

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02458

研究課題名(和文) SETD5の膵臓癌における機能

研究課題名(英文) Function of SETD5 in pancreatic cancer

研究代表者

中山 啓子(Nakayama, Keiko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60294972

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)：本研究計画の目的は、SETD5の発現量の増加によるMEK阻害薬耐性獲得機構の解明であった。しかし、MEK阻害薬によるSETD5の増加を認めず、当初計画から大きく計画変更が必要となった。しかし、SETD5の欠失細胞を作製し、*in vitro*で薬剤に対する応答性、*in vivo*での増殖能を検討した結果、いずれも有意な差を認めることができた。*In vitro*培養条件下でのTranscriptome解析では、これらの現象を説明できる遺伝子を見出すことはできなかったが、今後、MEK阻害薬処理をした細胞や、形成された腫瘍を探索することで、SETD5が腫瘍増殖に与える分子機構を明らかにしたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MEK阻害薬によるSETD5の増加を認めなかったが、SETD5の欠失細胞を作製し、*in vitro*で薬剤に対する応答性、*in vivo*での増殖能を検討した結果、いずれも有意な差を認めることができた。しかしながら、*In vitro*培養条件下でのTranscriptome解析では、これらの現象を説明できる遺伝子を見出すことはできず、この増殖抑制のメカニズムの理解には、さらなる条件検討が必要であると考えられる。今後、MEK阻害薬処理をした細胞や、形成された腫瘍を探索することで、SETD5が腫瘍増殖に与える分子機構を明らかにすることで腫瘍増殖の新たな分子機構の理解につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research plan was to elucidate the mechanism of acquiring resistance to MEK inhibitors by increasing the expression level of SETD5. However, the study plan had to be drastically changed from the original plan because SETD5 was not increased by MEK inhibitors. However, we generated SETD5-deficient cells and examined their response to drugs *in vitro* and their proliferative ability *in vivo*, and found significant differences in both. We plan to elucidate the molecular mechanism by which SETD5 affects tumor growth in the future by exploring MEK inhibitor-treated cells and tumors that have formed.

研究分野：分子生物学

キーワード：SETD5 抗癌剤 細胞増殖 エピゲノム 膵臓癌

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、RAS-MAPK シグナルによる SETD5 経路制御のメカニズムの解明とその結果として起こるがんの進展の分子機構を明らかとすることを目的として研究を開始した。SETD5 は、自閉症スペクトラム症の原因遺伝子として報告されている一方で、膵臓がんの悪化因子としての側面も持っている。そこで SETD5 のがんの進展に関わる機能を理解することが本研究の「問い」である。

難治がんである膵臓がんの克服は、現在、我が国のがん医療の最重要課題である。膵臓がんの多くでは癌遺伝子 RAS の活性化変異がドライバー変異として知られており、RAS やその下流のシグナル分子を標的とした治療法の開発が試みられている。RAS の下流分子である MEK の阻害薬もその一つであるが、長期治療により耐性を獲得することが治療上の問題である。今回私たちが注目している SETD5 は、MEK 阻害薬により発現上昇し、耐性獲得に寄与していることが報告された<sup>1)</sup>。阻害薬耐性獲得時の SETD5 の発現上昇機構とその機能には不明な点が多く残されており、その解明は抗癌剤耐性獲得の理解に必要不可欠と考えられる。

SETD5 は自閉症スペクトラム症の関連遺伝子で、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 などのクロマチン制御因子のアダプター分子として機能し、エピゲノムの調節を介して転写を制御する。私たちは SETD5 ヘテロ変異マウスが実際に自閉症スペクトラム症様の表現型を示すことを報告した。この研究で、SETD5 ヘテロマウスの神経細胞では、rDNA のプロモーター領域のヒストンアセチル化修飾 H4K16ac が増加し、H4K16ac に結合する転写抑制因子 Tip5 によって rDNA の転写量が減少、効果的な翻訳の低下、特にサイクリン D1 の翻訳量が減少することを明らかにした<sup>2)</sup>。このことは神経細胞で SETD5 がタンパク質合成の制御、特に特定のタンパク質の翻訳を調節して細胞増殖を制御していることを示している。

