

平成 29 年 9 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18441

研究課題名(和文) エピゲノムのエビデンスに基づいたHDAC阻害剤によるがん治療法の開発

研究課題名(英文) exploring direct target genes of HDAC inhibitor for epigenomic evidenced based medicine

研究代表者

谷本 幸介 (Tanimoto, Kousuke)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：60611613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACI)の一つであるSAHA(Vorinostat)をヒト急性T細胞性白血病細胞株Jurkatに処理した際のH3アセチル化変化をChIP-seqにより解析し、SAHA処理によりアセチル化が亢進する遺伝子を明らかにした。SAHA処理による遺伝子発現量変化を解析したところ、4,784遺伝子がSAHA処理により発現上昇したが、このうちH3アセチル化も同時に検出されたのは329遺伝子(約7%)であった。HDACIの直接的な標的を探索する場合には発現量変化だけでなくアセチル化状態の変化も考慮する必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：H3 acetylation profiles of Jurkat cell line with and without HDAC (histone deacetylase) inhibitor SAHA (Vorinostat) treatment were analyzed by ChIP-seq. Integrated analysis of H3 acetylation profile and gene expression profile revealed that only 7% genes were acetylated among up-regulated genes by SAHA treatment. This result suggested that exploring direct target of HDAC inhibitor require not only gene expression analysis but also histone acetylation analysis.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 ヒストンアセチル化

1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) は、がん細胞内で高発現しているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害することにより抗腫瘍作用を発揮するという、これまでにない新しいタイプの抗がん剤である。2014年8月現在承認されているHDACiは米国で3剤(国内で1剤)と数は多くはないが、現在多くの臨床試験が進行中であり、“a promising new class of anticancer drugs” (Cancer Lett. 2009)とも言われている。

現時点において国内で唯一承認されているHDACiである vorinostat は皮膚T細胞性リンパ腫が適応であり、奏効率は30%程度とされている。抗がん剤としてのHDACiの適用範囲や奏効率は今後さらに改善が望まれるが、単剤で効果が低い場合でも他剤と併用投与することで効果を発揮するという研究結果が数多く報告されるようになってきている。しかし、HDACによるヒストンアセチル化には標的特異性が無い点、がん種によりヒストンアセチル化状態が大きく異なっている点が併用投与する薬剤の選択を困難にしている。そのため各々の研究者が経験を頼りに併用投与する薬剤を選択し、効果を検証しているのが現状である。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いたChIP-seq法により、HDACiがどのような遺伝子もしくはパスイェのヒストンアセチル化を誘導するかをゲノムワイドかつ定量的に明らかにし、これによりHDACiが腫瘍細胞死を誘導するメカニズムを明らかにすることを試みる。

2. 研究の目的

本研究では以下の2点をオミクス解析手法を用いて明らかにする。

(1) 公共データベース Cancer Cell Line Encyclopedia(CCLE)に収載された24のがん種、967のがん細胞株のデータを用いて、HDACの発現量を基準にがん細胞のクラス分類を行う。この情報を基に、HDACが高発現しておりHDACiが奏効すると推測されるがん細胞を明らかにする。

(2) 上記(1)の結果を基にHDACiの効果が高いと推測されるがん細胞株を選択し、それらにHDACi処理によるヒストンアセチル化状態の変化をChIP-seq法によりゲノムワイドかつ定量的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1)HDACi高感受性がん細胞株群における、HDACiによるヒストンアセチル化変化の網羅的解析

抗アセチル化抗体を用いてChIP-seq法を行い、HDACi処理によるヒストンアセチル化変化をゲノムワイドに定量化する。ここでは転写活性化のマーカーとして知られる

H3K9/14のアセチル化を認識する抗体を使用する。HDACiはClass IおよびClass IIのHDACを共に阻害するSAHA(vorinostat)、TSA, LAQ824等のヒドロキサム酸誘導体の阻害剤を使用する。

(2)HDACi処理による遺伝子発現変化の網羅的解析

HDACi高感受性がん細胞株において、HDACi処理による遺伝子発現変化を網羅的に解析する。発現量情報はヒストンアセチル化の変化によって発現量が変動する遺伝子を明らかにするために必要となる。

4. 研究成果

(1) 公共データベース Cancer Cell Line Encyclopedia(CCLE)の967株のデータを基にHDACi高感受性と推測されるがん細胞株群の選択を行った。CCLEのデータを用い、HDACファミリーの発現量を基に階層的クラスタリングによるがん細胞株のタイプを分類した結果(図1) Class1およびClass2のHDACを高発現しているヒト急性T細胞性白血病細胞株 Jurkat を本研究に使用することとした。

