

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09321

研究課題名(和文) siRNA screeningによる新規エピジェネティクス治療標的の探索

研究課題名(英文) Discovering therapeutic epigenetic targets using whole genome siRNA screening

研究代表者

岡本 泰幸(okamoto, yasuyuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：60444973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現制御機構であるエピゲノムをターゲットとしたエピジェネティクス治療の創薬を目的にWhole genome siRNA libraryで全ゲノムをスクリーニングした。スクリーニングでは大腸癌細胞株を使用し、DNAメチル化で発現抑制されたGFPの再活性化をFACSで定量した。独立した複数のsiRNAとqRT-PCRでのバリデーションを経て全遺伝子より14の遺伝子を候補として同定した。この中の5つの遺伝子は一つの複合体を形成してヒストン修飾に関連することが知られている。CHD4は同定された遺伝子の一つであるが、抗腫瘍効果としてHDACと同等であり、正常細胞への影響は少ないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体薬や免疫療法の登場でがん治療は飛躍的に向上した。そして遺伝子発現制御機構であるエピゲノムをターゲットとした抗がん剤の開発は癌の根治を目指し期待されている。本研究では、大腸癌の細胞株を用いて、エピゲノム異常により制御された遺伝子の再活性化への影響を21360遺伝子すべてで検討した。その結果14遺伝子が候補になった。14遺伝子の中には、機能が全く報告されていない遺伝子もみとめた。この14遺伝子の中には腫瘍と関連のある遺伝子も存在し、細胞実験では抗腫瘍効果もあきらかであった。これらの遺伝子は癌治療の新規標的として期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate therapeutic targets which might be effective combination with DNMT inhibitors, we screened a whole genome siRNA library using a colon cancer cell line that harbors a cytomegalovirus (CMV) promoter driven GFP stably integrated and silenced by hypermethylation. The screen was conducted in combination with low dose decitabine. We confirmed top hits by flow cytometry and qRT-PCR. Among them, some genes are known epigenetic regulators such as chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4), activating transcription factor 7 interacting protein (ATF7IP) and DNMT1 itself. CHD4 depletion in combination with DNMT inhibition synergistically reactivated expression of endogenously methylated genes and inhibited cell growth of colon cancer cell lines with minimal effects on the cell growth of non-cancerous cell lines. Depletion of CHD4 alone also inhibited cell growth of colon cancer cell line but not of non-cancerous cell lines.

研究分野：がん

キーワード：エピジェネティック

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の発展にともなって、がん細胞の増殖、転移に関わる分子機構が解明され、同時にそれらを制御する分子標的治療薬の開発が進んで臨床応用されている。しかし多様な発がん機構を有効に制御するためには、発がんの様々な階層を標的とした治療が理想的であると考えられる。がんの発生・進展に DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティクス機構の破綻が重要な役割を演じていることが明らかとなり、エピジェネティクス異常の正常化を目指したヒストン脱アセチル化酵素阻害剤や DNA 脱メチル化剤などの治療薬の研究が進んだ。実際に血液腫瘍に関しては国内でも標準治療の1つとして使用されている(図1)。

固形がんに関しては第Ⅱ層試験で、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と DNA 脱メチル化剤の併用療法が肺がんに対して十分な抗腫瘍効果を示した報告もあり、エピジェネティクス治療の有効性は示唆されるが実際に認可に至っておらず、更なるエピジェネティクス治療薬の開発が望まれている。

