

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15631

研究課題名（和文）放射線抵抗性獲得におけるCTCF局在異常を介したDNA高次構造の解明

研究課題名（英文）Higher order structure of DNA via CTCF localization abnormality in radioresistance acquisition

研究代表者

立川 章太郎（Tatekawa, Shotaro）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40816550

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）：本研究では放射線治療抵抗性に関わる広義のエピジェネティックな機序の解明を主題としており、今回の研究期間では膵癌細胞株においてRNAメチル化酵素であるMETTL3の発現上昇が抵抗性に関わっていること、またその標的遺伝子としてPLK1が重要な役割をしていることを見出した。さらに、METTL3とPLK1の発現に関して相関がみられること、PLK1阻害剤によりMETTL3の発現程度に関わらず放射線感受性が増加することを見出した。また、術前化学放射線治療を行った膵癌患者においてそれらの発現が治療感受性へ及ぼす影響、加えてdCAS9を用いた部位特異的メチル化阻害によるPLK1発現変動に関しても解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の研究課題であったDNA高次構造の変化による放射線治療抵抗性への関与の解析の前に、同じく広義のエピジェネティックな機序であるRNAメチル化の関与を解析した形となったが、集学的治療などの医学が発展した現代においても様々な治療に対して抵抗性であり難治性である膵癌において、新たな治療標的を発見することができた。PLK1阻害剤に関しては海外で主に血液悪性疾患に対する治療として治験が進められているが、今回の研究成果からは膵癌に対して放射線治療とPLK1阻害剤の併用の可能性に希望を持てる結果であった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate a broadly defined epigenetic mechanism related to resistance to radiotherapy. We showed increased expression of METTL3, an RNA methylase, was related with the resistance for radiation therapy and PLK1 was an important role as its target gene in pancreatic cancer cell lines. Furthermore, we found that there was a correlation between METTL3 and PLK1 expression, and that PLK1 inhibitors increased radiosensitivity regardless of METTL3 expression level. We are also analyzing the effects of their expression on therapeutic sensitivity in patients with pancreatic cancer treated with preoperative chemoradiotherapy, as well as PLK1 expression changes due to site-specific methylation inhibition using dCAS9.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療抵抗性 エピジェネティクス エピトランスクリプトーム METTL3 RNAメチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異と同様に発がんの過程や病態進展に重要なのがエピジェネティックな異常である。エピジェネティクスの古典的な定義は、「DNAの塩基配列に依存せず細胞分裂を通じて継承される生物情報」とされ、具体的にはDNAメチル化情報やヒストン修飾パターンを指す。エピジェネティックな異常は遺伝子変異に先立って発がん過程の早期に起こることがこれまでもわかっており、例えばDNAメチル化異常はクロマチン構造変化を介して染色体不安定性を惹起し遺伝子変異の獲得へと帰結することが知られている(Karpf AR et al. *Cancer Res* 2005)。しかし、遺伝子変異等のジェネティックな情報と比較し、ヒトのゲノム全域にわたるエピジェネティックな情報、すなわちエピゲノムの把握については、全容の解明にはまだ至っていないのが現状である。がんの発生や治療抵抗性の獲得など病態の解明には遺伝子変異のみならずエピジェネティックな異常を知ることが不可欠である。

エピジェネティックな機序として代表的なDNAメチル化やヒストン化学修飾以外にも non coding RNA や DNA/クロマチンの高次構造が挙げられる。特にDNAの高次構造については発がん過程でダイナミックに変化する可能性が示唆されており、遺伝子変異やDNAメチル化・ヒストン修飾による機序とならび重要なものと考えられている。その中でも申請者は、DNA結合蛋白であるCTCFの局在異常によるDNA高次構造の変化ががんの病態進展に及ぼす可能性に着目した。近年、CTCFの局在異常によるDNA高次構造の変化により、がん遺伝子の発現上昇やがん抑制遺伝子の発現低下が生じることが報告されている。例えば、膠芽腫においてIDH変異が存在するとDNAメチル化亢進によりCTCFの結合が阻害され、FIP1L1のエンハンサーががん原遺伝子であるPDGFRAの発現を亢進させる(Hnisz D et al. *Science*. 2016)。また、がん抑制遺伝子でもあるCDKN2A(p16)はCTCFの結合減少により発現低下することが報告されている(Witcher M, et al. *Mol Cell*. 2009)。サイクリン依存性キナーゼであるCDKN2Aは細胞周期にも関わり放射線感受性に重要な役割を果たすため、CTCFの局在異常は放射線抵抗性に重大な影響を及ぼすと申請者は考えている。また、CTCFはDNA損傷修復の際にも関わることが近年報告されているため(Han D et al. *Sci Rep*. 2017)、その点においても放射線感受性に影響を与えることが予想される。さらに、DNAメチル化酵素(DNMT)阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤は放射線感受性に関わるDNA損傷応答タンパクなどの発現に影響を与えることが多数報告されており(Ren J et al. *Curr Pharm Des*. 2014)、エピジェネティック異常の放射線感受性への関与は疑いの余地が無い状況である。以上より、本研究では、放射線抵抗性獲得の過程における広義のエピジェネティック異常の関与をエピゲノム解析で明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

