

令和元年6月20日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18336

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌の革新的治療戦略の構築

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic strategies for triple negative breast cancer

研究代表者

丸山 玲緒（Maruyama, Reo）

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんエピゲノムプロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：60607985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではトリプルネガティブ乳がん(TNBC)の多様性をエピゲノムの観点から評価するべく、近年開発されたATAC-seq法を用いて26種類の乳がん細胞株のオープンクロマチン領域を同定した。TNBCは多様なパターンを呈したが大きく2群に分けることができ、モチーフ解析を行うことでその2群を分けるうえで重要な役割を果たす複数の転写因子を同定した。また機能解析実験によりその分子機構の一端を示唆するデータを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプルネガティブ乳がん(TNBC)においては、未だ明確な治療標的を同定できていないことが最大の問題であるが、その要因の一つは根底にある異常や病態が症例毎に大きく異なっていることにある。本研究ではTNBCの多様性をエピゲノムの観点から明らかにすることができたが、これらのデータは、TNBC症例をより精密に分類し、それぞれの病態に適した新規治療戦略を構築するための基盤データとして利用できると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aim to dissect the epigenetic heterogeneity and the gene regulatory landscape in BC cells by utilizing ATAC-seq method. We first obtained ATAC-seq profiles of 26 BC cell lines. We observed that ER+ and/or HER2+ BC cells show homogeneous patterns, whereas TNBC cells display a high degree of heterogeneity. To explore the epigenetic heterogeneity in TNBC cells in more detail, we performed motif analysis of distal regulatory elements in each cell line. We finally identified several key TFs that potentially contribute to the epigenetic heterogeneity in TNBC cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳がん エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

乳がんの代表的な3種類の診断マーカー（ER、PgR、HER2）が全て陰性を示すいわゆるトリプルネガティブ乳癌（以下 TNBC）は全乳がんの 10-15%を占め、ホルモン療法や抗 HER2 療法の適応とならず化学療法が施行される。一部の症例では化学療法が奏功するものの抵抗性を示す症例も多く、全体としての予後は悪い。これまで EGFR や VEGFR 等を標的とした分子標的治療が試みられているが、いずれも良い結果は得られておらず、未だ明確な治療の標的を同定できていないことが TNBC における最大の問題点である。TCGA などの大規模プロジェクトにおいても、ドライバーとなる特異的な異常は同定できておらず、その要因は TNBC が heterogeneous な疾患群であること、すなわち根底にある異常や病態が症例毎に大きく異なっていることに起因すると考えられる。治療標的の同定を目指した真に有効な研究を遂行するためには、現状の「3種類のマーカーが全て陰性」という診断のみでは明らかに不十分であり、まずは個々の病態の違いを正確に把握し、それに基づいて TNBC 症例を正確に分類することが重要であると考えられる。

我々の先行研究において、TNBC では未分化な表現型や遺伝子発現様式は共通するものの、エピゲノム、特にスーパーエンハンサーの分布様式に多様性を認めることを明らかにしてきた (Cell Rep, 2015)。すなわち、TNBC では表現型が同じでも依存するシグナル経路や転写ネットワークが症例毎に異なっており、それは super enhancer の分布様式を調べることで分類可能になることを示唆する。本研究では TNBC に対する新規治療戦略を構築するための基盤データを創出することを目的に、TNBC サブクラス内でのエピゲノム多様性とその意義についての検証を試みた。

2. 研究の目的

本研究では TNBC の多様性を特にエピゲノムの観点から評価し、その情報をもとに TNBC を層別化するとともに、個々のサブクラスにおける第一義的な異常や病態、その分子機構を明らかにすることを目的とする。それにより TNBC に対する新規治療戦略を構築するための基盤データを創出することを目指す。

3. 研究の方法

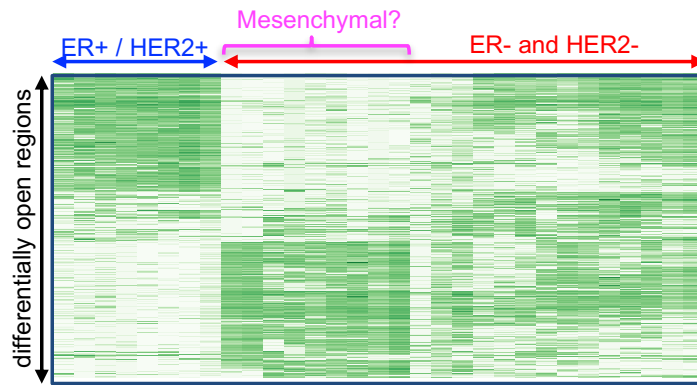
近年登場した ATACseq 法 (Buenrostro et al., Nat Methods, 2013) はそのシンプルな原理ゆえ、微量細胞から簡単に低コストでゲノムワイドなオープンクロマチン領域を同定できる画期的な手法であり、臨床検体のエピゲノム解析に最適な手法の一つであると思われた。そこで初めに ATAC-seq 法のプロトコルの改良と最適化を行なった。