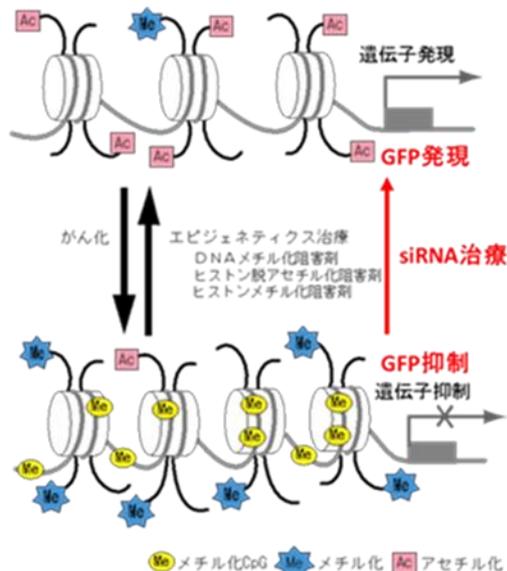


図1 エピジェネティクス治療

2. 研究の目的

遺伝子発現制御機構であるエピゲノムをターゲットとしたエピジェネティクス治療は、たんぱく質をターゲットとした分子標的剤や、免疫機構を利用した免疫療法などと並び、今後のがん治療における中心的な存在となると考える。骨髄異形成症候群に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は広く臨床で使われている。また、DNA の異常メチル化を修復することで抗腫瘍効果を期待する脱メチル化剤も広く臨床試験が行われてきた。

しかし、がんの完治を目指す治療としてさらなるターゲットの同定が急務であると考え。本研究では 21360 遺伝子を標的とした、Whole genome siRNA library を用いて、DNA の異常メチル化で抑制された遺伝子の発現を再活性化させる新たな遺伝子を同定するために全遺伝子スクリーニングを施行する。スクリーニングにて同定される遺伝はがん治療のターゲットとして適切か検討する。また、同定される遺伝子それぞれの関係を検討することで、がんエピゲノムの解明に寄与すると考える。

3. 研究の方法

GFP の発現が DNA メチル化で抑制された GFP 導入大腸癌細胞株 (YB5) を使用してスクリーニングを行った。既存の DNMT1 や HDAC をノックダウンしても GFP 活性は微弱であったため、感度を上げるために脱メチル化剤を併用してスクリーニングを施行した。FACS で GFP 陽性細胞をカウントし、Z-Score で標準化し評価した。陽性細胞を独立した複数の siRNA で validation しターゲットを同定した。同定したターゲットに関して、RNA-seq にてネットワーク解析をした。DNA のメチル化はパイロシーケンシング法を用いて定量した。細胞増殖に関しては、ノックダウン後の 5 日目と 6 日目で細胞数をカウントし増殖曲線を描き、day6 の細胞数を比較した。

4. 研究成果

各遺伝子をノックダウンしたのちに GFP 陽性細胞を FACS で評価した。21360 遺伝子を対象として 1 次スクリーニングで得られた 92 遺伝子を対象に 2 次スクリーニングを施行した。2 次スクリーニングでは各遺伝子に対して独立した 4 つの siRNA を使用した。オフターゲット効果を除外することを考え、陽性基準として以下を定義した。①4 種類すべての siRNA で GFP の発現が見られるもの。②2 種類ないしは 3 種類の siRNA で GFP の発現を認め、各 siRNA でノックダウンした後の遺伝子発現と GFP の発現を比較して逆相関のあるもの。この基準を用いて最終的に 17 遺伝子が標的遺伝子として選択された。

この中には DNMT1 と HDAC1、HDAC2 は含まれていた。このことはスクリーニングの確からしさを証明することになる。残りの 14 遺伝子の中の 5 遺伝子は 1 つの複合体を形成してヒストン修飾に関与していることが報告されている遺伝子群であった。

陽性細胞の中で脱メチル化剤との併用で GFP の活性化をより強く誘導した遺伝は、ATF7IP (activating transcriptional factor 7-interacting protein 1) と CHD4 (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4) であった。CHD4 に注目して、ノックダウン後の遺伝子発現の変化を RNA-seq で評価した。検体は、CHD4 ノックダウン後、CHD4 ノックダウンと脱メチル化剤の併用後、脱メチル化剤単独、の 3 検体を triplicate で検討した。CHD4 をノックダウン後に再

