

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18386

研究課題名(和文) アクティブエンハンサーを介した悪性脳腫瘍の治療抵抗性獲得機序のダイナミズム

研究課題名(英文) Mechanism of chemoresistance in malignant gliomas via active enhancers

研究代表者

平野 雅規 (Hirano, Masaki)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学分野・研修生

研究者番号：40823076

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)：膠芽腫は最も予後が悪い脳腫瘍の一つである。その一因として、唯一明確な効果が示されている化学療法薬(TMZ)に対する耐性メカニズムの存在があり、その克服は喫緊の課題である。本研究ではTMZ耐性脳腫瘍においてRFPが高発現していること、TMZとRFP阻害の併用でTMZ耐性脳腫瘍においても高い治療効果が得られることが明らかとなった。次世代シーケンサー解析から、RFP阻害により、ヒストン修飾(H3K27ac)の広範な変化が引き起こされ、これが酸化ストレス・アポトーシス関連遺伝子の活性化、また一方で細胞周期進行・塩基除去修復を司る遺伝子の不活性化につながり、治療効果に寄与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、脳腫瘍領域でもゲノム解析が進み、その発生に重要な遺伝子異常が明らかとなりつつある。しかし依然として悪性脳腫瘍が難治であることに変わりはなく、新規治療法開発が望まれている。本研究では、エピゲノム調整関連因子であるRFPを標的とすることで、広範なエピゲノム変化が起こり、悪性脳腫瘍の化学療法抵抗性に寄与する限定的なパスウェイが阻害され、非常に高い治療効果が得られることが明らかとなった。今後、脳腫瘍患者の予後を改善する新規治療薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：RET finger protein (RFP) forms a complex with histone deacetylase 1, resulting in aberrant deacetylation of H3K27ac and dysregulation of cis-regulatory elements. We evaluated the modulatory effects of RFP knockdown (KD) on cis-regulatory elements, gene expression, and chemosensitivity to temozolomide both in glioblastoma cells and in intracranial glioblastoma model. Combination of RFP KD and TMZ markedly suppressed glioblastoma cell growth due to oxidative stress and aberrant cell cycle and increased survival time in mice with glioblastoma. ChIP-seq and RNA-seq revealed that RFP KD altered activity of numerous cis-regulatory elements adjacent to genes that control functions such as apoptosis, mitosis, DNA replication and cell cycle. This study suggests that RFP contributes to chemoresistance via aberrant deacetylation of H3K27, whereas dysregulation of RFP-associated cis-regulatory elements in glioma and RFP KD combined with TMZ is an effective treatment strategy for lethal glioma.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：glioblastoma RET finger protein active cis-element epigenetics chemoresistance

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は最も術後の予見が厳しい脳腫瘍の一つで最大限の手術及び放射線化学療法を行っても5年生存率は未だ10%以下であり、新たな治療法の開発が望まれている。膠芽腫を難治たらしめている要因の一つとして、現在、唯一明確な効果が示されている化学療法薬(テモゾロミド: TMZ)に対する耐性が生じることが考えられているが、未だ解明されていない点も多く、そのメカニズムの更なる解明及びそれらの克服は喫緊の課題である。

近年の分子生物学研究の進歩に伴い、遺伝子自体の異常のみならず、遺伝子の発現を調整するエピゲノム機構の異常が、悪性腫瘍の発生や性質に大きな影響を与えることが報告されてきている。まず当研究グループは、その中でも特にダイナミックに遺伝子発現調節を行うアクティブシスエレメント(スーパーエンハンサーなど)に着目し、この問題にアプローチできないかと考えた。シスエレメントはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)による調整を受けており、ヒストンH3の27番目のアミノ酸であるリシンがアセチル化される修飾(H3K27ac)がその活性の指標となることが知られている(図1)。残念ながらHDACをターゲットとした治療薬は副作用の問題もあるため、これまで脳腫瘍での実用化には至っていないが、HDACと相互作用する適切な分子をターゲットとすることで、腫瘍に特異的な形質獲得のメカニズムの解明に迫り、新規治療法の開発につながられるのではないかと考えた。