次に乳癌細胞株 26 株を用いて ATAC-seq 解析や RNA-seq 解析を施行し、TNBC のエピゲノムの多様性について様々な角度から解析を行なった。またオープンなエンハンサー領域のモチーフ解析を施行し、各サブタイプや各細胞株に固有な転写因子の探索を行なった。

さらに同定された転写因子に関して、細胞株を用いた機能解析を行い、TNBC の病態を形成する分子メカニズムの同定を試みた。また利用可能な公共データベースの解析を施行し、臨床的意義の検証を行った。

4. 研究成果

(1) 初めにプロトコルの改良と最適化を行い、微量細胞(1000 細胞)でも施行可能な ATAC-seq 法を確立した。そのプロトコルを用いて、Luminal 型、HER2 型、Basal 型の各種乳癌細胞株 26 株を用いて ATAC-seq 法を施行したところ、ER 陽性あるいは HER2 陽性細胞は均一なオー

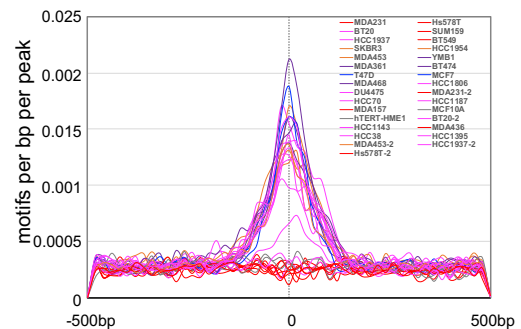


プンクロマチン領域のパターンを示したのに対し、TNBC 株のそ

図1. ATAC-seq profileによる乳癌細胞株の層別化

それは多様なパターンを呈した。興味深いことに TNBC 株内でもいわゆる Mesenchymal 型と思われる 6 株は均一なオープンクロマチン領域のパターンを示したのに対し、それ以外の 12 株では完全に多様なパターンを呈していた(図 1)。

(2) 各細胞のオープン領域に含まれるモチーフ解析の結果、各クラスターに重要と思われる転写因子を推定することができた。特にいくつかの転写因子は TNBC 内での活性・不活性がはっきり分かれており(図 2)、TNBC の層別化に利用できると考えられた。さらにそれら転写因子やエピゲノム因子のノックダウンと ATACseq 解析を組み合わせることにより、転写制御機構の細胞株ごとの多様性や



各領域での多様性の一部を明らかにすることができた。

図2. TNBCを2群に分けるモチーフ

(3) これらの過程で同定された転写因子 X に関しては、公共データの TNBC 症例の解析において発現量と予後との相関が認められたことから、TNBC の層別化に有用な診断マーカーや新規治療標的の候補となりうる可能性が示唆された(図 3)。現在転写因子 X に関してさらなる機能解析を継続している。

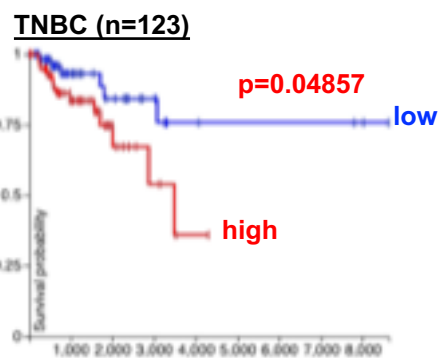


図3. TNBCの生存曲線解析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Wu W, Rokutanda N, Takeuchi J, Lai Y, Maruyama R, Togashi Y, Nishikawa H, Arai N, Miyoshi Y, Suzuki N, Saeki Y, Tanaka K, Ohta T. HERC2 promotes BLM and WRN to suppress G-quadruplex DNA. Cancer Res 2018;78:6371-6385. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-1877

- ② Johmura Y, Maeda I, Suzuki N, Wu W, Goda A, Morita M, Yamaguchi K, Yamamoto M, Nagasawa S, Kojima Y, Tsugawa K, Inoue N, Miyoshi Y, Osako T, Akiyama F, Maruyama R, Inoue J, Furukawa Y, Ohta T, Nakanishi M. Fbxo22-mediated KDM4B degradation determines selective estrogen receptor modulator activity in breast cancer. *J Clin Invest.* 2018;128:5603-5619. DOI:10.1172/JCI121679
- ③ Nishiyama K, Maruyama R, Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Toyota M, Hatanaka Y, Igarashi T, Kobayashi JI, Ogi K, Dehari H, Miyazaki A, Yorozu A, Yamamoto E, Idogawa M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Hiratsuka H, Suzuki H. Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1. *Cell Death Dis.* 2018; 9:826. DOI: 10.1038/s41419-018-0893-2.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Liying Yang, Tomoyoshi Nakadai, Reo Maruyama. ATAC-seq analysis reveals epigenetic heterogeneity in breast cancer. 2019年2月8日. 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision. (米国、ハワイ州)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

※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、研究者個人に帰属されます。