活性化される遺伝子は脱メチル化剤にて再活性化される遺伝子と共通のターゲットを有するが、多くは異なるターゲットであった。CHD4 のノックダウンと脱メチル化剤の併用療法ではより多くの遺伝子の再活性化をみとめ、このとき再活性化した遺伝子の多くは DNA メチル化のターゲットとなっている遺伝子であった。再活性化した遺伝子をオントロジー解析したところアポトーシス、セルサイクルに関連する遺伝子が有意に集積していた。次に CHD4 と腫瘍の増殖に関して大腸がんの細胞株 (SW48、HCT116) と正常細胞 (HEK293、IMR90) を用いて検討した。CHD4 ノックダウンではコントロールに比較して大腸癌の細胞株の増殖を抑制し、正常細胞の増殖は抑制しなかった。また、脱メチル化剤との併用では、大腸がん細胞株の増殖を強く抑制し、正常細胞である IMR90 に対しても軽度の増殖抑制をみとめた。HEK293 に対しては増殖の抑制は認めなかった。このことより、併用療法では抗腫瘍効果が強くなるが、正常細胞に対する有毒性が懸念された。しかし、単独で CHD4 ノックダウンと同程度の抗腫瘍効果を呈する濃度の HDAC 阻害剤を脱メチル化剤と併用すると、正常細胞に対して強い増殖抑制を認めた。したがって CHD4 のノックダウンは HDAC と同程度の抗腫瘍作用を認める一方で、正常細胞に対する作用は HDAC 阻害剤に比較して軽度であることがわかった。Annexin を用いてアポトーシスを評価したところ、CHD4 処理後にアポトーシスが誘導されていることが示された。

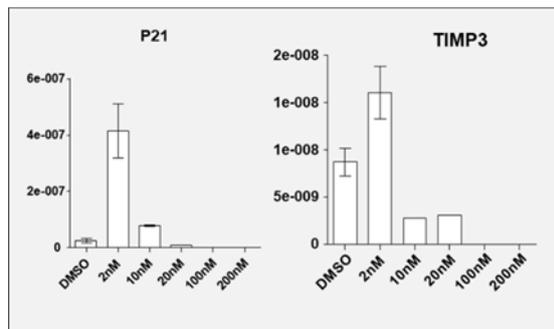
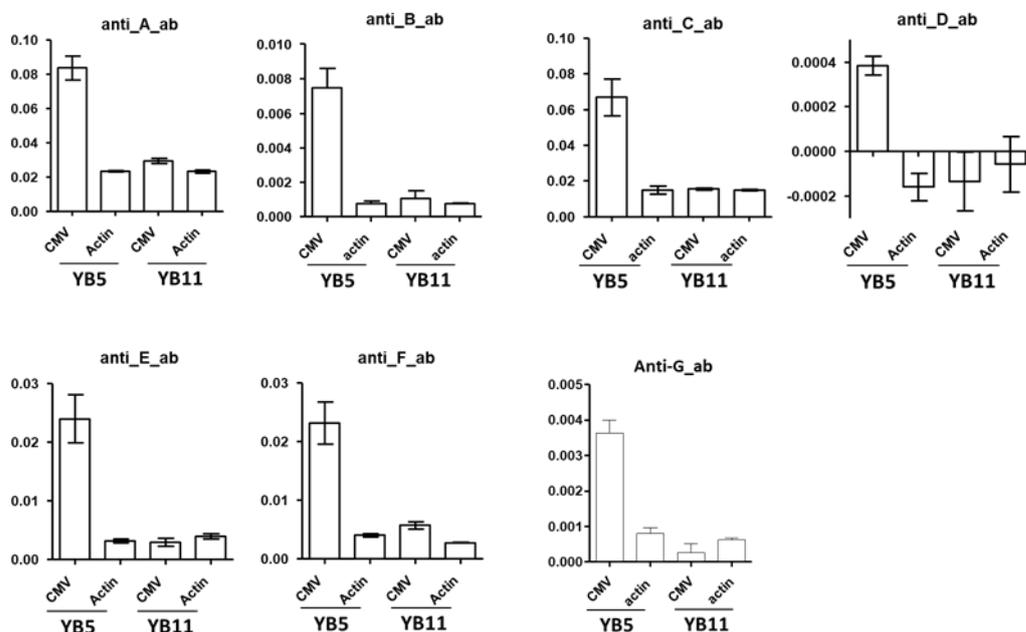