これまでに筆者らの研究グループでは、RNAメチル化の変化が大腸癌細胞株において化学療法抵抗性に関わっていることを明らかにしてきた。RNAのメチル化はmRNAだけでなく、lncRNAの発現にも影響することが報告されており、またlncRNAを始めとするnon coding RNAはDNAの立体構造へ影響することがこれまでに示されている。そのため、ゲノム情報だけでなくトランスクリプトームについても解析することにより、広義のエピジェネティクスが放射線治療抵抗性にどのように関わっているか、より理解が深められると思われる。よってエピゲノムに加えてエピトランスクリプトームにも着目し、遺伝子発現形式やRNAメチル化の変化がどのように放射線治療抵抗性に関わっているかをまず解明することとした。

RNAメチル化酵素であるMETTL3は様々な癌において発現異常が報告されている。例えば、肺腺癌ではOncogeneとして働くことが報告される一方、膠芽腫においてはTumor suppressor geneとして働くことが報告されている。その理由としては、METTL3のtargetであるメチル化される遺伝子が何かに依るところが大きく、RNAのメチル化によりその遺伝子発現の増減がどうなるかにも左右される。また、集学的治療が可能となった現代においても未だに予後が不良な膵癌においてはRNAメチル化の関わりが不明であり、放射線治療抵抗性の解明を目的に膵癌細胞株におけるRNAメチル化の関わりとその標的遺伝子について解析することとした。

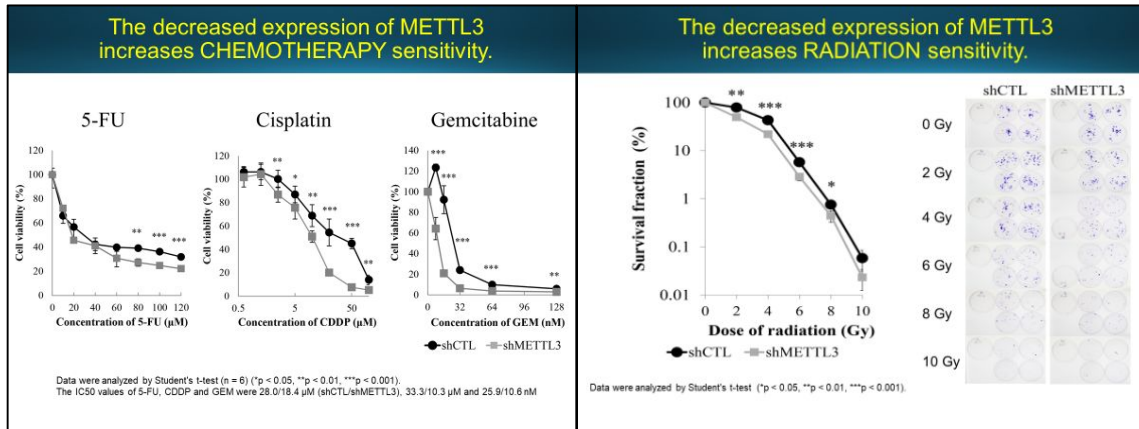
3. 研究の方法

METTL3 knock downによる膵癌細胞株MiAPACA2のフェノタイプ変化の解析
RNA免疫沈降を用いたMeRIP-seqによるMETTL3のtarget遺伝子の探索
同定されたtarget遺伝子の新たな放射線治療標的としての解析

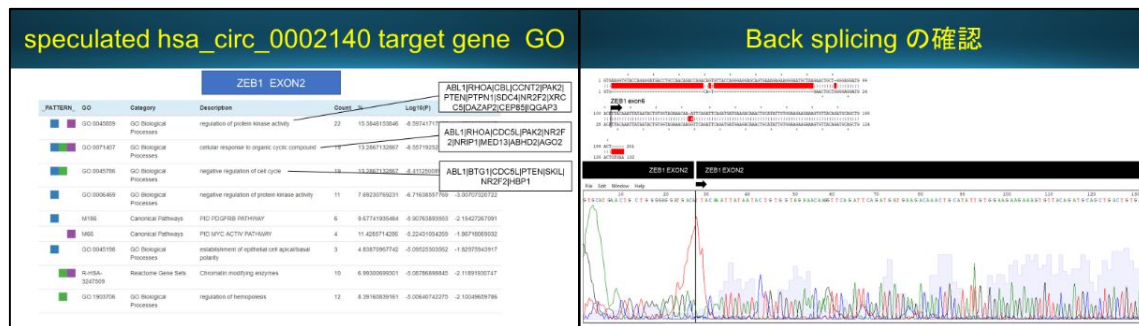
4. 研究成果

METTL3 knock downによる膵癌細胞株MiAPACA2のフェノタイプ変化の解析

まず METTL3 を shRNA により knock down(KD) し、化学療法や放射線に対する感受性を評価した。その結果、METTL3 を KD した細胞株において化学療法や放射線の感受性が上昇する結果となった。この結果から、膵癌細胞株においては METTL3 が oncogene として働いていることが考えられた。

