

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0184

研究課題名（和文）エピゲノムダイナミクスに基づくがん多様性の新たな理解

研究課題名（英文）Unraveling tumor phenotypic heterogeneity by single-cell epigenetic profiling

研究代表者

日野原 邦彦（Hinohara, Kunihiko）

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50549467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではARID2変異が発症時（初期）と再発時（末期）に頻発するメラノーマと乳がんを解析モデルとし、それらの分子プロファイルをシングルセル解析とインタラクトーム解析を含めマルチモーダルに解析した。その結果、ARID2変異はPBAF複合体の解体とRUNX3との結合解離を引き起こし、遺伝子発現調節領域においてARID1Aを含むBAF複合体優位の状況を作り出すことで細胞増殖能が維持されていることが示された。本研究にて確立した実験モデルを用い、今後下流の分子機構を詳細に解析することで、ARID2変異を持つがんの治療標的となる分子の発見を目指した研究を推進していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのがん種で高頻度に変異を認めるARID2変異だが、がんの悪性化進展や薬剤耐性化機構においてどのような働きを持つのか未だ不明な部分が多い。現時点でARID2の不活化変異の標的化は技術的に困難であることから、ARID2変異がもたらす下流の分子的变化の解明から標的化し得る分子を同定することが必要である。今回の研究成果として、ARID2変異を解析する実験モデルを確立し、顕著な変化を示す複数のタンパク質の情報を得ることができた。今後これらのメカニズムをさらに研究し、治療標的となる因子の発見につなげていく。

研究成果の概要（英文）：In this study, melanoma and breast cancer, in which ARID2 mutations frequently occur at the onset (early stage) and recurrence (late stage), were used as models for analysis, and their molecular profiles were analyzed multimodally, including single-cell and interactome analysis. The results showed that ARID2 mutations cause disassembly of the PBAF complex and dissociation of RUNX3 binding, resulting in a predominance of ARID1A-containing BAF complexes in the gene expression regulatory regions, which in turn maintains cell proliferative potential. Using this experimental model established in this study, we will continue to analyze the downstream molecular mechanisms in detail in order to discover molecules that can be used as therapeutic targets for ARID2 mutant cancers.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：エピゲノム ARID2 SWI/SNF 乳がん メラノーマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の生体を構成する多種多様な細胞の造出には、クロマチンの動的な制御に依存した精緻なエピゲノム制御が深く関わっている。ゆえに、時としてこの破綻は、生体の恒常性が保たれる範囲を逸脱した独自の細胞多様性を有する異形組織の形成につながり、がんなどの致死的な疾患発症の要因となり得る。

多段階発がんと呼ばれるがんの進展プロセスは、細胞に複数の遺伝子変異が蓄積することによって細胞ががん化し、転移や薬剤耐性といった能力を獲得してより悪性度を増していくというものである。1988年に Bert Vogelstein らが大腸癌の多段階発がんモデルを提唱して以来世界的に推進されたがんゲノム研究によって、このような悪性化進展に伴う遺伝子変異の蓄積は個々の細胞において別々に発生しており、異なる遺伝子変異を有する細胞が同一組織内に多数存在することがわかってきた(腫瘍内不均一性)。一方で、がん細胞の多様性はゲノムだけでなく、エピゲノムによっても極めて動的に制御されていることが明らかとなってきている。近年の飛躍的な1細胞解析技術の発展に伴い、このような形質を1細胞レベルのトランスクリプトーム情報やエピゲノム情報から捉えることが実現可能となってきた。

The Cancer Genome Atlas (TCGA) に代表される大規模ながんゲノム解析プロジェクトによって、エピゲノム制御遺伝子群のドライバー遺伝子変異が多数同定されてきている。特に、ATP 依存的にヌクレオソームのポジショニングを制御する巨大クロマチン制御因子群『SWI/SNF 複合体』は、がん全体で最も変異頻度の高いエピゲノム制御因子であり、SWI/SNF 複合体の構成因子は臨床進行度や組織型に応じた遺伝子変異パターンを呈することから、それぞれのコンテキストに依存した SWI/SNF 遺伝子変異の機能に基づいた理解が重要となる。臨床的な代表例として、メラノーマにおいては、発生の初期に ARID2 変異が発生するのに対して、トリプルネガティブ乳がん (Triple-Negative Breast Cancer : TNBC) では、タキサン系抗癌剤の治療後に耐性化・再発した患者に ARID2 変異が同定されている。しかし、ARID2 変異によってどのようなエピゲノム動態および下流のトランスクリプトーム動態の変化がもたらされ、結果としてがんの悪性形質獲得につながるのかについては未だ多くが不明である。研究が進んでいない一つの理由として、ARID2 変異を持つ細胞株の樹立が十分に行われていないことが挙げられる。例えば乳がん細胞株では、研究開始当初に市販されていた細胞株には ARID2 変異を持つものは存在していなかった。そのため、こうした変異モデルを作成・確立し、エピゲノムのダイナミクスによって形成・維持されるがんの悪性形質が、がんの転移や治療抵抗性などの悪性化進展をどのように制御しているのかを理解する必要がある。