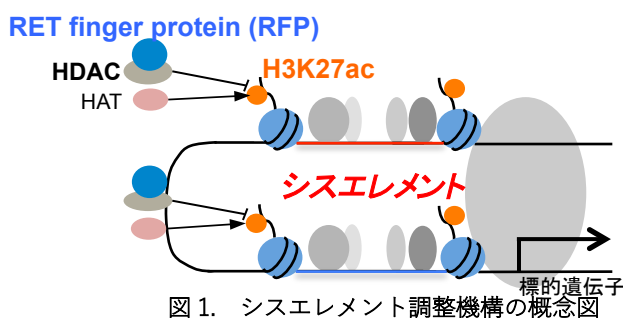


図1. シスエレメント調整機構の概念図

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでがん研究で主に着目されてきたゲノム異常ではなく、エピゲノムの観点から上述の問題にアプローチし、新規治療法開発につながる知見を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

- ・ 神経膠腫細胞株を用い、化学療法耐性に寄与するエピゲノム関連因子を同定
- ・ *in vitro*, *in vivo*における治療効果の検討
- ・ 次世代シーケンサーを用いたChIP-seq, RNA-seq解析による化学療法耐性機構の検討

### 4. 研究成果

まず当研究では、既知のテモゾロミド(TMZ)抵抗性因子であるMGMTを高発現する複数の膠芽腫細胞株(U87-MGMT, T98, TGS-01)において、HDACと相互作用するRET finger protein (RFP)の発現が有意に高くなっていることを見出した(図2)。また、細胞・マウスモデルの両方においてRFPノックダウン(siRNA)によりTMZ抵抗性が大幅に改善されることを示した(図3, 4)。*in vitro*, *in vivo*の両方において、RFPノックダウン単独による腫瘍抑制効果も示唆され、これについてもrescue assayによって証明した(図5)。

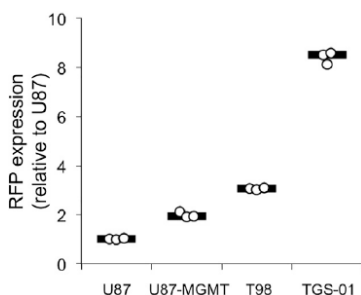


図2. 各種膠芽腫細胞株におけるRFP発現レベル

既知のTMZ抵抗性因子であるMGMTを発現していないU87と比較し、MGMTを発現する細胞株(U87-MGMT, T98, TGS-01)においては、RET finger protein(RFP)の発現が有意に高い

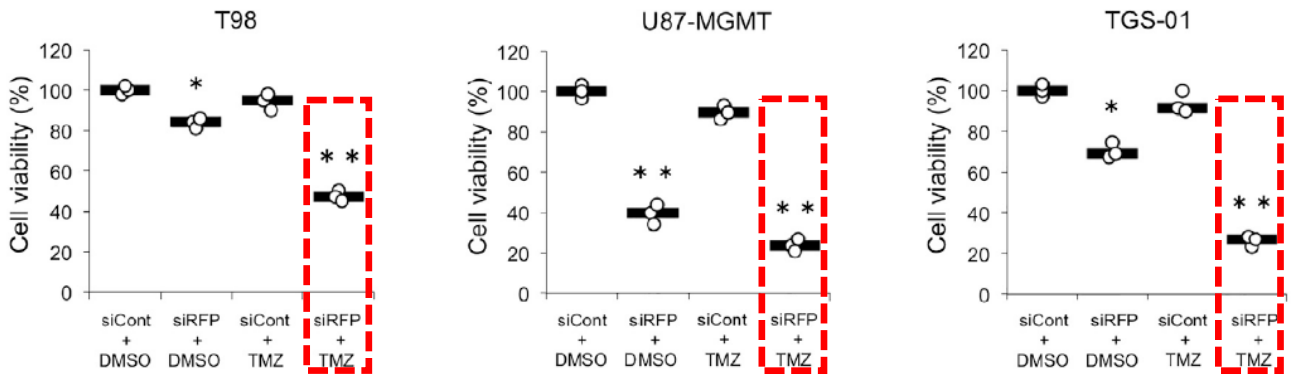


図 3. in vitro における RFP ノックダウンの効果

siRNA による RFP ノックダウンと TMZ 投与を組み合わせることで、TMZ 単独治療では増殖抑制効果が得られなかった細胞株においても、有意(かつ synergistic)な抑制効果が得られた