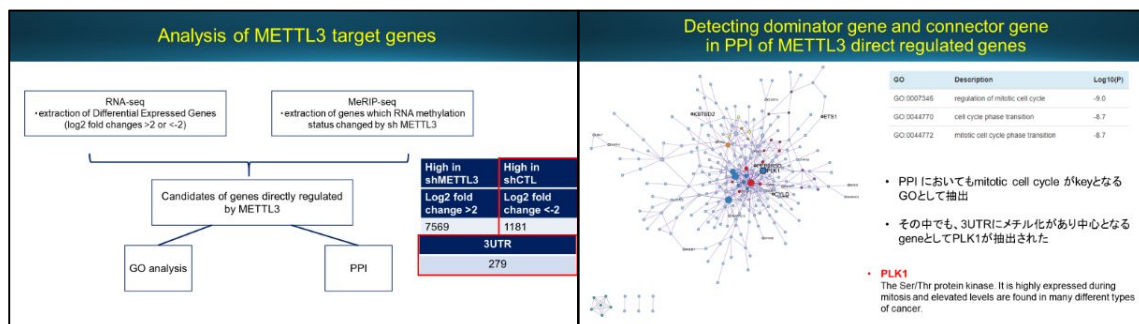


RNA 免疫沈降を用いた MeRIP-seq による METTL3 の target 遺伝子の探索
 (1) METTL3 によりメチル化が制御されている non-coding RNA の解析
 次に METTL3 によりメチル化が制御されている non-coding RNA の解析に移った。RNA のメチル化はスプライシングにも影響することが報告されており、METTL3 を KD することにより生じるスプライシングの変化を RNA-seq を用いて評価したところ、環状 RNA の発現変化が示唆される結果であった。環状 RNA は従来からがんの病態に関連することが報告されており、miRNA のスポンジとして作用や mRNA の安定性・翻訳に関わることが



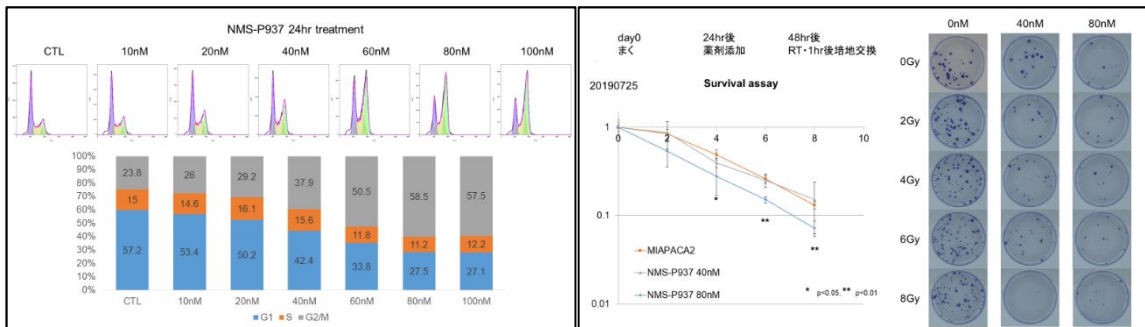
報告されている。METTL3 の関連が示唆された環状 RNA において、その配列から target となる miRNA/mRNA を推測し、その遺伝子群 Gene ontology 解析を行ったところ、ZEB1 の exon2 から構成される環状 RNA が膵癌の病態に関わっていることが推測される結果となった。MiAPACA2 から環状 RNA の特性である back splicing を検出し、RNAse R 処理においても安定していることを証明し、実際に存在していることを証明した。

(2) METTL3 によりメチル化が制御されている mRNA の同定
 non-coding RNA と同時に METTL3 により発現が制御されている mRNA の解析も行った。MeRIP-seq の結果と RNA-seq の結果を合わせることで METTL3 により直接制御されている mRNA の候補を抽出し、Gene ontology や Protein-protein interaction を用いて重要な働きをしている遺伝子を選定したところ M 期の制御に関わっている PLK1 が新たな治療標的の候補として挙げられた。

