

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19222

研究課題名(和文) 口腔癌の放射線耐性を規定するスーパーエンハンサーの検索同定と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Identification of the super-enhancers that regulate radioresistance of oral cancer and development of new therapeutic agents

研究代表者

齋藤 智昭 (SAITOH, TOMOAKI)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40833554

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)：本研究では、HSC-3を放射線耐性細胞・KOSC-2を放射線感受性細胞として新規に同定した。放射線照射によって変化するエピゲノムの変化を網羅的に解析するために、ATAC-seq解析ならびにDAVID-GO解析、発現解析、motif解析を行った。adenylate cyclase 2 (ADCY2)が、HSC-3では放射線照射後に有意な発現増加が認められ、motif解析では、RUNX2がHSC-3細胞で照射後に、放射線照射でopenになる領域に濃縮されていた。他の癌腫では、RUNX2はSEを形成している報告もあるために、ADCY2やRUNXが、SE形成の中心となっている可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌に関しては、スーパーエンハンサーの制御などエピゲノムの変化から導いた放射線耐性に関する報告はない。放射線耐性に関するゲノムレベルの変化からの研究は、新規医学・医療技術を用いた研究であり、全ゲノム的で系統的な遺伝子・機能制御は、大きな発想の転換である。放射線治療耐性の克服は、担癌患者の長期社会復帰などを実現させる可能性があり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：By radiosensitivity assays of nine oral squamous cell carcinoma (OSCC) derived cell lines, we determined the radioresistant OSCC cell (HSC-3) and radiosensitive OSCC cell (KOSC-2). To investigate changes of chromatin accessibility in the radioresistant/sensitivity cells, we performed the dynamic genetic analyses, such as the Transposase-Accessible Chromatin Sequencing (ATAC-seq), DAVID-GO gene analysis, and motif analysis for detection of driver genes/transcription factors about radiosensitivity in OSCCs. As a result, adenylate cyclase 2 (ADCY2) expression was significantly up-regulated and RUNX2, a transcriptional factor, was concentrated in the opened region in HSC-3 cells after 8 Gy irradiation. RUNX2 has been reported to form super-enhancer (SE) in other types of cancer, suggesting that ADCY2 and RUNX may be critical factors for SE formation.

研究分野：医歯薬学 歯学・外科系歯学

キーワード：ATAC-seq スーパーエンハンサー 口腔癌放射線耐性 口腔癌放射線感受性 DAVID-GO解析 モチーフ解析

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な診療領域において、放射線治療により悪性腫瘍患者の治療負担の軽減、生存期間の延長、ならびに患者の生活の質の向上が図られてきた。しかし、放射線治療の副作用である粘膜炎や骨髄（脊髄や胸骨等）などは必ず出現して患者が苦しむのに対し、放射線治療における癌に対する治療に関しては、全ての症例において必ずしも十分な治療効果が得られるわけではない。また、放射線耐性・感受性は、細胞の保有する多くの機能が総合的に関与して決定され、総合的に働くため、単一の機能の制御だけでは、他の機能によるカバーなどが起きるために不十分になるものと思われる。放射線治療に対する耐性症例においては、これら多くの機能が助け合っていて、その結果として耐性を示す。また、副作用が現れても治療効果が得られない症例においては、患者の正常細胞における多くの耐性関連遺伝子の活性が低く、腫瘍細胞においてはそれら多くの耐性関連遺伝子の活性が高いと考えられる。すなわち、放射線感受性度や耐性度を決定しているのは、一つ一つの耐性関連遺伝子の活性だけではなく、全ゲノムに分布している放射線耐性に関連している多くの遺伝子群の系統的発現状態によると考えられる。

スーパーエンハンサー (SE) という概念は、つい最近 Mansour, M らにより提唱された (Science 346, 1373-7, 2014)。SE はヒストン H3K27 のアセチル化が広範囲にわたり起きているゲノム上の領域で、DNA 10~20kb 程度の領域に多くのエンハンサー結合部位を有し、RNAPolymerase II や MED1 などとも結合するのがその特徴である。SE は非常に強力なエンハンサー領域であるばかりでなく、幹細胞や各組織の細胞系統を特徴付けるような遺伝子発現を制御する。癌の発生、進展・悪性化（増殖・浸潤・転移等）・治療抵抗性などに関与すると考えられている。

