

令和 5 年 9 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03883

研究課題名(和文) スーパーエンハンサーを標的とした口腔癌薬剤耐性機構の解明による治療法開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic methods for drug-resistant oral cancer targeting super-enhancers

研究代表者

鵜澤 一弘 (Uzawa, Katsuhiko)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30302558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：CHIP-Seq法でCetuximab (CTX) 耐性口腔癌細胞株に特異的なスーパーエンハンサー(SE)領域を検索・同定した。さらに、CTX耐性口腔癌細胞株に共通したSE領域に存在する標的遺伝子を抽出し、TCGAを用いて臨床検体における標的遺伝子の発現量や5年生存率について統計的に解析した。UCSC Genome BrowserでSEと標的遺伝子の位置関係を確認し、Gene set enrichment analysis (GSEA)解析で濃縮されている遺伝子セットも解析した。本研究によりCTX耐性SEの存在と口腔癌患者の予後と深く関与するCTX耐性SEの標的遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究での抗癌剤耐性SEの同定を契機に、エピジェネティックな発現制御機構を利用した新規治療法・薬剤を開発することが見込まれ、真に有効な新しい口腔癌耐性克服への治療応用にむけて大いに期待できるものである。これは、個々の耐性関連機能ではなく、系統的に複数の機能を制御する共通エンハンサーを利用するという点できわめてユニークな治療法になるものと言える。また、担癌患者の長期社会復帰などを実現させる可能性もあり、その社会的意義も大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We applied chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) to profile super-enhancers (SE) using two independent cetuximab-resistant OSCC cell lines. In total, 64 chromosomal loci by histone H3 lysine 27 acetylation (H3K27ac) ChIP-Seq were identified as common SE in cetuximab-resistant OSCC cells. In addition, a total of 131 genes were located in SE regions, and 34 genes were upregulated in OSCC tissues by TCGA-OSCC analysis. Moreover, highly expression of four genes (C9orf89, CENPA, PISD, and TRAF2) were predicted as a poorer prognosis factors for OSCC patients according to log-rank tests. Increased expression of the four genes frequently co-occurred in data of TCGA-OSCC analyses. The four genes' high and low expression groups showed significant differences in prognosis. Analysis of these genes could contribute to an improved understanding of cetuximab resistance in OSCC patients.

研究分野：口腔癌における分子生物学

キーワード：スーパーエンハンサー 抗癌剤耐性 ChIP-seq

1. 研究開始当初の背景

様々な診療領域において、抗癌剤治療により生存期間の延長や患者の生活の質の向上が図られてきた。しかし、治療開始時に有効であった抗癌剤も治療経過とともに効果を失い、癌が感受性であったものが耐性に変化して以降の抗癌剤治療が極めて困難となる。この問題の解決のために、多くの研究者が個々の薬剤耐性担当因子を同定・解析し、その阻害薬等を開発してきた。しかし、未だに満足のいく結果は得られていない。つまり、一つの耐性因子を阻害しただけでは十分な治療効果を得られなかったのである。これは薬剤負荷により多くの機能が人体を守ろうと総合的に働くためと考えられる。また、薬剤耐性、特に獲得耐性は遺伝子の構造的変化だけで起こるものとは考えにくく、それ故、遺伝子のエピジェネティックな転写機構の変化を捉える解析が必要不可欠となる。上述のごとく薬剤耐性を獲得する過程では、単一遺伝子ではなく、複数の耐性関連遺伝子の活性化が起きている。したがって、より有効な治療法・薬剤を開発するためには、システムティックな全ゲノムにおよぶ系統的な多数の遺伝子の転写制御メカニズムを解析し、その詳細を解明しなければならない。

スーパーエンハンサー (SE) はヒストン H3K27 のアセチル化が広範囲にわたり起きているゲノム上の領域において、10~20 kb 程度の領域に多くのエンハンサー結合部位を有し、RNA polymerase II や MED1 なども結合するのがその特徴である。従来のエンハンサーとは異なり、SE は格段に強力であるばかりでなく、幹細胞や各組織の細胞系統を特徴付けるような遺伝子発現を制御しており、細胞のアイデンティティの決定や疾患に関連する遺伝子の発現制御にはたらくゲノム領域である。