図2 複合体Aの阻害剤使用後の遺伝子発現

14 遺伝子の中の 2 つの遺伝子は RNA 制御に関連する遺伝子であった。これらの遺伝子は伴に複合体 (複合体 A) を形成しており mRNA の合成に重要な役割をすることがよく知られている。この遺伝子の発現を抑制すると、GFP と同様にメチル化のターゲットとなっているがん抑制遺伝子である TIMP 3 と P16 の発現が上昇することがリアルタイム PCR で確認された、一方で発現の抑制される遺伝子もみとめた。複合体 A の阻害剤を使用すると。同様に GFP やがん抑制遺伝子の再活性化をみとめた (図 2)。また、複合体 A を形成する他の蛋白質をコードする遺伝子に関しては再度 siRNA でノックダウンして遺伝子の発現を確認したところ、それらでは癌抑制遺伝子の発現上昇は認めなかった。このことより、同定した遺伝子は複合体 A が機能するために必須と考えられた。また、複合体 A の阻害剤で大腸癌細胞株を治療すると、DNA の脱メチル化が誘導されていることが確認された。RNA 制御に関する 2 つの遺伝子を TCGA のデータベースを使用して癌での変異を確認すると多くのがんで変異を認めることも明らかとなり、発癌との関与が示唆された。