口腔扁平上皮癌における SE の役割は解明されておらず、放射線耐性に関与する SE の予測すらもこれまでに報告されていない。

2. 研究の目的

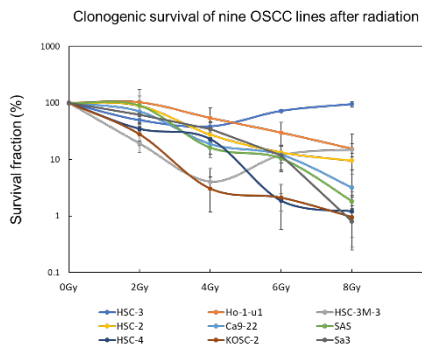
全ゲノムワイドな解析により、口腔扁平上皮癌の放射線耐性に特異的な SE とそのターゲットである miRNA、long non code RNA、遺伝子等を検索・同定し、口腔扁平上皮癌の放射線耐性特異的な制御機構（エピゲノムの変化）を検討する。

3. 研究の方法

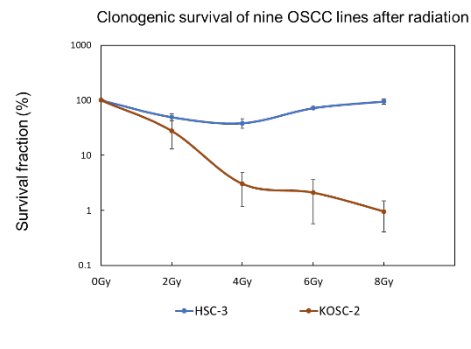
- (1) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性細胞・感受性細胞の同定
口腔扁平上皮細胞株 9 種類に対して、放射線 (150V, 20mA, 2.1Gy/min) を照射 (~8Gy まで) を行い、Clonogenic survival assay を行う。
放射線耐性細胞と感受性細胞を示す扁平上皮癌細胞を確認する。
- (2) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定するエピゲノム解析
放射線耐性細胞・感受性細胞に対して、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムワイドな解析をおこなう。(本研究では、後述参照であるが ATAC-seq 解析を行った。)
- (3) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域の近傍遺伝子の抽出
放射線耐性細胞・感受性細胞に対して、放射線照射によって変動した各ピークの近傍 (overlap Start² で shortest Distance が 50kb 以下) 遺伝子の抽出を行う。
- (4) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域 (ピーク) の近傍遺伝子の GO 解析
(3)にて抽出した遺伝子群に対して、DAVID-GO 解析を行う。
- (5) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域のモチーフ解析
放射線照射によって変動した各ピークに対して、モチーフ解析 (転写因子の予測) を行う。
- (6) (4), (5) で抽出/同定した遺伝子や転写因子の発現状況を qRT-PCR などで確認する。
- (7) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域の ChIP-Atlas 解析
放射線照射によって変動した各ピークに対して、ChIP-Atlas Enrichment 解析を行う。

4. 研究成果

- (1) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性細胞・感受性細胞の同定
放射線耐性に関するエピゲノムの変化を調べるあたり、放射線耐性細胞・感受性細胞の同定を新規に行った。口腔癌細胞株 9 種類 (HSC-2, HSC-3, HSC-3M3, HSC-4, KOSC-2, Ca9-22, Sa3, SAS, Ho-1-u1) 全てに 0 - 8Gy の放射線照射を行い、細胞生存曲線を作製した。HSC-3 は、8Gy 照射後の細胞生存率 94.8% と最も高かったのに対して、KOSC-2 は細胞生存率が 0.954% と最も低かった。本研究では、HSC-3 を放射線耐性細胞・KOSC-2 を放射線感受性細胞として新規に同定した。(図 1, 2)