このように神経系での解析により SETD5 が細胞増殖制御に貢献していることが明らかとなったので、腫瘍細胞における SETD5 の制御や機能についてさらに詳細な解析を行い、がん、特に RAS が活性化している膵臓がん細胞のがん進展に対する分子機構を明らかにすることによって、難治がんである膵臓がんの治療戦略の一端を開くことができると期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、RAS 活性化を長期に阻害した時に認められる SETD5 活性化メカニズムの理解と、その結果として認められるがんの進展の分子機構を明らかにすることを目的とした。私たちは、SETD5 ヘテロマウスの神経細胞の解析において、細胞増殖関連タンパク質の中で、サイクリン D1 だけが翻訳効率が非常に低下していること、すなわち SETD5 発現抑制状態では、ある特定の遺伝子が選択的に翻訳抑制されることを発見した。これは SETD5 の発現が上昇する場合には、選択的な翻訳促進によって細胞増殖能を亢進させる新規分子メカニズムの可能性を示唆している。

そこで、腫瘍細胞における SETD5 の機能解析を行うことを計画した。前述したように SETD5 は膵臓がん細胞における MEK 阻害時の抵抗性獲得に関与していることが報告されたが、その詳細な分子メカニズムは不明である。RAS-MAPK シグナルは一般的に細胞増殖を促進する側に制御するが、そのシグナル阻害環境下では、がん細胞は別経路で細胞増殖関連タンパク質を発現させる必要がある。本申請課題は、MEK 阻害による SETD5 の発現制御に加えて、私たちが神経細胞で見出した SETD5 による細胞増殖制御機構についてがん細胞での機能を明らかにすることで、SETD5 を介した抗癌剤耐性獲得機構を理解しようとする独自性の高い研究を目指した。さらに SETD5 による遺伝子特異的な翻訳制御機構の理解は、生物学的に非常に興味深く、その分子メカニズムを明らかにすることから膵臓がんの薬剤耐性メカニズムの理解につながれば、臨床医学としても非常に有意義な研究である。本研究課題は、主に膵臓がん細胞を用い、そこで得られた結果をマウスモデル・臨床検体で確認することを計画した。また、膵臓がん得られた知見は、増殖因子依存的細胞増殖を示す肺がん由来細胞や、核内受容体依存的な乳がん細胞を用いて、RAS-SETD5 経路の膵臓がんにおける特異性や様々な癌への汎用性を記述する比較研究への発展性を持つものであり、そのような解析の中から見出される細胞増殖の調節分子が創薬の標的となる可能性の検討も期待された。

- 1) Wang, Z., et al. SETD5-Coordinated Chromatin Reprogramming Regulates Adaptive Resistance to Targeted Pancreatic Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 37: 834 (2020).
- 2) Nakagawa, T., et al. The Autism-Related Protein SETD5 Controls Neural Cell Proliferation through Epigenetic Regulation of rDNA Expression. *iScience*, 23: 101030 (2020)

## 3. 研究の方法

- (1) 膵臓がん細胞を、長期間、MEK inhibitor である Trametinib 処理を行うことで、Trametinib 耐性ヒト膵臓がん細胞を取得する。Cancer Cell (2020) で、報告された MEK inhibitor に耐性を獲得した細胞における SETD5 の発現上昇の確認を行う。

- (2) マウス膵臓がん細胞株 AK4.4 を用いて *Setd5* 欠失細胞を樹立する。MEK inhibitor に対する耐性獲得に *Setd5* の上昇が必須であるならば、*Setd5* 欠失 AK4.4 細胞は、MEK inhibitor に対して感受性を獲得することが予想される。
- (3) *Setd5* は、クロマチンリモデリング因子であり、ゲノム上で転写を制御していることが予想される。そこで、*Setd5* 欠失 AK4.4 細胞のトランスクリプトーム (RNA-sequence) を行い、膵臓癌細胞において *Setd5* が制御している遺伝子の網羅的解析を行う。
- (4) *Setd5* 欠失 AK4.4 細胞を同種マウスに移植することで、生体内で腫瘍細胞の増殖を検討する。さらに腫瘍を摘出し HE 染色で、腫瘍細胞の形態を比較する。