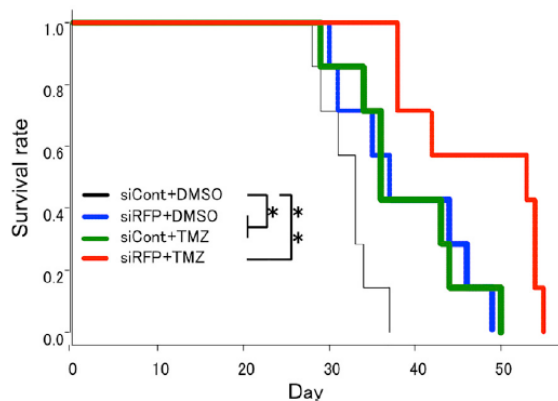


図 4. 脳腫瘍マウスモデルにおける RFP ノックダウンの効果

U87-MGMT 細胞を脳内に接種したマウスモデルにおいても、siRNA による RFP ノックダウンと TMZ 投与を組み合わせることで TMZ 単独投与群より有意な生存期間延長効果を認めた

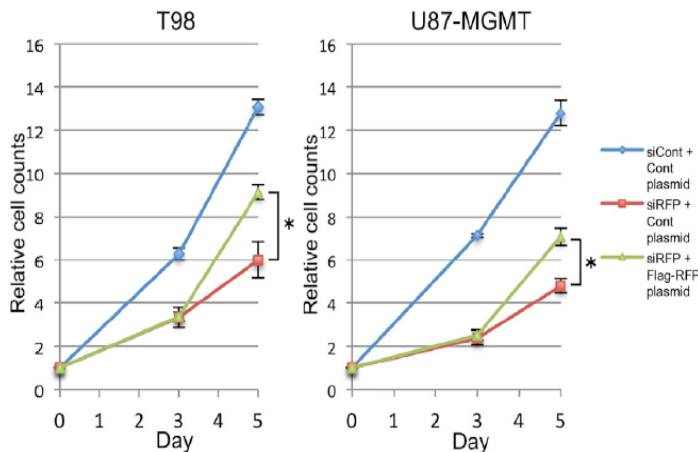


図 5. RFP rescue assay

siRNA による RFP ノックダウン(day0)後に、サイレント変異を持つ RFP 発現 plasmid によって RFP を再発現させる(day3)と、腫瘍細胞増殖速度の改善を認めた

続いて、RFP ノックダウンによって観察された現象のメカニズムをさらに詳細に検討するため、次世代シーケンサーを用いた解析 [RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析、およびクロマチン免疫沈降シーケンス (H3K27ac ChIP-seq) 解析] を行った。その結果、RFP ノックダウンによりゲノム上の多数の領域で広範な H3K27ac 修飾パターンの変化が起き、それに伴って近傍の遺伝子の発現も変化していることが明らかとなった(図 6, 7)。これまでの報告や Gene Ontology (GO) 解析から、酸化ストレス・アポトーシス関連遺伝子 (*FOXO1*, *TXNIP* など) が活性化されている一方、腫瘍細胞の分裂や DNA 修復を促進する遺伝子群 (*TOP2A*, *PARPBP* など) が不活性化されていることが示唆された(図 8)。これらの現象についてはさらに別の assay (CellROX による活性酸素種 ROS の評価、FACS による cell cycle 評価、TUNER assay によるアポトーシス

評価)を追加で実施し、確かであることを証明した。

(なお今回の検討においては、いずれの細胞種においても RFP ノックダウンによる MGMT 発現低下は認めておらず、上述の PARPBP(およびこれと複合体を形成する PARP1)を介した BER パスウェイが TMZ 抵抗性獲得に重要な役割を果たしていることが示唆された)