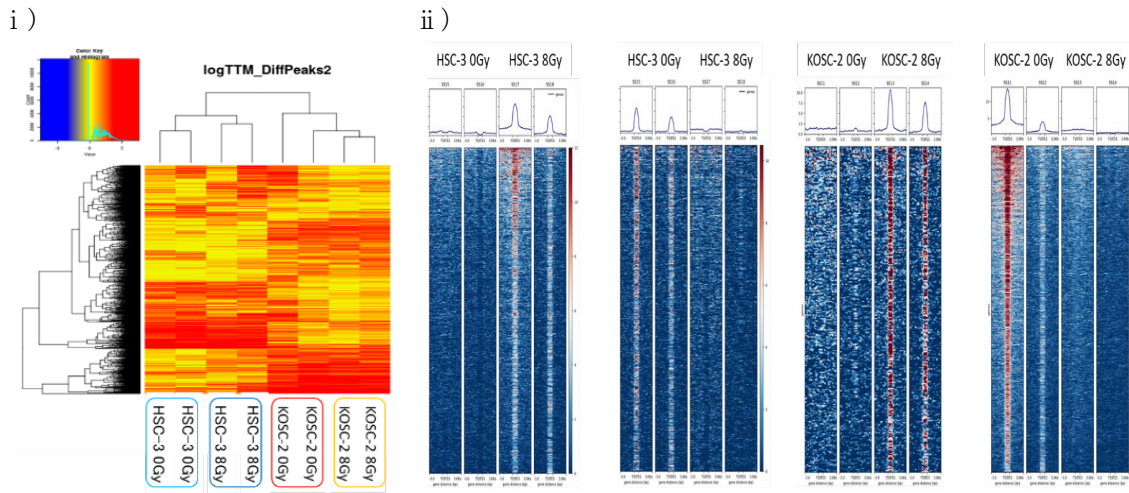
(図1) 口腔癌細胞株9種類の細胞生存曲線



(図2) 放射線耐性細胞・感受性細胞の同定

(2) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定するエピゲノム解析

SE 同定のために、H3K27ac 抗体を用いた CHIP-seq 解析を検討したが、放射線耐性に関与する抗体・転写因子・ヒストン修飾因子の報告がなかった。そこで本研究では、ATAC-seq 解析を行い放射線照射によって変化するオープンクロマチン領域を、耐性細胞・感受性細胞で網羅的に解析し、その後、公共データベース上の RNA-seq データや ChIP-seq データとの統合解析でスーパーエンハンサーの予測を試みることにした。HSC-3 (0Gy・8Gy) ならびに KOSC-2 (0Gy・8Gy) に対して、ATAC-seq 解析を行った。放射線耐性細胞・感受性細胞に対して、放射線照射による変動領域 (ピーク) の抽出を行い、ヒートマップを作製した。(図3)



(図3) ヒートマップ(総変動ピーク ; logTTM)

i : 階層的クラスタリング ii : ピークヒートマップ

HSC-3 では、放射線照射によるオープンクロマチン領域を 1273・クローズクロマチン領域を 839 認めた。KOSC-2 では、放射線照射によるオープンクロマチン領域を 285・クローズクロマチン領域を 1760 認めた。HSC-3 と KOSC-2 の 0Gy 同士の比較では、HSC-3 に特異的なピークは、1929・KOSC-2 に特異的なピークは、3804 認めた。HSC-3 でのオープンクロマチン領域であり、KOSC-2 ではクローズクロマチン領域となった領域は、51 ピーク認めた。

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域の近傍遺伝子の抽出

各変動ピークに対する近傍遺伝子 ((overlap Start"で shortest Distance が 50kb 以下)) は、HSC3 では、オープンクロマチン 1273 ピークに対して 235 遺伝子・クローズクロマチン 839 ピークに対して 122 遺伝子抽出された。KOSC-2 では、オープンクロマチン 285 ピークに対して 46 遺伝子・クローズクロマチン 1760 ピークに対して 310 遺伝子抽出された。

(4) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域 (ピーク) の近傍遺伝子の GO 解析・発現解析

上記近傍遺伝子に対して DAVID-GO 解析を行い P<0.001 以下の遺伝子を抽出した。HSC-3 では、

照射後に intracellular signal transduction, response to virus(表 1)が open になっており、これらのシグナル経路が放射能照射後に利用可能になっている可能性があった。

| Category | Term | Count | % | PValue | Genes |
|------------------|--|-------|-------------|----------|--|
| GOTERM_BP_DIRECT | GO:0035556~intracellular signal transduction | 12 | 5.309734513 | 5.8.E-03 | PRKD1, ADCY2, ADCY5, PSEN2, ANP32A, SOCS6, SH2B2, ASB3, CLNK, STMN1, RGS9, DCLK1 |
| GOTERM_BP_DIRECT | GO:0009615~response to virus | 6 | 2.654867257 | 7.9.E-03 | IRAK3, OASL, STMN1, HMGA2, DCLK1, ADAR |