口腔癌治療において極めて重要な抗癌剤耐性に関する特異的 SE はその存在の有無さえ報告されていない。本研究は、全ゲノムワイドな解析により抗癌剤耐性に特異的な SE と、その標的となる関連因子を検索・同定することで、この未だ明らかとなっていない口腔癌の新たな抗癌剤耐性の発生メカニズムを系統的に検討し、各 SE を効果的に制御する薬剤の同定と、それを応用した治療法の開発を目指すものである。

2. 研究の目的

抗癌剤耐性口腔癌細胞株、親株の各性質に特異的な SE を Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) 解析で同定する。さらに、耐性株に共通した SE と標的遺伝子を検索・同定し、抗癌剤耐性に関わるエピジェネティックな制御機構の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 独自に樹立した複数の Cetuximab (CTX) 耐性口腔癌細胞株とその親株を用いて、各々における SE を ChIP-seq 法 (BRD4・H3K27ac) で検索する。
- (2) 複数の抗癌剤耐性口腔癌細胞株に共通した SE を検索同定する。さらに、その共通した SE 領域に mapping される遺伝子を探索する。探索した遺伝子を The Cancer Genome Atlas (TCGA) にて臨床検体における発現量や 5 年生存率を統計的に解析し、標的遺伝子を絞り込む。
- (3) UCSC Genome Browser を用いて SE と標的遺伝子の位置関係を確認する。
- (4) (2), (3) にて絞り込んだ標的遺伝子の発現解析を行う。
- (5) 標的遺伝子群に対して、Gene set enrichment analysis (GSEA) 解析を行う。

4. 研究成果

(1) CTX 耐性口腔癌細胞株 (HSC-3-R・SAS-R) およびその親株 (HSC-3-P・SAS-P) における CHIP-Seq (BRD4・H3K27ac) による SE の検索・同定

CTX 耐性口腔癌細胞株は、以前報告した方法 (Uzawa *et al.*, *Sci Rep.*, 2019) と同様に独自に樹立した。BRD4 を用いた CHIP-Seq 解析では、SE は HSC-3-P で 691 領域、HSC-3-R で 156 領域存在していた。SAS-P では 80 領域、SAS-R では 88 領域存在していた。HSC-3-R のみに存在していた SE は 5 領域であり、SAS-R のみに存在していた SE は 72 領域であった。

H3K27ac を用いた SE 解析では、HSC-3-P で 1119 領域、HSC-3-R で 995 領域存在していた。SAS-P で 1055 領域、SAS-R で 1043 領域存在していた (図 1)。BRD4 では、HSC-3-R と SAS-R で共通した SE 領域は、認められなかったが、HSC-3-R と SAS-R で共通した SE 領域は、68 領域であった。そのために、H3K27ac