#### 4. 研究成果

##### (1) MEK inhibitor 耐性獲得と SETD5 発現上昇の再現性確認

マウス膵臓がん由来の RAS 活性化型変異細胞 (KPC・AK4.4) を用いて、MEK 阻害薬または HDAC3 阻害薬を添加し 3 日から 12 日間培養した。形態の変化や増殖の低下が観察されたが SETD5 タンパク質蓄積を誘導することができなかった (図 1 左, 左 3 レーン)。これまでの報告とは実験条件が異なっているが、一般的に RAS の変異により増殖が活性化している腫瘍において MEK 阻害薬抵抗性獲得に、SETD5 の発現量の増加は貢献していないと結論付けた。

##### (2) マウス膵臓がん細胞株 AK4.4 の *Setd5* 欠失細胞の樹立と MEK inhibitor 耐性への影響

我々は、神経細胞で、SETD5 は細胞増殖に関わる分子の翻訳を制御していることを見出し

ている。そこで RAS 活性化型変異細胞においても SETD5 が増殖や薬剤耐性に対する機能を有するかを調べることとした。そこで CRISPR-Cas9 システムを用いて、SETD5 を持たない RAS 活性化型変異細胞 (AK4.4-SETD5del, #73 及び #75 クローン) を作製した。In vitro の培養系では、AK4.4-SETD5del 細胞は、野生型 AK4.4 に対して明らかな増殖の違いが見られなかった。しかし、MEK 阻害薬 (Trametinib 20nM) 投与による増殖抑制は、WT に比べて有意に強く認められた。すなわち、SETD5 が発現していることは、Trametinib による増殖抑制に対して抵抗性を持つことと結論した (図 1 右)。

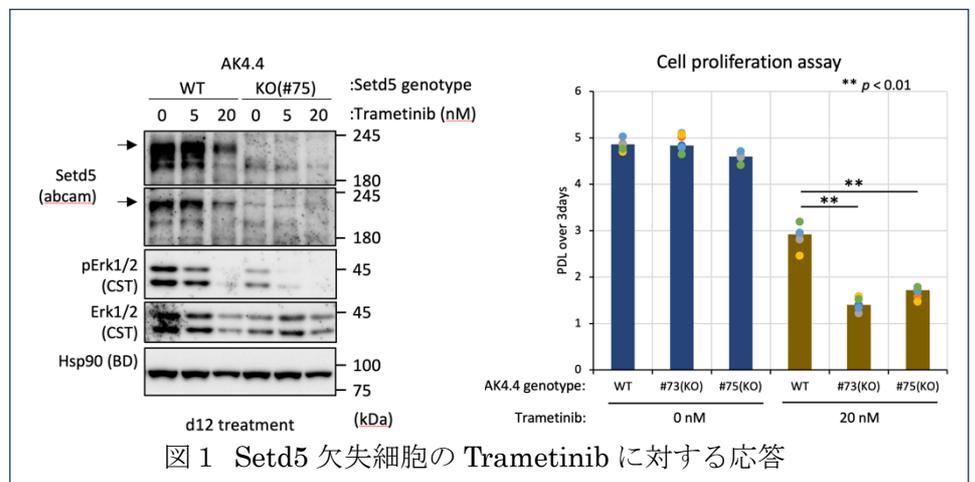


図 1 *Setd5* 欠失細胞の Trametinib に対する応答

しかし、MEK 阻害薬 (Trametinib 20nM) 投与による増殖抑制は、WT に比べて有意に強く認められた。すなわち、SETD5 が発現していることは、Trametinib による増殖抑制に対して抵抗性を持つことと結論した (図 1 右)。