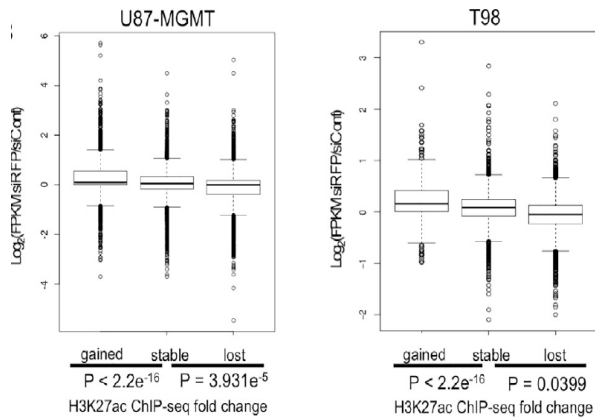


図 6. RFP ノックダウンによる H3K27ac 修飾および近傍遺伝子発現の変化

横軸: RFP ノックダウンによる H3K27ac ピークの変化  
縦軸: 各 H3K27ac ピーク近傍遺伝子の発現変化(log2)  
RFP ノックダウンにより、多数の領域で H3K27ac 修飾パターンの変化が起き、さらにその近傍の遺伝子の有意な発現変化も引き起こされることが示された

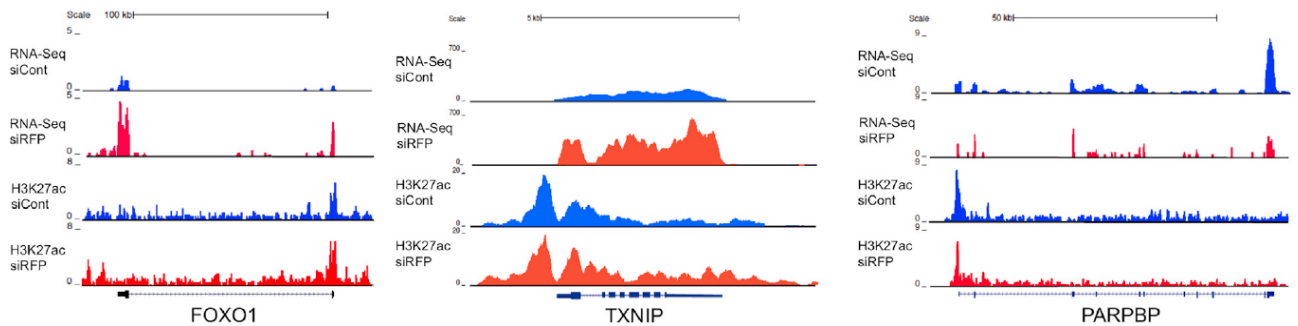


図 7. RFP ノックダウンによる H3K27ac 修飾と遺伝子発現変動の例

他癌種での報告と同様に、活性酸素種(ROS)酸性に関わる *TXNIP* や、やはり ROS 産生に関わる *FOXO1* 近傍の H3K27ac 修飾の増加・それに伴う有意な遺伝子発現上昇を認めた(左, 中央)。一方で、近年 TMZ 抵抗性に寄与することが報告されている PARP1 と相互作用する *PARPBP* においては、H3K27ac 修飾の減少・それに伴う有意な遺伝子発現低下を認めている(右)。

|  |                      |
|--|----------------------|
| H3K27ac-gained and upregulated adjacent gene : 62 genes  |                      |
| Upregulated pathways                                     | p-values             |
| GO:0043065: positive regulation of apoptotic process     | 10 <sup>-4.49</sup>  |
| GO:0008637: apoptotic mitochondrial changes              | 10 <sup>-3.57</sup>  |
| GO:0030155: regulation of cell adhesion                  | 10 <sup>-2.79</sup>  |
| H3K27ac-lost and downregulated adjacent gene : 293 genes |                      |
| Downregulated pathways                                   | p-values             |
| GO:0007059: chromosome segregation                       | 10 <sup>-10.29</sup> |
| R-HSA-1640170: Cell Cycle                                | 10 <sup>-8.85</sup>  |
| GO:0006260: DNA replication                              | 10 <sup>-6.67</sup>  |
| GO:0071103: DNA conformation change                      | 10 <sup>-5.66</sup>  |

図 8. RFP ノックダウンにより活性化/不活性化される遺伝子群の GO 解析

RFP ノックダウンにより、酸化ストレス・アポトーシス関連遺伝子が活性化される一方、腫瘍細胞の分裂や DNA 修復を促進する遺伝子群が不活性化される

RFP をターゲットとした免疫沈降に続く Western blotting の結果から、膠芽腫細胞において RFP と HDAC1 が複合体を形成していることが証明された(図 9)。さらに HDAC1/RFP ChIP-qPCR を実施すると、「RFP ノックダウンにより H3K27ac 修飾が増加し遺伝子発現も上昇した遺伝子群(図