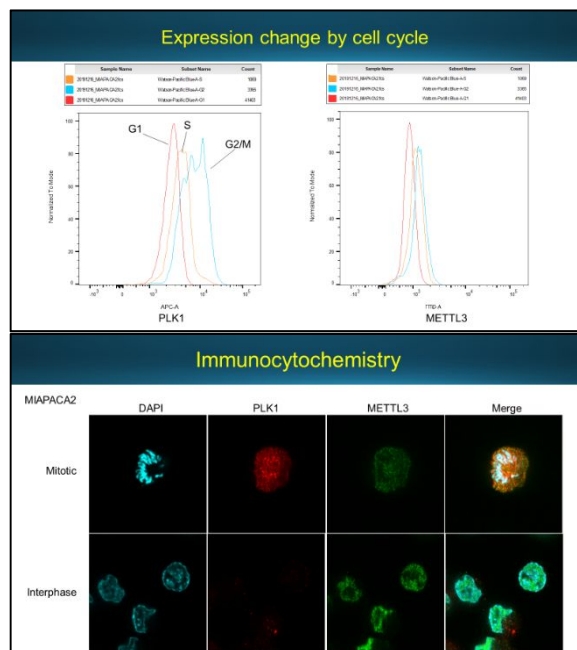


同定された target 遺伝子の新たな放射線治療標的としての解析

- (1) まず RNA メチル化による発現変化の可能性が考えられた circRNA_2140 を、プラスミドを用いて過剰発現させることにより、細胞の表現形質の変化をみることにした。circRNA を過剰発現させるには、back splicing の再現が必要であり、スプライスサイトや RNA の相互作用を考慮し circRNA の前後にそれらの配列を配置する必要がある。いくつかの文献を参考にプラスミドを作成したが、環状 RNA の発現効率は悪く線状の RNA のみが過剰発現される状況となった。現時点で環状 RNA の過剰発現が実現できておらず、継続して方法の改良を行っていく。
- (2) MeRIP-seq と RNA-seq で同定された PLK1 を、放射線治療抵抗性克服の新たな標的として解析した。PLK1 はセリン・スレオニンキナーゼであり、いくつかの阻害剤がアメリカで治験が進んでいる。また PLK family が存在し、癌遺伝子としては PLK1 が主要な働きをするため、選択的 PLK1 阻害剤である NMS-P937 を用いて放射線感受性の変化を検討することとした。まず至適濃度・至適時間を同定するために細胞周期アッセイを行い、その後にコロニーフォーメーションアッセイで放射線治療との相乗効果について解析した。その結果、比較的低い濃度で M 期の延長が認められ、そ



の指摘濃度暴露後の放射線照射では放射線に対する相乗効果を認めた。また、PLK1 は M 期に発現が上昇することが報告されているが、METTL3 の細胞周期毎の発現変化に関しては不明である。そこでフローサイトメトリーを用いて細胞周期毎 (DAPI を使用) にシグナル強度を測定したところ、PLK1 とともに METTL3 においても G2/M 期においてタンパク発現が増加していることを示唆する結果であった。また、免疫化学染色も行ったところ、フローサイトメトリーと同様に PLK1 と METTL3 のタンパク発現量に相関を認める結果であった。そこで実際に臨床検体でのタンパク発現量と臨床成績に影響があるか、手術検体を用いて解析を現在しているところである。また、PLK1 のメチル化が発現上昇に直接関わっているかを調べるため、CRISPR/dCas9 システムを用いた部位特異的な RNA メチル化を行うためにプラスミドを作成中である。それらが終了次第結果をまとめて論文投稿する予定である。また、最終的には DNA 高次構造と放射線抵抗性との関わりについても検討していきたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tamari K, Sano K, Li Z, Seo Y, Otani K, Tatekawa S, Toratani M, Takaoka Y, Takahashi Y, Minami K, Isohashi F, Koizumi M, Ogawa K	4. 巻 39
2. 論文標題 Ro 90-7501 Is a Novel Radiosensitizer for Cervical Cancer Cells that Inhibits ATM Phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 4805-4810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13665	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 -

1. 著者名 Zhihao Li, Keisuke Tamari, Yuji Seo, Kazumasa Minami, Yutaka Takahashi, Shotaro Tatekawa, Keisuke Otani, Osamu Suzuki, Fumiaki Isohashi, Kazuhiko Ogawa	4. 巻 148
2. 論文標題 Dihydroouabain, a novel radiosensitizer for cervical cancer identified by automated high-throughput screening.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiotherapy and oncology	6. 最初と最後の頁 21-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radonc.2020.03.047	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 立川章太郎
2. 発表標題 m6A RNA modification by METTL3 regulates chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第9回国際放射線神経生物学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立川章太郎
2. 発表標題 m6A RNA modification by METTL3 regulates chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第38回欧州放射線腫瘍学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立川章太郎
2. 発表標題 The effect of the smoking cessation for radiation therapy of glottis carcinoma with monitoring CO
3. 学会等名 第39回欧州放射線腫瘍学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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