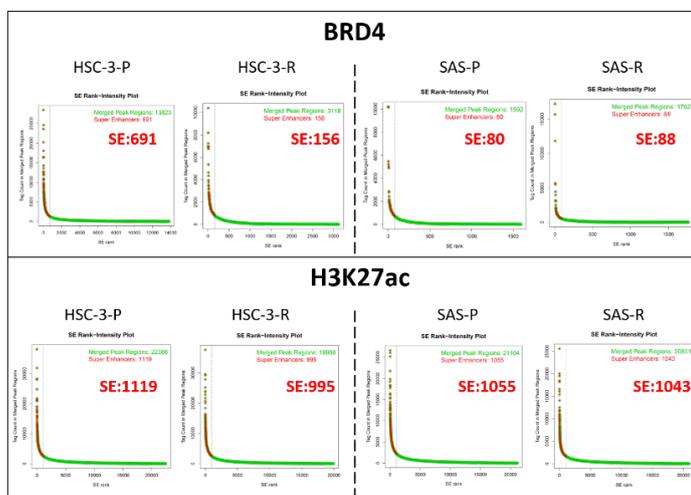


図 1. BRD4 と H3K27ac の SE plot

を用いて抽出した SE68 領域に注目してさらに解析することとした (図 2)。

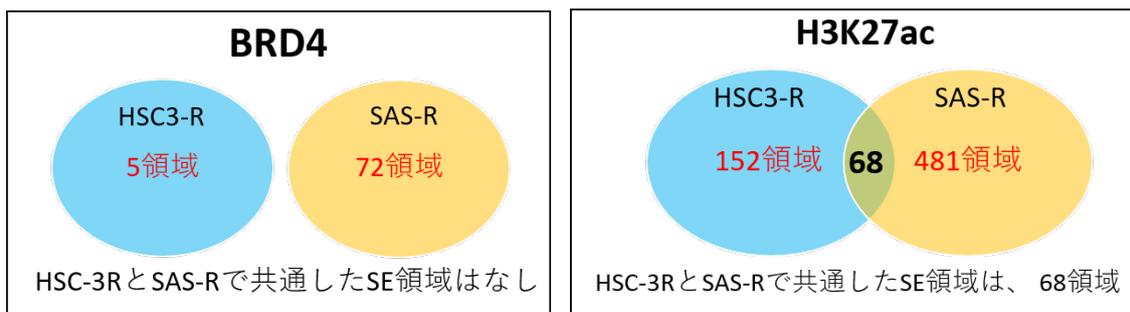


図 2. HSC-3 と SAS-R の共通 SE 領域の抽出

(2) 共通した SE 領域における標的候補の遺伝子検索

H3K27ac を用いた CHIP-Seq 法で検索した CTX 耐性口腔癌細胞株で共通した 68 領域に関連されている遺伝子を検索すると、68 領域の SE に 131 遺伝子が同定された。さらに、本研究では、131 の標的候補遺伝子に対して The Cancer Genome Atlas (TCGA) を用いて臨床検体における標的遺伝子の発現量や 5 年生存率について統計的に解析した。131 遺伝子の中で、34 遺伝子が有意に ($p < 0.05$) 口腔癌組織で発現が上昇しており、そのうち 4 遺伝子 (*CARD19*・*CENPA*・*PISD*・*TRAF2*) は 5 年生存率と有意な ($p < 0.05$) 相関を示した (図 3, 4)。

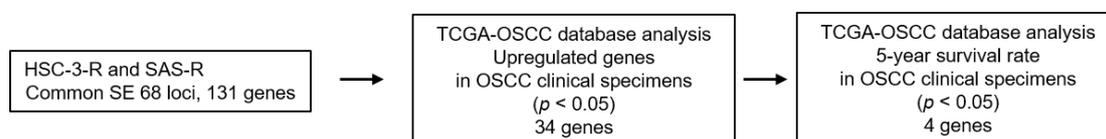


図 3. 本研究における SE 関連の標的候補遺伝子抽出の流れ

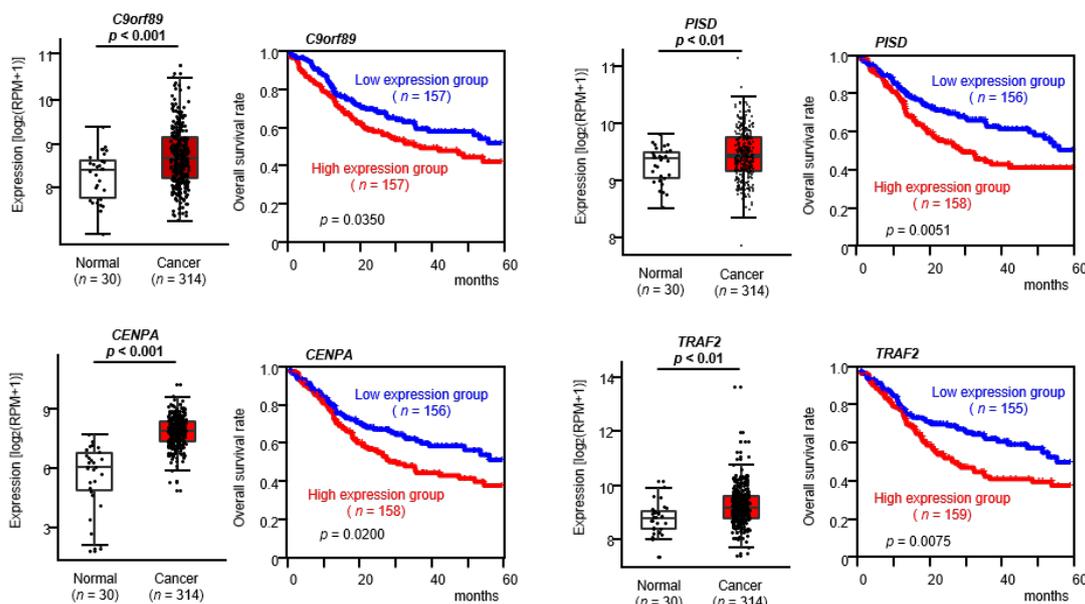


図 4. TCGA を用いた発現解析と 5 年生存率についての統計解析 (*CARD19*・*CENPA*・*PISD*・*TRAF2* の抽出)