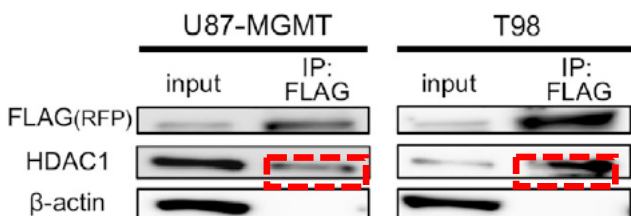


図 9. 膠芽腫細胞における RFP-HDAC1 複合体の存在の証明

RFP をターゲットとした免疫沈降後、左側に示した抗体を用いた Western blotting を実施した。膠芽腫細胞において RFP が HDAC1 と複合体を形成していることが示された。

8 赤枠) では、RFP と HDAC1 が共に結合していることが示された(図 10 左)。一方、「RFP ノックダウンにより H3K27ac 修飾が減少し遺伝子発現も低下した遺伝子群(図 8 青枠)」では、HDAC1 のみが結合しており、RFP の存在は認められなかった(図 10 右)。これらの結果から、RFP-HDAC1 複合体は、前者においては直接的な発現調整を行っている一方、後者においては間接的な発現調整を行っていると考えられた。(後者のより詳細なメカニズムについては今後の更なる検討が必要)

