 497, 2013)、エピジェネティックな特性から子宮体癌の4サブタイプが提唱された。エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列に変化は起こらないのに遺伝子の機能が変化し、この変化に伴い表現型が変化することである。すなわち、TCGAの分類は、変異に代表されるような塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の変化に基づく新たな分類法であった。これらは、SNPアレイを用いたSCNAs解析、MSI検査、全エクソン解析、トランスクリプトーム・プロテオーム解析の結果を全て組み合わせ分類されており、その複雑性とコスト面から臨床応用には至っていない。正確なサブタイプ分類の意義は、適切な治療選択、適正な切除範囲の設定(低侵襲化もしくは切除範囲の拡大)、若年発症者の妊孕性温存術式の可否、適切な術後サーベイランスの計画の設定にある。すなわち、日常臨床で応用可能な診断法が成立してこそ個別化医療の進歩に繋がるものである。また、発生・生存に深く関与する遺伝子異常(driver mutation)がサブタイプの一因子となれば、適切な分子標的薬による治療も可能となる。例えば、肺癌では、oncogenic driver mutationが次々と発見され、その診断と分子標的治療の実践によって治療が著しく進歩してきている。本研究でサブタイプ確立のために着目したのはエンハンサーである。様々な転写因子がプロモーターやエンハンサーといったゲノムの領域に結合し、標的遺伝子の発現を活性化する。興味深いことに、腫瘍細胞では正常細胞で使われていない特異的なプロモーターにより遺伝子を発現している例が多く、さらに、エンハンサーによる遺伝子の発現制御は、腫瘍細胞のアイデンティティの決定や疾患における細胞特性の脱制御に中心的な役割を担う。近年、後天的なゲノム変異が腫瘍特異的エンハンサーを形成し、遺伝子の発現が変化することによって腫瘍形成が促進することが報告され(Herz HM et al. Mol cell. 2014 など)、また、複数のエンハンサーが局所的にクラスターを形成したスーパーエンハンサーの多くが細胞機能の鍵となる遺伝子の極近傍に同定されている(Whyte et al. Cell 2013, Hnisz et al. Cell 2013)ことから腫瘍との関連性が示唆される。しかしTCGAプロジェクトのような大規模統合的ゲノム解析でもこのようなエンハンサーに特化した解析は実施されておらず、エンハンサーによる遺伝子の転写制御が婦人科癌の腫瘍形成に中心的な役割を果たしている可能性は未だ十分に検証されていない。本研究では、患者毎の臨床データ、ゲノム情報、RNA発現情報、そして従来法では見えなかった活性化エンハンサー領域などのエピジェネティクス情報も絡めた統合解析により、婦人科癌のエンハンサーに特化した転写制御領域地図の作成を試みる。この転写制御領域地図は、婦人科癌の発生・進展の根源的な分子メカニズムを解明につながる可能性だけでなく、臨床応用を考慮した新規の治療標的や診断バイオマーカー同定に発展する可能性が期待される。



2. 研究の目的

本研究では、エンハンサー解析技術 NET-CAGE 法により、婦人科癌を形成・維持しているコアの転写プログラムを解析する点が独創的である。これにより、

(1) 従来法では見えなかった活性化エンハンサー領域を明らかにし、エンハンサーに特化した転写制御領域地図の作成

(2) 新規の癌発生・維持の根源的な分子メカニズムを解明

(3) 新規の治療標的の同定および診断のための新規バイオマーカーの同定

という成果が得られ、病態機能解析、治療薬の開発、臨床応用に向けた診断法の開発など将来的な発展性も大きい。すなわち、これらの成果は画一的だった婦人科癌の治療を個別化治療へと大

きく進歩させ、エンハンサーに基づく初めての病態の解明へと繋がることを期待できる。

3. 研究の方法

(1) 婦人科癌患者検体の選別と収集

順天堂大学産婦人科では、これまでに遺伝子解析の同意を得た検体を子宮体癌約 300 症例、卵巣癌約 200 症例を保存している。治療経過、予後と合わせて解析可能な状況にあり、継続的にも収集を行う。検体選別は、出来るだけ広いサブタイプをカバーしつつ、化学療法に極めて抵抗性が強かったもの、予後が極めて不良であったものを多く含むようにし、子宮体癌 70 症例、卵巣癌 70 症例を選別する。同時に、コントロールとして予後良好であったものを 20%程度含めておき、比較解析が可能ないように研究デザインを行う。さらに卵巣癌と子宮体癌を重複する症例を包含することで、それぞれ単独発症症例と比較解析を行うことで、婦人科癌の重複発症に関するメカニズム解明も試みる。