(表 1) HSC-3 で照射後に open になった遺伝子群

KOSC-2 では、positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter 遺伝子(主に転写因子)群が、照射後に close になっており (表 2)、複数の転写因子の下流シグナルが抑制されている可能性があった。

| Category | Term | Count | % | PValue | Genes |
|------------------|---|-------|-------------|--------|---|
| GOTERM_BP_DIRECT | GO:0045766~positive regulation of angiogenesis | 7 | 2.333333333 | 4.E-03 | CCL24, PRKD1, PTGIS, ETS1, HMOX1, GREM1, ENG |
| GOTERM_BP_DIRECT | GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter | 24 | 8 | 4.E-03 | CSF3, UTF1, LMO2, IKZF1, DRD2, ONECUT3, GSX1, ESRRG, GREM1, CITED1, MIXL1, FLT3LG, PRKD1, EBF3, ETS1, EBF2, MED17, POU4F1, SUPT4H1, MAFA, NRG1, FSHB, ENG, NFIA |
| GOTERM_BP_DIRECT | GO:0040037~negative regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway | 3 | 1 | 7.E-03 | WNT4, SHISA2, GPC1 |
| GOTERM_BP_DIRECT | GO:0030336~negative regulation of cell migration | 6 | 2 | 8.E-03 | WNT4, PODN, MAGI2, DRD2, ENG, IGFBP5 |

(表 2) KOSC-2 で照射後に close になった遺伝子群

(5) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域のモチーフ解析
放射線照射によって変動した各ピークに対して、モチーフ解析(転写因子の予測)を行った。HSC-3 で照射後に open になる領域には、LRF(Zf)、RUNX2(Runt)、Cdx2(Homeobox)の濃縮が見られた(表 3)。RUNX2 (RUNX 因子)モチーフは、KOSC-2 に比較して、HSC-3 で close である領域に含まれているが、HSC-3 細胞の定常状態とは関係なく放射線照射で open になった。KOSC-2 では、RUNX2 (RUNX 因子)モチーフは特に変化がなかった。

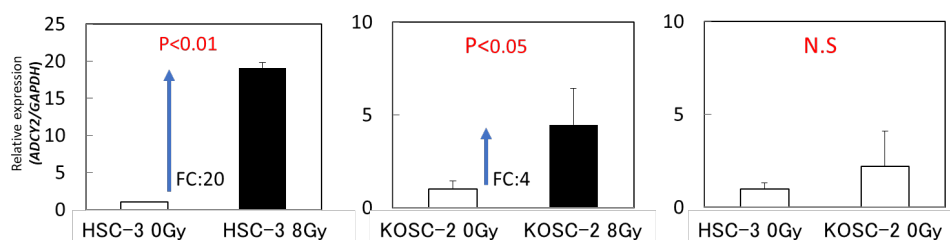
Total Target Sequences = 1273, Total Background Sequences = 80618

| Rank | Motif | Name | P-value | log P-value | q-value (Benjamini) | # Target Sequences with Motif | % of Targets Sequences with Motif | # Background Sequences with Motif | % of Background Sequences with Motif |
|------|-------|---|---------|-------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | | LRF(Zf)/Erythroblasts-ZBTB7A-ChIP-Seq(GSE74977)/Homer | 1e-2 | -6.467e+00 | 0.6650 | 206.0 | 16.18% | 10689.9 | 13.26% |
| 2 | | RUNX2(Runt)/PCa-RUNX2-ChIP-Seq(GSE33889)/Homer | 1e-2 | -5.488e+00 | 0.8849 | 183.0 | 14.38% | 9579.3 | 11.88% |
| 3 | | Cdx2(Homeobox)/mES-Cdx2-ChIP-Seq(GSE14586)/Homer | 1e-2 | -5.391e+00 | 0.8849 | 100.0 | 7.86% | 4848.3 | 6.01% |