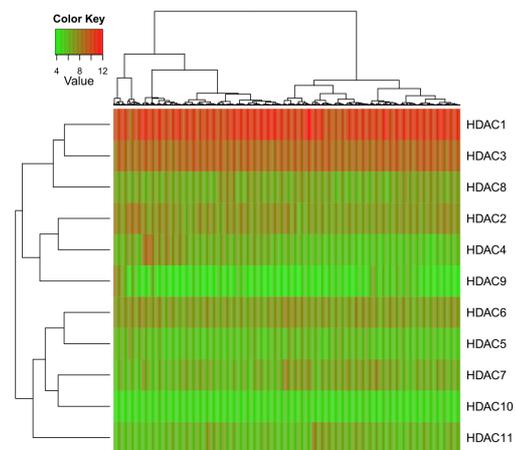


図1 がん細胞株967種のHDACファミリー遺伝子の発現量クラスタリング

(2)使用するHDACiとしては、日本において皮膚T細胞性リンパ腫の適応で承認されているSAHA(Vorinostat、商品名ゾリンザ)を選択した。Jurkat細胞にSAHAを処理することでヒストンH3アセチル化が大幅に増加することをウェスタンブロットにより確認できたため(図2) SAHA処理、未処理、Whole Cell Extract(WCE,コントロール)のChIP-seqを施行した。

ChIP-seqの結果、SAHA処理、未処理、WCEにおいてそれぞれ21,624,842、23,499,999、20,499,571リードが得られた。得られたリードをマッピングした後MACS2によりピーク検出をした結果、SAHA処理、未処理においてそれぞれ33,014、36,421のピーク(H3アセチル化領域)が検出された。

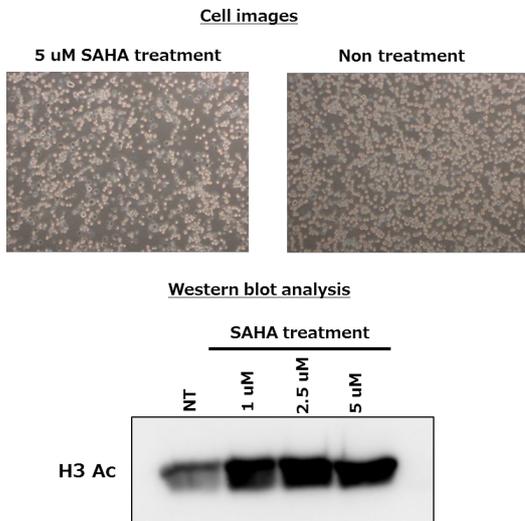


図 2 SAHA 処理による Jarkat 細胞の細胞形態および H3 ヒストンアセチル化変化

(3) 検出された H3 アセチル化領域と遺伝子との位置的關係を調べたところ、SAHA 処理、未処理共に promoter 領域に存在するのは全体の約 40% であることが明らかになった。残りは Intron と Intergenic に約 30 ずつ分布していた。

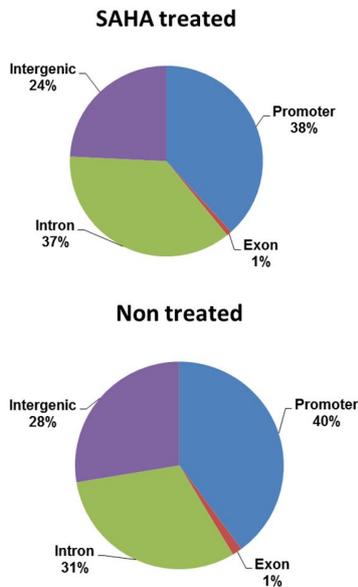


図 3 H3 アセチル化領域と遺伝子との位置的關係

SAHA 処理による転写開始点 (Transcription start site; TSS) 近傍 (上流および下流 3000bp) における H3 アセチル化密度を全転写産物において解析したところ、図 4 に示す結果となった。SAHA 未処理の状態では TSS の上流及び下流約 1000bp にアセチル化領域が集中していた。また、アセチル化されている転写産物は全体の半数程度であり、残りは TSS 周辺にアセチル化は見られなかった。一方 SAHA 処理を行うと、

TSS 近傍の H3 アセチル化領域が拡大することが明らかになった。加えて、SAHA 処理によりほぼ全ての転写産物の TSS 近傍の H3 アセチル化が亢進することが明らかになった。