(3) UCSC Genome Browser を用いて SE と標的遺伝子の位置関係の確認

さらに、UCSC Genome Browser を用いて SE と標的遺伝子の位置関係を確認した。UCSC Genome Browser に bigWIG ファイルを用いて H3K27ac によるシグナル (青い波形) が視覚化され、MACS アルゴリズムを用いて同定したピーク領域はオレンジ色のバーで示された。各ピークからの内側の距離が 12.5kb 以下の場合、SE を生成するために一緒に結合される。結合された領域の上位 5% は、赤いバーで SE として示している。各遺伝子座 (*C9orf89* (chr9:93,096,217-93,113,283)・*CENPA* (chr2:26,786,014-26,794,589)・*PISD* (chr22:31,618,491-31,662,564)・*TRAF2* (chr9:136,881,933-136,926)) は、緑のバーで示した。上記の 4 遺伝子 (*CARD19*・*CENPA*・*PISD*・*TRAF2*) は、SE 領域もしくはその上流に位置していた (図 5)。

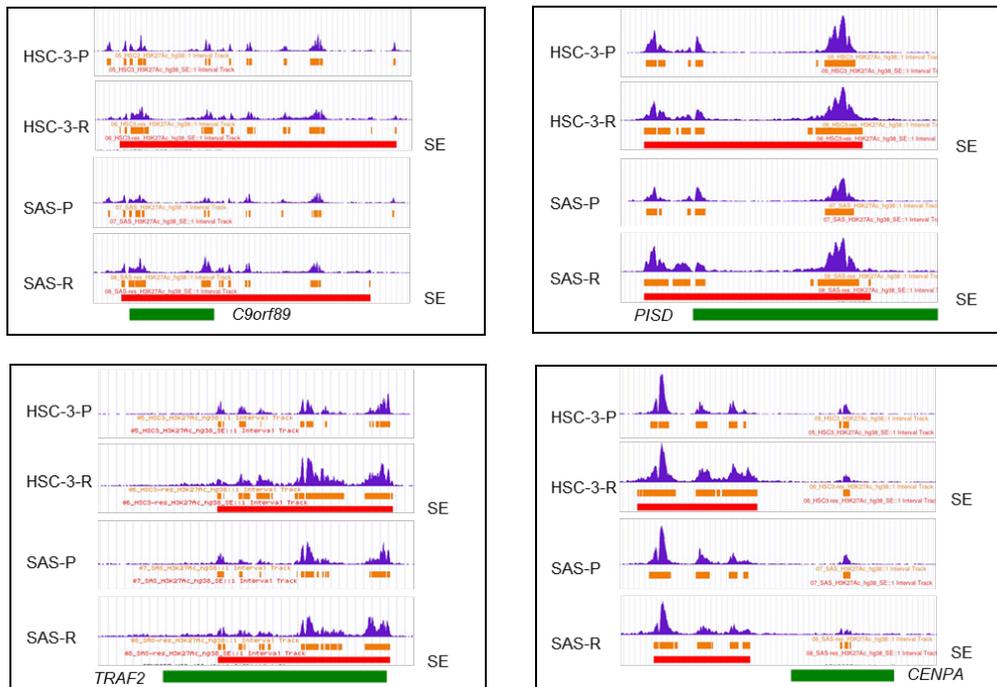


図 5. UCSC Genome Browser を用いた SE と標的遺伝子の位置関係を確認

(4) 発現解析 (qRT-PCR 法・Protein atlas)

CTX 耐性口腔癌細胞株における上記の 4 遺伝子 (CARD19・CENPA・PISD・TRAF2) の mRNA レベルでの発現を quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法で解析した。HSC-3-R および SAS-R では、それぞれの親株と比較して有意な発現の増加を認めた (図 6A)。さらに、Protein atlas において C9orf89: HPA038927 (抗体) は、癌組織で強い免疫反応性を示したが、正常組織は陰性であった。PISD: HPA031091 (抗体) は、正常組織と比較して、癌組織で強い免疫反応性を示した。CENPA: CAB008371 は、正常組織および癌組織の細胞核で強い陽性反応を示し、癌組織の細胞質では弱い陽性反応を示した。TRAF2: CAB004603 (抗体) は、癌組織の細胞質を強く染色したが、一方で正常組織では陰性染色を示した (図 6B)。