同定した遺伝子のタンパクに対する抗体を用いて chip-PCR を施行し、DNA メチル化との関連を検討した。YB5 では GFP のプロモーター領域が DNA メチル化にて制御されているが、GPF のプロモーター領域がメチル化されていない YB11 を対象として使用した。その結果 7 つの遺伝子ではメチル化した GFP のプロモーター領域にタンパクの結合をみとめ、メチル化していない GFP のプロモーター領域には結合していないことが示された。このことより、これらの蛋白質は特異的な塩基配列にを認識するのではなく、DNA のメチル化を認識して結合していることがわかる。これらは DNA メチル化の維持に関連するのか、発現制御に関連するのかは今後の検討課題である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- ①Natsume M, Shimura T, Iwasaki H, Okuda Y, Kitagawa M, Okamoto Y, Hayashi K, Kataoka H Placental Growth Factor Is a Predictive Biomarker for Ramucirumab Treatment in Advanced Gastric Cancer *Cancer Chemother Pharmacol* 2019 Jun;83(6):1037-1046. 【査読あり】
- ②Shimura T, Iwasaki H, Kitagawa M, Ebi M, Yamada T, Yamada T, Katano T, Nishie H, Okamoto Y, Ozeki K, Mizoshita T, Kataoka H. Urinary Cysteine-Rich Protein 61 and Trefoil Factor 3 as Diagnostic Biomarkers for Colorectal Cancer. *Transl Oncol*. 2019 Mar;12(3):539-544. 【査読あり】
- ③Hori Y, Hayashi K, Sobajima Y, Naitoh I, Miyabe K, Yoshida M, Kataoka H. Successful peroral endoscopic removal of migrated metal stent. *Endoscopy*. 2019 Jun 4. doi: 10.1055/a-0915-1756. 【査読あり】
- ④Hori Y, Yoshida M, Hayashi K, Naitoh I, Kato A, Miyabe K, Kataoka H. Endoscopic drainage using a lumen-apposing metal stent under contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography guidance. *Endoscopy*. 2019 Apr 12. doi: 10.1055/a-0875-3546. 【査読あり】
- ⑤Hori Y, Hayashi K, Naitoh I, Kato H, Nomura T, Miyabe K, Yoshida M, Jinno N, Natsume M, Kato A, Asano G, Takiguchi S, Nakajima K Feasibility and safety of duodenal covered self-expandable metallic stent fixation: an experimental study. *Surg Endosc*. 2019 Feb 13. doi: 10.1007/s00464-019-06694-1. 【査読あり】
- ⑥Zhang H, Pandey S, Travers M, Sun H, Morton G, Madzo J, Chung W, Khowsathit J, Perez-Leal O, Barrero CA, Merali C, Okamoto Y, Sato T, Pan J, Garriga J, Bhanu NV, Simithy J, Patel B, Huang J, Raynal NJ, Garcia BA, Jacobson MA, Kadoch C, Merali S, Zhang Y, Childers W, Abou-Gharbia M, Karanicolas J, Baylin SB, Zahnow CA, Jelinek J, Graña X, Issa JJ. Targeting CDK9 Reactivates Epigenetically Silenced Genes in Cancer. *Cell*. 2018 Nov 15;175(5):1244-1258. e26. 【査読あり】
- ⑦Nishie H, Kataoka H, Kato H, Suzuki T, Ichikawa H, Nojiri Y, Kitagawa M, Inagaki Y, Iwasaki H, Tanaka M, Katano T, Okamoto Y, Ozeki K, Mizoshita T, Shimura T, Kubota E, Tanida S, Joh T Refractory Gastric Antral Ulcers Without Helicobacter Pylori Infection and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs *Clin J Gastroenterol* 2018 Jun;11(3):251-256. 【査読あり】
- ⑧Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Katano T, Tanaka M, Nishie H, Shimura T, Okamoto Y, Kubota E, Kataoka H, Joh T
Combination Therapy With Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis Plus Ustekinumab in Patients With Refractory Crohn's Disease
Ther Apher Dial 2018 Jun;22(3):295-300. 【査読あり】
- ⑨Kato A, Naitoh I, Miyabe K, Hayashi K, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Jinno N, Asano G, Kato H, Kuno T, Takahashi S, Kataoka H. An Increased Chromosome 7 Copy Number in Endoscopic Bile Duct Biopsy Specimens Is Predictive of a Poor Prognosis in Cholangiocarcinoma. *Dig Dis Sci*. 2018 Dec;63(12):3376-3381. 【査読あり】
- ⑩Hori Y, Naitoh I, Miyabe K, Yoshida M, Kato A, Jinno N, Hayashi K. Simultaneous side-by-side bilateral metal stent placement using a colonoscope in a patient with Billroth II reconstruction. *Endoscopy*. 2018 Aug;50(8):E218-E219. 【査読あり】
- ⑪Hori Y, Naitoh I, Hayashi K, Miyabe K, Yoshida M, Fujita Y, Natsume M, Jinno N, Kato A, Nakazawa T, Shimizu S, Hirano A, Okumura F, Ando T, Sano H, Takada H, Togawa S, Joh T. The utility and efficacy of self-expandable metal stents for treating malignant gastric outlet obstructions in patients under best supportive care. *Support Care Cancer*. 2018 Oct;26(10):3587-3592. 【査読あり】
- ⑫Kato A, Naitoh I, Kato H, Hayashi K, Miyabe K, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Jinno N, Yanagita T, Takiguchi S, Takahashi S, Joh T. Case of pancreatic metastasis from colon cancer in which cell block using the Trefle® endoscopic scraper enables differential diagnosis from pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2018 Mar 15;10(3):91-95. 【査読あり】
- ⑬Yoshida M, Marumo Y, Naitoh I, Hayashi K, Miyabe K, Nishi Y, Fujita Y, Jinno N, Hori Y, Natsume M, Kato A, Iida S, Joh T. Autoimmune Hemolytic Anemia Obscured by the Obstructive Jaundice Associated with IgG4-related Sclerosing Cholangitis in a Patient with Type 1 Autoimmune Pancreatitis: A Case Report and Review of the Literature. *Intern Med*. 2018 Jun 15;57(12):1725-1732. 【査読あり】
- ⑭Hori Y, Naitoh I, Hayashi K, Kondo H, Yoshida M, Shimizu S, Hirano A, Okumura F, Ando T, Jinno N, Takada H, Togawa S, Joh T. Covered duodenal self-expandable metal stents prolong biliary stent patency in double stenting:The largest series of