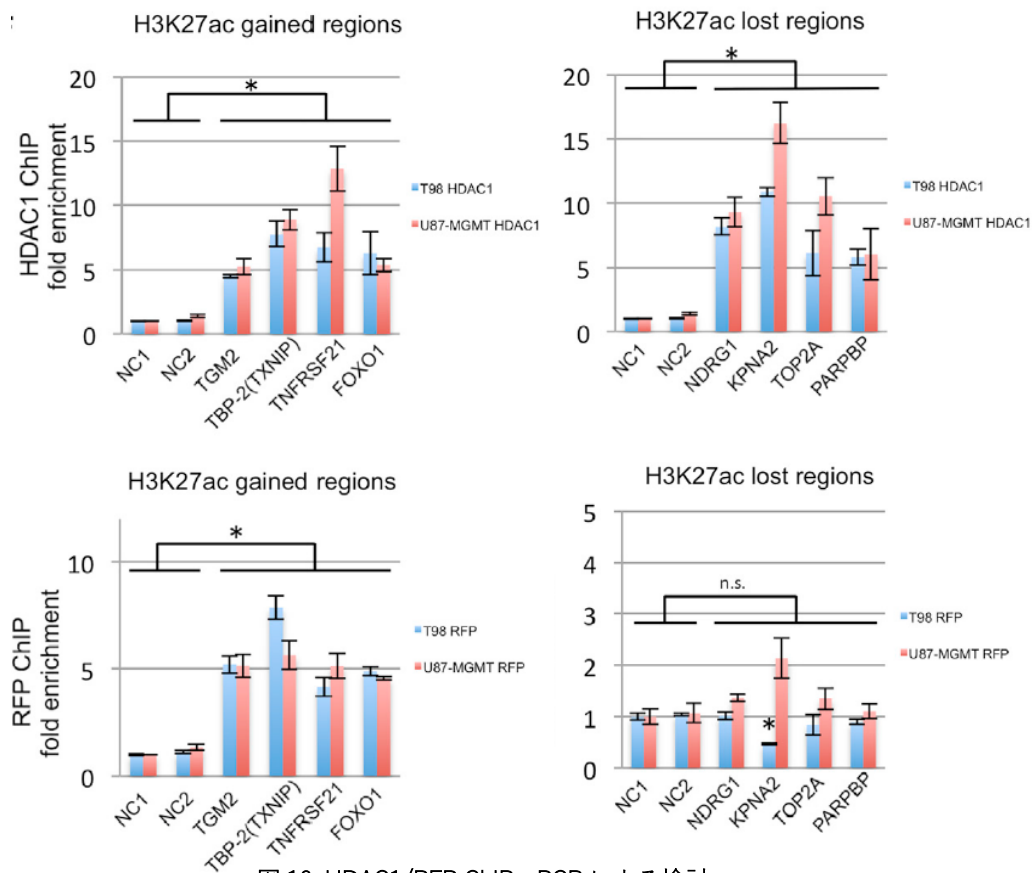


図 10. HDAC1/RFP ChIP-qPCR による検討

HDAC1 あるいは RFP をターゲットとしたクロマチン免疫沈降後、qPCR を実施した。

図 8 赤枠の遺伝子群近傍の H3K27ac ピーク領域では HDAC1, RFP ともに enrichment が認められた(左)が、

図 8 青枠の遺伝子群近傍の H3K27ac ピーク領域では HDAC1 のみ enrichment を認めた(右)。

最後に、TCGA から公開されている神経膠腫患者のデータを用いた解析も実施した。結果、RFP 高発現群は低発現群と比較して全生存期間が有意に短いことが示された( $P=0.0044$ , 図 11 左)。また TMZ 抵抗性改善に(少なくとも一部)寄与すると考えられた PARPBP についても検討してみると、同様に高発現群は低発現群と比較して全生存期間が有意に短いことが示された( $P < 2 \times 10^{-16}$ , 図 11 右)。今回着目した RFP は実臨床においても非常に有望な治療ターゲットとなることが期待される。

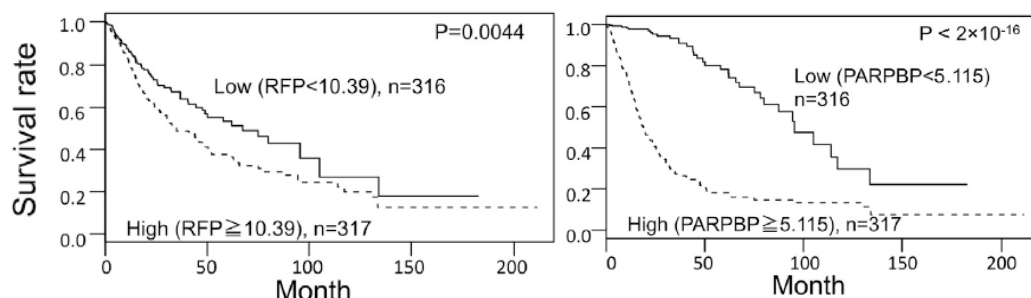


図 11. TCGA 神経膠腫患者データの検討

(左)RFP 発現の中央値を cut off とし、全生存期間を比較。RFP 高発現群は低発現群と比較して有意に全生存期間が短かった。

(右)PARPBP 発現の中央値を cut off とし、全生存期間を比較。高発現群は低発現群と比較して有意に全生存期間が短かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

|  |                              |
|--|------------------------------|
| 1. 著者名<br>Ranjit Melissa, Hirano Masaki, Aoki Kosuke, Okuno Yusuke, Ohka Fumiharu, Yamamichi Akane, Kato Akira, Maeda Sachi, Motomura Kazuya, Matsuo Keitaro, Enomoto Atsushi, Ino Yasushi, Todo Tomoki, Takahashi Masahide, Wakabayashi Toshihiko, Kato Takuya, Natsume Atsushi | 4. 巻<br>26                   |
| 2. 論文標題<br>Aberrant Active cis-Regulatory Elements Associated with Downregulation of RET Finger Protein Overcome Chemoresistance in Glioblastoma   | 5. 発行年<br>2019年              |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>2274 ~ 2281.e5 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.celrep.2019.01.109  | 査読の有無<br>有                   |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                    |

〔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<br>平野 雅規、メリッサ ランジット、青木 恒介、奥野 友介、大岡 史治、山道 茜、前田 紗知、加藤 彰、本村 和也、松尾 恵太郎、榎本 篤、稲生 靖、藤堂 具紀、高橋 雅英、若林 俊彦、加藤 琢哉、夏目 敦至 |
| 2. 発表標題<br>RET finger protein阻害に関連したactive cis-regulatory elementsの変化により、神経膠芽腫の化学療法抵抗性が改善される                       |
| 3. 学会等名<br>第1回癌学会若手の会  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|