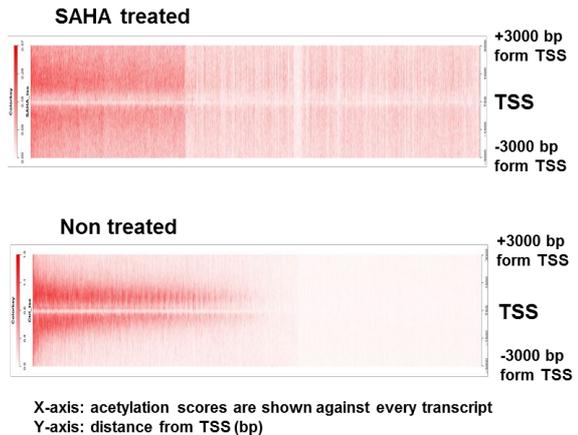


図 4 転写開始点近傍の H3 アセチル化状態

同様に SAHA 処理による gene body の H3 アセチル化状態を解析した結果、図 5 に示す結果が得られた。SAHA 未処理の状態ではアセチル化は TSS 近傍に集中しており、転写終結点 (TTS; Transcription terminal site) にはアセチル化はあまり見られなかった。一方 SAHA 処理により、TSS から TTS まで gene body 全体に渡る H3 アセチル化亢進が見られた。これらのことから、SAHA によるアセチル化の亢進は特定の遺伝子にのみ生じるのではなく、ほぼ全ゲノムに渡り生じることが明らかになった。

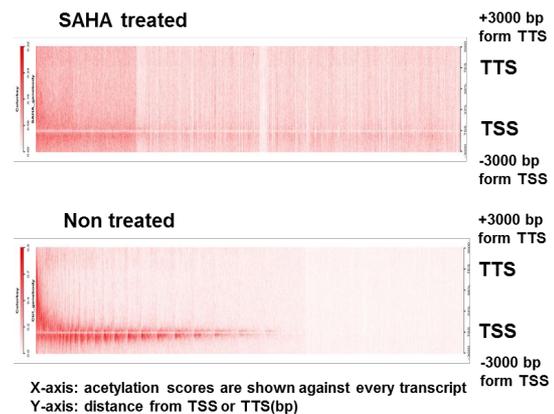


図 5 gene body における H3 アセチル化状態

(4) SAHA 処理による遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、SAHA 処理により発現が 2 倍以上増加した 4,784 遺伝子を特定した。発現量解析の結果と ChIP-seq によるヒストンアセチル化状態の解析結果を統合したところ、SAHA 処理による発現上昇がみられた 4,784 遺伝子のうち、ヒストンアセチル化も同時に観察されたのは 329 遺伝子 (約 7%) であり、SAHA 処理により発現上昇する遺伝子の大部分はヒストンアセチル化を伴ってい

ないことが明らかになった。このことから、発現上昇がみられた大部分の遺伝子は SAHA の直接的な作用によるものではなく、間接的な作用により発現上昇したものと考えられる。

SAHA 処理により発現上昇かつアセチル化が見られた遺伝子、すなわち SAHA により発現制御される遺伝子群の GO 解析を行った結果 (表 1)、cell-matrix adhesion や apoptotic process、DNA methylation に関連する遺伝子群が有意に含まれることが明らかになった。Jurkat は SAHA 感受性細胞株であることから、SAHA による抗腫瘍効果にはこれらの遺伝子群の活性化が関与していると考えられる。

GOterm	pval
cell-matrix adhesion	0.0001
outer dynein arm assembly	0.0005
negative regulation of cell migration	0.0006
cardiac epithelial to mesenchymal transition	0.0012
negative regulation of smooth muscle cell proliferation	0.0013
cytoskeleton organization	0.0017
negative regulation of growth	0.0027
positive regulation of cAMP biosynthetic process	0.0027
DNA methylation	0.0037
regulation of neuron apoptotic process	0.0037

表 1 SAHA の標的遺伝子群に有意に存在する GOterm (上位 10term)

本研究により、SAHA 処理により発現上昇する遺伝子のうち、アセチル化亢進を伴っている、いわゆる SAHA の直接的な標的遺伝子と考えられるものはごく一部ということが明らかになった。HDAC 阻害剤による影響を評価する上で、単に発現量変化だけを考慮するのでは不十分であり、真に直接的な標的を探索する場合にはアセチル化状態の変化も考慮する必要がある可能性を示唆する結果となった。本結果は今後 HDAC 阻害剤の標的分子を探索する上で重要な知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷本 幸介 (Kousuke Tanimoto)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：60611613