(表 3) HSC-3 で照射後に open になる領域

(6) DAVID-GO 解析やモチーフ解析で抽出した遺伝子や転写因子の発現解析

表 1 の intracellular signal transduction の遺伝子群ならびに RUNX2 を放射線耐性に関与する候補因子とした。qRT-PCR で発現変化を確認すると、HSC-3 で 8Gy 照射後に STMN1・ADCY2・RUNX2 の発現が有意に増加していた。特に ADCY2 は、HSC-3 では 20 倍程度・KOSC-2 では 4 倍程度の発現増加が認められたが、未照射の時点では、HSC-3 と KOSC-2 で ADCY2 の発現に有意な差がなかった。(図 4)



(図 4) qRT-PCR 法での ADCY2 発現状況

(7) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域の ChIP-Atlas 解析
放射線照射によって変動した各ピークに対して、ChIP-Atlas Enrichment 解析を行った。
ChIP-Atlas 解析結果では、各細胞の放射線処理の影響では全体的に大きく重複する転写因子結合は見られなかったが、HSC-3/KOSC2 の変動ピーク比較においては、HSC-3 特異的に放射線処理で open になるピークに腎臓(HEK293)での RUNX1 の結合部位が濃縮されており (表 4)、モチーフ解析の結果と同様に RUNX の関与が示唆された。

| ID | Antigen class | Antigen | Cell class | Cell | Num of peaks | Overlaps/ Mydata | Overlaps/ Control | Log P-va | Log Q-va | FE | log2FE |
|------------|----------------|--------------|------------|-------------|--------------|------------------|-------------------|----------|----------|---------|--------|
| SRX2513054 | TFs and others | RUNX1 | Kidney | 293 | 52660 | 137/1273 | 1/285 | -10.872 | -7.8194 | 30.6716 | 4.94 |
| SRX2731658 | TFs and others | PBX4 | Prostate | PC-3 | 76745 | 364/1273 | 149/285 | -13.144 | -9.7435 | 0.54693 | -0.87 |
| SRX883584 | TFs and others | JUN | Breast | MDA-MB-231 | 37841 | 211/1273 | 104/285 | -12.061 | -8.8079 | 0.45422 | -1.14 |
| SRX3468047 | TFs and others | SS18 | Others | Fibroblasts | 47198 | 177/1273 | 88/285 | -10.045 | -7.1739 | 0.45031 | -1.15 |
| SRX4377533 | TFs and others | BRD4 | Breast | MDA-MB-231 | 35064 | 173/1273 | 89/285 | -10.723 | -7.7014 | 0.43518 | -1.20 |
| SRX4377556 | TFs and others | BRD4 | Breast | MDA-MB-231 | 35061 | 172/1273 | 89/285 | -10.971 | -7.8852 | 0.43267 | -1.21 |

(表 4) ChIP-Atlas Enrichment 解析

まとめ：

本研究では、放射線照射により、HSC-3 でクロマチンの 1273 領域が open になり、KOSC-2 で 1760 領域が close になった。近傍遺伝子の DAVID-GO 解析では、HSC-3 細胞で intracellular signal transduction が、open になっており、これらのシグナル経路が放射線照射後に利用可能になっている可能性があった。KOSC2 では、positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter 遺伝子(主に転写因子)が照射後に close になっており、複数の転写因子の下流シグナルが抑制されている可能性があった。モチーフ解析では、RUNX2 が HSC-3 細胞で照射後に、放射線照射で open になる領域に濃縮されており、ChIP-Atlas Enrichment 解析でも RUNX の関与が示唆された。発現解析では、intracellular signal transduction 遺伝子群の中でも、ADCY2 が HSC-3 では 20 倍程度・KOSC-2 では 4 倍程度の発現増加が認められたが、未照射の時点では、HSC-3 と KOSC-2 で ADCY2 の発現に有意な差は認めなかった。Pathway 解析では、ADCY2-RUNX2 へのシグナル経路が構築でき、ADCY2-RUNX2 シグナルは放射線感受性に影響を及ぼす可能性が示唆された。他の癌腫では、RUNX2 は SE を形成している報告もあるために、ADCY2 や RUNX が、SE 形成の中心となっている可能性も示唆された。

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|