また、米国東海岸の最先端研究施設と比べると、我が国における1細胞研究は立ち遅れている。そのため、海外機関にて培われている先端的解析技術を取り込み、国内にて実施可能な実験・解析系を拡充していくことも肝要である。

2. 研究の目的

本研究課題では、エピゲノム修飾因子の中でも特に高頻度な遺伝子変異が認められるクロマチン制御因子 SWI/SNF 複合体に着目し、SWI/SNF 構成因子の遺伝子変異がもたらす1細胞ごとの形質変化をエピゲノム・トランスクリプトームレベルにて解明することを目的とした国際共同研究を展開する。特に、「メラノーマ発生初期に認められる高頻度な ARID2 変異」および「タキサン系抗癌剤耐性・再発に進行したトリプルネガティブ乳がん患者の ARID2 変異」という、がん発症時(初期)と再発時(末期)の異なるがん病態における ARID2 変異に着目し、ARID2 変異による組織特異的(および普遍的)なエピゲノム制御システムを1細胞レベルのエピゲノム・トランスクリプトーム解析から理解することを試みる。本目的の達成に向け、日米の研究者連携により、米国共同研究者の保有する ARID2 変異がん細胞株と1細胞解析技術の提供を受ける。これらの共同研究を通じて先端的な1細胞研究の系を海外共同研究機関から取り込み、1細胞解析を含むマルチモーダル解析技術を深化させる。

3. 研究の方法

海外共同研究機関から提供を受けた乳がんとメラノーマの ARID2 変異細胞株と野生型細胞株を用いて(乳がんモデルはトリプルネガティブ型のタキサン系抗がん剤耐性細胞株) ARID2 の欠失によるエピゲノム変化とその意義を解析した。ARID2 変異細胞株に対して野生型 ARID2 を導入したレスキューモデル、野生型に対して ARID2 をノックアウトしたモデルを作成し解析を実施した。海外共同研究者の技術支援のもと、ARID2 への分子的介入前後における1細胞単位およびバルクレベルのエピゲノムとトランスクリプトームの情報と、ARID2 インタラクトームの情報を取得した。これらの統合解析を海外共同研究機関現地にて進め、エピゲノム制御機構の変化がどのようにがん細胞の表現型や悪性形質に影響を及ぼすのかを検証した。

4. 研究成果

- (1) シングルセルクローンの樹立：ARID2 変異陽性細胞株における変異細胞の不均一性の影響を排除するため、FACS でシングルセルをソーティングしてシングルセルクローンを複数株樹立した。これらの細胞株を用いて以降の解析を進めた。
- (2) 細胞増殖能の解析：ARID2 欠失変異型細胞株モデルを用いて ARID2 が細胞増殖に関与するかを検証したところ、ARID2 レスキューによってメラノーマ・薬剤耐性乳がん共に細胞増殖能が低下することを見出した。それぞれの野生型細胞株にて ARID2 をノックアウトすると、メラノーマでは細胞増殖能の亢進が認められたが、乳がん細胞では増殖能の変化は認められなかった。
- (3) ChIP-seq 解析とインタラクトーム解析：ARID2 欠失変異を持つトリプルネガティブ型抗がん剤耐性乳がん細胞株に特徴的なエピゲノム状態の理解を目的として ChIP-seq 解析を行い、ARID2 レスキューにより ARID2 の結合が回復するゲノム領域では ARID1A の結合が減弱する傾向にあることを明らかにした。次に、ARID2 変異陽性の乳がん細胞株とメラノーマ細胞株を対象とし、ARID2 のレスキュー前後のサンプルを用いて Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous protein (RIME)によるインタラクトーム解析を行なった。その結果、両細胞株において野生型 ARID2 導入による PBAF 複合体の再形成を確認した。この結果と乳がん細胞株の ChIP-seq 解析の結果から、PBAF 複合体のゲノム結合が再開すると、ARID1A を含むBAF複合体の結合がコンペティションにより減少する可能性が考えられた。つまり、抗がん剤耐性乳がん細胞では ARID2 の欠失により PBAF 複合体がなくなることで、そのエピゲノム状態が BAF 制御下へとシフトしていることが考えられた。一方、乳がん細胞とメラノーマ細胞では ARID2 インタラクトームの違いが認められ、乳がんではクロマチン構造やヒストン修飾・エピジェネティック制御などに関わる因子群、メラノーマではリボヌクレオタンパク質や核内ストレス顆粒形成に関わる因子群が結合パートナーとして濃縮していることから、異なる分子制御機構が示唆された。
- (4) scRNA-seq/scATAC-seq を含むマルチモーダル解析とその統合的理解：(1)(2)を通じて ARID2 欠失変異を持つがん細胞にて ARID2 をレスキューする実験系を確立できたと考え、乳がんの系を対象として海外共同研究者の技術支援のもと、バルクおよび 1 細胞単位のトランスクリプトーム(バルク RNA-seq および scRNA-seq)と エピゲノム (scATAC-seq) の情報を取得した。バルク RNAseq 解析と 1 細胞 RNA-seq 解析では、どちらの解析においても ARID2 のレスキューによる細胞増殖や EMT (上皮間葉転換) 関連のパスウェイに変化を認めた。1 細胞 ATAC-seq の解析では、ARID2 レスキューによりオープンとなるクロマチン領域に RUNX3 モチーフの濃縮を認めた。RUNX3 は前述の RIME 解析においても ARID2 の結合パートナーの一つとして同定されていたことから、ARID2-RUNX3 の機能的関連性が考えられた。我々が独自に取得したこれらのデータとは別に、海外共同研究者と共に乳がんの細胞株パネルを用いてシングルセルデータを取得して論文報告した (Jovanovic B, et al. *Cell Rep.* 2023)。これらのデータの突き合わせを海外共同研究機関現地に進めたところ、海外共同研究者が取得したシングルセルデータの解析から、トリプルネガティブ乳がん細胞株の中に basal 様と mesenchymal 様の二つのサブクラスターを持つものがあることがわかり、この mesenchymal クラスターを特徴づける 7 個の転写因子を同定し、うち一つは RUNX3 であった。また、これらの転写因子を強制発現させると、トリプルネガティブ乳がんに mesenchymal 様の表現型をもたらし、細胞増殖能が低下することがわかった。以上の結果から、ARID2-RUNX3 complex は、抗がん剤耐性乳がんや mesenchymal 型乳がんの増殖を制御していると考えられたが、その制御メカニズムについては今後さらなる検証が必要と考えられた。