##### (3) AK4.4-SETD5del のトランスクリプトーム解析

*Setd5* は、クロマチンリモデリング因子である。そこで、Trametinib による増殖抑制に抵抗性を獲得する分子の転写を制御していることを予想し、*Setd5* 欠失 AK4.4 細胞 (クローン番号 #73, #75) のトランスクリプトーム (RNA-sequence) を行った (図 2)。

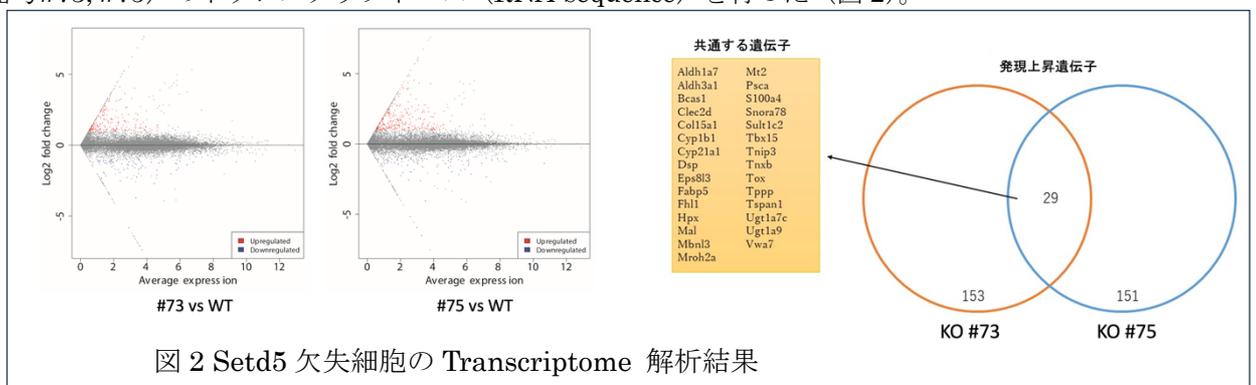


図 2 *Setd5* 欠失細胞の Transcriptome 解析結果

RNA-sequence の結果、*Setd5* を欠失する 2 種類の AK4.4 細胞いずれでも上昇している遺伝子は、29 個であった (図 2)。また、いずれのクローンでも上昇または減少している遺伝子について、定量的 RT-PCR で検証したところ、RNA sequence の結果が再現された (図 3)。このことから、用いた細胞での Transcriptome を得ることができていると考えた。

しかしながら、Setd5 を欠失によって、発現が上昇している遺伝子の GO 解析から、薬剤耐性獲得に関わる遺伝子を見出すことができなかった。

(4) AK4.4-SETD5del の同種マウスへの移植

In vitro でのトランスクリプトーム解析によって、AK4.4-SETD5del に薬剤耐性に関わる遺伝子を見出すことができなかったことから、in vivo で腫瘍形成・増殖能に対して Setd5 の欠失の効果を判定することとした。AK4.4 と遺伝的に同系統である FVB/N マウスに AK4.4 野生型 (WT) と AK4.4-SETD5del