(2) 婦人科癌のエピジェネティクス・トランスクリプトーム解析

申請者の所属する理化学研究所で開発された Cap Analysis of Gene Expression (CAGE)法を用いて子宮体癌 70 症例、卵巣癌 70 症例に対してエピジェネティクス・トランスクリプトーム解析を実施する。CAGE 法は転写プログラムを解析する強力な手法であり、RNA の 5'末端を次世代シーケンサーで解読し、転写開始点を網羅的に解析できる。さらにエンハンサーRNA の 5'末端の検出も可能である特性を利用して、細胞から精製回収したエンハンサーRNA を含む Nascent RNA を用いて CAGE 法を行うことによってゲノムワイドなエンハンサー解析が可能となる (NET-CAGE 法)。同時に通常のトータル RNA を用いた CAGE 法も行うことによって、腫瘍細胞で変動するトランスクリプトーム解析が可能となるデータを得ることができる。これらの NET-CAGE データ (新規合成された RNA 量を反映) と通常の CAGE データ (新規合成と分解の均衡した RNA 量を反映) をモデリングすることで、それぞれの転写産物の RNA 半減期が決定でき、バイオインフォマティクス解析により、遺伝子転写量 遺伝子発現量 エンハンサー プロモーター Transcript の半減期 転写ネットワークを得る。

(3) 全データの統合によるバイオインフォマティクス解析

次世代シーケンシングデータのフィルタリング、ゲノムへのマッピング、転写開始点解析、エンハンサー同定を行う。さらに、スーパーエンハンサーの検出や、さらにスーパーエンハンサーの近傍に位置しており腫瘍細胞のアイデンティティーや機能に重要な役割を果たす遺伝子候補の同定を行う。臨床データとも紐づけてクラスタリング解析を行うことで、婦人科癌のエンハンサーに特化した転写制御領域地図の作成し、発生・進展の根源的な分子メカニズムの解明や、臨床応用を考慮したサブタイプ診断などに活用可能なバイオマーカーおよび創薬シーズの同定を行う。

4. 研究成果

婦人科癌のうち、治療抵抗性の高い卵巣癌明細胞癌を中心に各卵巣癌サブタイプ、漿液性癌、類内膜癌、粘液性癌の原発組織の凍結検体合計 210 症例を収集・選別を完了した。

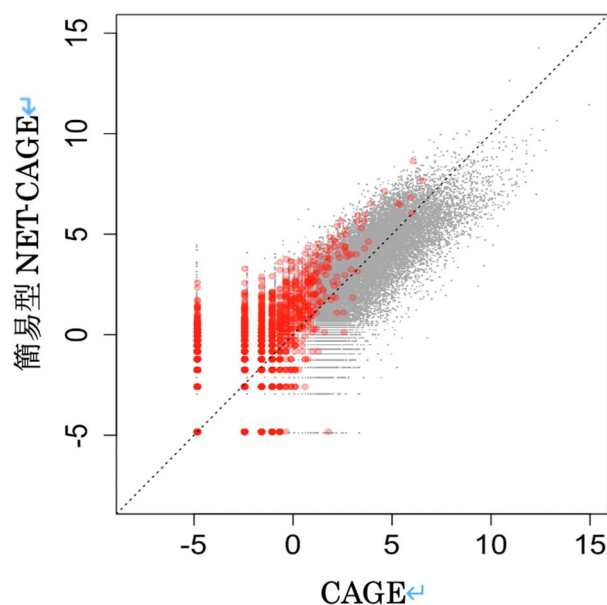


図1 同一検体における CAGE 法と簡易型 NET-CAGE 法の enhancer 解析データ比較
(赤:エンハンサー 灰:プロモーター
x,y とともに log2CPM)

しかしながら NET-CAGE 法は細胞株を用いた核酸抽出法はすでに確立されていたが、卵巣癌などの固形癌からの核酸抽出法は未確立であった。このため、まず固形癌を適切にホモジナイズし、核内 RNA の分解を抑制しながら精製を実施する核内 RNA の精製技術の最適化を図った。最終的に卵巣癌のいずれのサブタイプでも適応可能な核酸精製法を確立した。具体的には、凍結状態の卵巣癌凍結検体 25mg に対して、酵素 2 種と protease inhibitor を混合した Cell lysis buffer 100 μ l を加え、Fisherbrand motorized tissue grinder で氷上でホモジナイズする。さらに 100 μ l の Cell lysis buffer を加え、300 μ l あたり 10U Rnase を加えてタッピングで混和し、氷上で 10 分反応させる。ホモジナイズ液 200 μ l あたり QIAzol 700 μ l を加える。ここに 140 μ l のクロロホルムを加え、boltex でよく混和し、室温で 3 分放置した後 4 12000 \times g 15min で遠心し、上清のみを回収する。