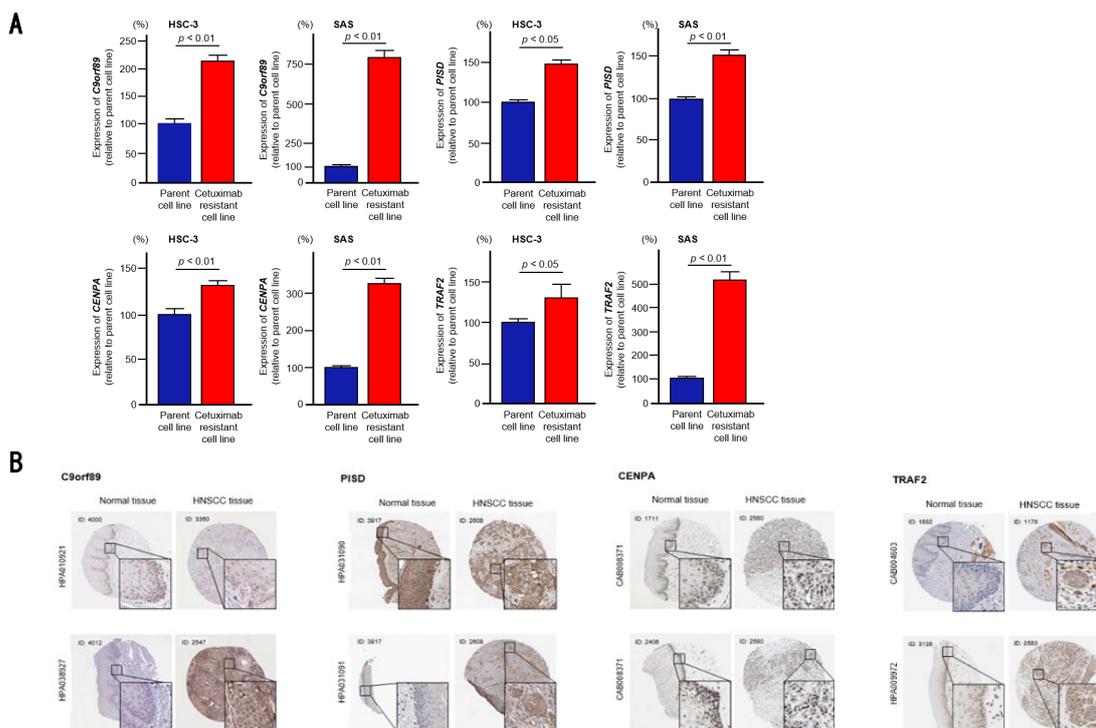


図 6. 発現解析 (A: qRT-PCR 法 B: Protein atlas)

(5) 標的遺伝子群の発現・Gene set enrichment analysis (GSEA)解析

TCGAにおける4遺伝子(C9orf89, CENPA, PISD, TRAF2)の高発現頻度・特徴について、cBioPortalを用いて解析しOncoprintに示した。口腔癌臨床検体321sampleにおいて、C9orf89が50%、CENPAが40%、PISDが33%、TRAF2が20%の割合で発現が亢進していた(図7A)。4遺伝子の相互性をBenjamini-Hochberg法を用いて解析すると、C9orf89とTRAF2の相互性が最も高く、TRAF2が高発現している場合には、CENPAも高発現している可能性が考えられた(図7B)。次に、上記4遺伝子のいずれかが高発現している群(i)と4遺伝子がいずれも高発現していない群(ii)に分けて5年生存率について統計的に解析した。iの群で有意に5年生存率が低下した(図7C)。さらに、Gene set enrichment analysis (GSEA)解析では、iの群ではcell cycleや細胞修復に関する遺伝子セットが有意に濃縮されていた(図7D)。iiの群ではfocal adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signalingやchemokine signalingの遺伝子セットが有意に濃縮されていた(図7D)。