bilioduodenal obstruction. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Mar;33(3):696-703. 【査読あり】

⑮Sato T, Cesaroni M, Chung W, Panjarian S, Tran A, Madzo J, Okamoto Y, Zhang H, Chen X, Jelinek J, Issa JJ. Transcriptional Selectivity of Epigenetic Therapy in Cancer. *Cancer Res*. 2017 Jan 15;77(2):470-481. 【査読あり】

⑯Kato A, Kataoka H, Yano S, Hayashi K, Hayashi N, Tanaka M, Naitoh I, Ban T, Miyabe K, Kondo H, Yoshida M, Fujita Y, Hori Y, Natsume M, Murakami T, Narumi A, Nomoto A, Naiki-Ito A, Takahashi S, Joh T. Maltotriose Conjugation to a Chlorin Derivative Enhances the Antitumor Effects of Photodynamic Therapy in Peritoneal Dissemination of Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2017 Jun;16(6):1124-1132. 【査読あり】

⑰Hori Y, Naitoh I, Hayashi K, Ban T, Natsume M, Okumura F, Nakazawa T, Takada H, Hirano A, Jinno N, Togawa S, Ando T, Kataoka H, Joh T. Predictors of stent dysfunction after self-expandable metal stent placement for malignant gastric outlet obstruction: tumor ingrowth in uncovered stents and migration of covered stents. *Surg Endosc*. 2017 Oct;31(10):4165-4173. 【査読あり】

⑱Hori Y, Hayashi K, Yoshida M, Naitoh I, Ban T, Miyabe K, Kondo H, Nishi Y, Umemura S, Fujita Y, Natsume M, Kato A, Ohara H, Joh T. Novel characteristics of traction force in biliary self-expandable metallic stents. *Dig Endosc*. 2017 May;29(3):347-352. 【査読あり】

⑲Hori Y, Naitoh I, Hayashi K, Ban T, Natsume M, Okumura F, Nakazawa T, Takada H, Hirano A, Jinno N, Togawa S, Ando T, Kataoka H, Joh T. Predictors of outcomes in patients undergoing covered and uncovered self-expandable metal stent placement for malignant gastric outlet obstruction: a multicenter study. *Gastrointest Endosc*. 2017 Feb;85(2):340-348. e1. 【査読あり】

⑳Tahara T, Shibata T, Okamoto Y, Yamazaki J, Kawamura T, Horiguchi N, Okubo M, Nakano N, Ishizuka T, Nagasaka M, Nakagawa Y, Ohmiya N. Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42252-60. 【査読あり】

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 岡本泰幸	4. 巻 76
2. 論文標題 肝炎ウイルス感染が肝細胞に及ぼすエピジェネティックな影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 肝胆臓	6. 最初と最後の頁 867-872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang H, Okamoto Y, ISSA JJ	4. 巻 175
2. 論文標題 Targeting CDK9 Reactivates Epigenetically Silenced Genes in Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 cell	6. 最初と最後の頁 1244-1258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2018.09.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本 泰幸
2. 発表標題 siRNAスクリーニングを用いた、エピゲノム治療標的の探索
3. 学会等名 第14回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡本泰幸	4. 発行年 2018年
2. 出版社 アークメディア	5. 総ページ数 6
3. 書名 肝胆臓	

〔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
研究 分担 者	林 香月 (hayashi katsuki) (00405200)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	