これらの解析から、乳がんとメラノーマでは ARID2 変異のもたらす分子機序が異なることがわかり、特にトリプルネガティブ型のタキサン系抗がん剤耐性乳がんでは ARID2 欠失により PBAF と RUNX3 を含む複合体形成が阻害され、遺伝子発現調節領域において ARID1A を含む BAF 複合体優位の状況が作り出されることで細胞増殖能が維持されている可能性が示された。現在その下流における遺伝子発現変化の解析を進めるとともに、メラノーマモデルでも同様の実験を準備している。ARID2 などの欠失型の不活化変異は現時点で薬剤標的化することが難しいため、本研究で作成したモデルを解析することにより、不活化変異の下流でどのような分子メカニズムの変化が起こっているのかを明らかにし、その解析から標的化し得るターゲットを発見するアプローチが必要である。この点を含めたがんエピゲノム研究に関するレビューを研究期間中に論文として取りまとめて報告している (Kato S, et al. *Cancer Sci.* 2022)。また、これらの解析を進めることで、メラノーマと乳がんにおいて、それぞれがん発症時(初期)と再発時(末期)に頻発する ARID2 変異の時期特異性を規定する分子メカニズムに迫ることができると考えており、ARID2 を起点としたがん悪性化進展メカニズムをエピゲノムダイナミクスの観点から今後さらに包括的に解明していく予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato Shinichiro, Maeda Yuka, Sugiyama Daisuke, Watanabe Keisuke, Nishikawa Hiroyoshi, Hinohara Kunihiko	4. 巻 114
2. 論文標題 The cancer epigenome: Non cell autonomous player in tumor immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 730 ~ 740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15681	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 -

1. 著者名 Jovanovic Bojana, Temko Daniel, Stevens Laura E., Seehawer Marco, Fassl Anne, Murphy Katherine, Anand Jayati, Garza Kodie, Gulvady Anushree, Qiu Xintao, Harper Nicholas W., Daniels Veerle W., Xiao-Yun Huang, Ge Jennifer Y., Aleckovic Masa, Pyrdol Jason, Hinohara Kunihiko, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Heterogeneity and transcriptional drivers of triple-negative breast cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113564 ~ 113564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113564	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 日野原邦彦
2. 発表標題 がんの進化と脆弱性
3. 学会等名 日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日野原邦彦
2. 発表標題 がん細胞多様性のエピゲノム制御機構
3. 学会等名 第80回日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤真一郎、日野原邦彦
2. 発表標題 低分化型悪性黒色腫におけるヒストン脱メチル化酵素LSD1依存性の解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳 天羽、加藤 真一郎、日野原 邦彦、西川 博嘉
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素 G9a による腫瘍免疫制御機構の解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kunihiko Hinohara
2. 発表標題 Decoding Evolutionary Trajectories of Cancer Drug Resistance
3. 学会等名 8th Cancer Research and Drug Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日野原邦彦	4. 発行年 2023年
2. 出版社 癌と化学療法	5. 総ページ数 6
3. 書名 がんの表現型可塑性と治療抵抗性	

〔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	小嶋 泰弘 (Kojima Yasuhiro) (00881731)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	
研究分担者	加藤 真一郎 (Kato Shinichiro) (40751417)	名古屋大学・医学系研究科・助教 (13901)	

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