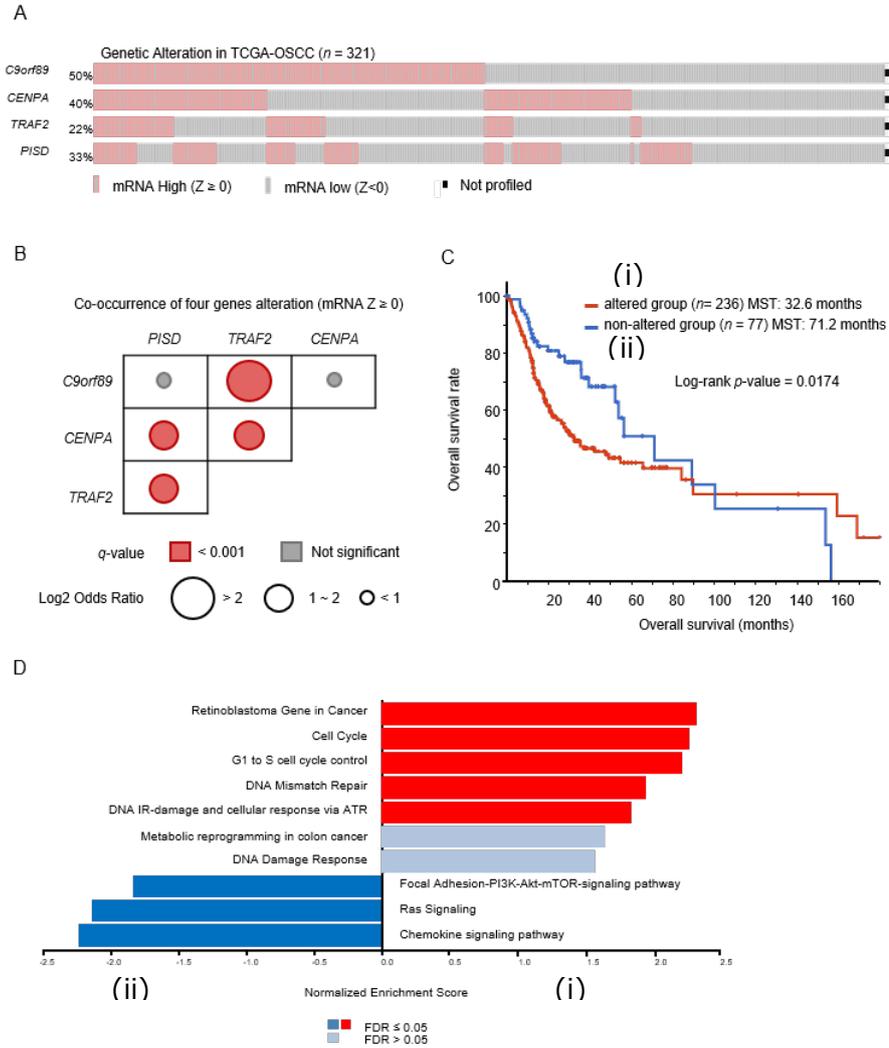


図7. 標的遺伝子群の発現・Gene set enrichment analysis (GSEA)解析

CTX 耐性株に共通した SE 領域を 68 領域、さらにその標的遺伝子を 131 個同定した。そのうち TCGA 上で有意に発現亢進していた 34 遺伝子から、4 遺伝子 (CARD19, CENPA, PISD, TRAF2) が 5 年生存率と有意な相関関係を示しており、CTX 耐性口腔癌細胞株においても有意な発現亢進を認め、CTX 耐性 SE の標的遺伝子として抽出された。GSEA 解析にて、上記標的遺伝子高発現群では cell cycle 遺伝子セットが濃縮されていた。本研究により CTX 耐性 SE の存在が明らかとなった。さらに、口腔癌患者の予後と深く関与する CTX 耐性 SE の標的遺伝子を見出した。今後、同定された標的遺伝子の CTX シグナルにおける詳細な役割を分析することが、CTX 耐性克服の新たな治療戦略になると考えられた。

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 Saito Tomoaki, Asai Shunichi, Tanaka Nozomi, Nohata Nijiro, Minemura Chikashi, Koma Ayaka, Kikkawa Naoko, Kasamatsu Atsushi, Hanazawa Toyoyuki, Uzawa Katsuhiro, Seki Naohiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Genome-Wide Super-Enhancer-Based Analysis: Identification of Prognostic Genes in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9154 ~ 9154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23169154	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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 田中希, 齋藤智昭, 岡則智, 喜田晶洋, 福嶋玲雄, 笠間洋樹, 伊豫田学, 中嶋大, 笠松厚志, 鶴澤一弘
2. 発表標題 Cetuximab耐性獲得を導く口腔癌特異的Super Enhancersの特定
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	伊豫田 学 (Iyoda Manabu) (40431746)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	中嶋 大 (Nakashima Dai) (50431747)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	

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
---------	---------