この新規手法を用いて、各卵巣癌サブタイプ、漿液性癌、類内癌、粘液性癌、および境界悪性癌および正常卵巣の原発組織の凍結検体 210 検体を収集し核酸抽出を実施した。従来 NET-CAGE 法の実施のためには核内 RNA の抽出精製を要するが、検体の必要量が多く、腫瘍量に個体差が多い臨床検体においては十分な RNA が得られない欠点があった。そこで条件の最適化のために、収集検体の一部において、同一症例で CAGE 法と NET-CAGE 法の両方を実施しデータを比較し、簡易型の NET-CAGE を開発した。これにより、従来法よりも少量の検体かつ簡便な手法で NET-CAGE の実施が可能となった。全検体を用いた解析に関しては現在進行中であるが、先行解析として CAGE(10 検体)ならびに簡易型 NET-CAGE(41 検体)における解析を完了した。同一検体由来である、CAGE と簡易型 NET-CAGE を比較すると、enhancer RNA が簡易型 NET-CAGE でより濃縮しており、enhancer 解析として優位性を持つことが確認された(図 1)。

これらの解析結果から、すでに 19,297 の enhancer が検出され、その半分以上(13,035)は FANTOM-NET のエンハンサーアトラスで見つかっていない新規 enhancer であった。さらに明細胞癌のデータのための先行解析であるが FANTOM5 プロモーターにおける mRNA レベルでクラスタリングすると、大きく二つのクラスターに分離することが明らかとなった(図 2)。

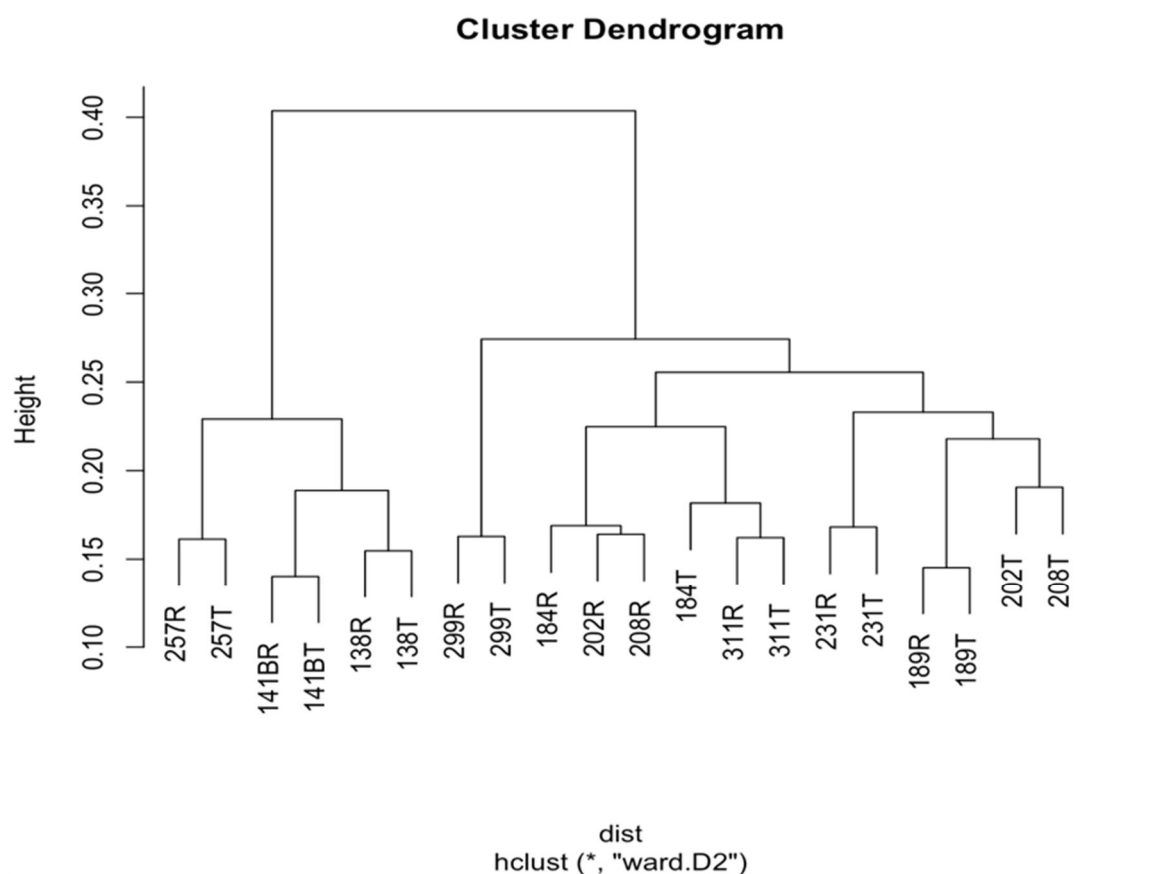


図 2 卵巣癌 mRNA 発現のクラスタリング

現時点では、まだ臨床情報と発現変動遺伝子の紐付けは完了していないが、同一の病理組織型でも異なる遺伝子発現分布があり、臨床的サブタイプと相関する遺伝子発現分布の可能性が示唆された。現時点で新規手法による卵巣癌の RNA 抽出は完了し、随時ライブラリ作成に進めている。引き続き継続し、卵巣癌のトランスクリプトームアトラスの作成達成を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------