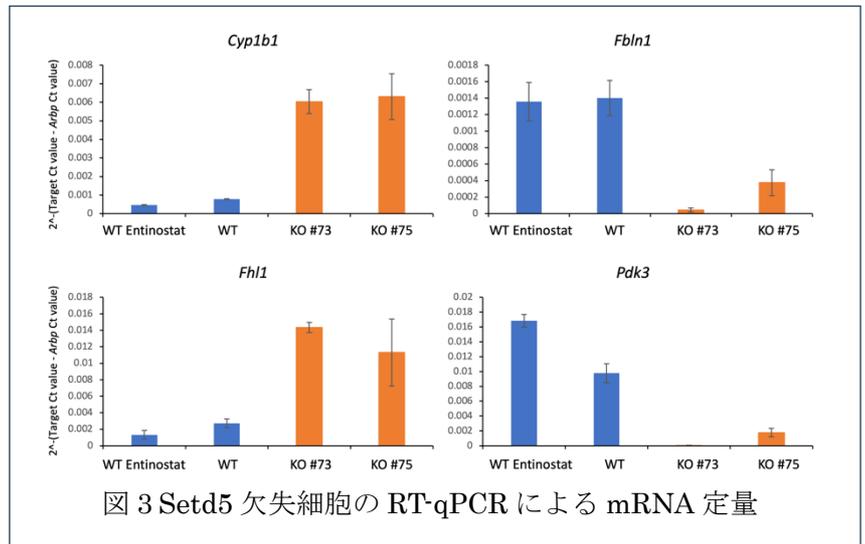


図 3 Setd5 欠失細胞の RT-qPCR による mRNA 定量

(KO) を移植し、その腫瘍形成能を比較した。さらに腫瘍を摘出し HE 染色で、腫瘍細胞の形態を比較した。

その結果、Setd5 欠失 AK4.4 細胞より発生した腫瘍は、野生型細胞より発生した腫瘍に比べて、著しく腫瘍増大率が低下していた (図 4)。HE 染色で腫瘍組織構築を観察したところ、野生型および AK4.4-SETD5del いずれも分化した腺管状構造を認め、明らかな差は認められなかった。

以上のことから、SETD5 は、組織の分化などの制御というよりは、単に増殖の制御を行っていること、このような増殖の制御は in vitro の解析では認められず、同種移植したマウス個体内でのみ認められたことから、3次元の増殖や免疫反応によって制御される細胞増殖に SETD5 は強く関わっていると考えられた。

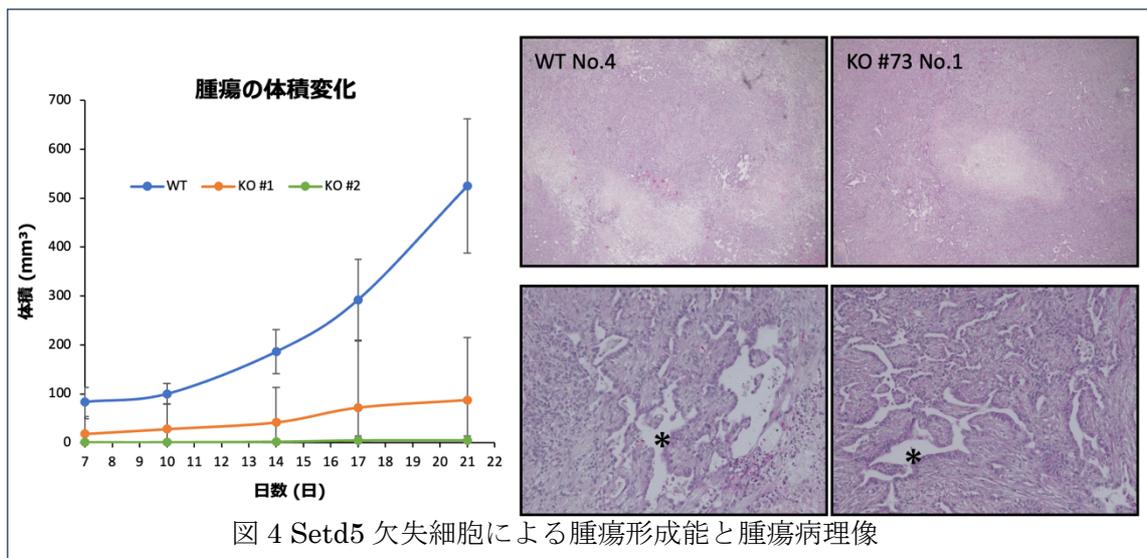


図 4 Setd5 欠失細胞による腫瘍形成能と腫瘍病理像

本研究計画の目的は、SETD5 の発現量の増加による MEK 阻害薬耐性獲得機構の解明であった。しかし、MEK 阻害薬により SETD5 の増加を認めることができず、当初計画から大きく計画変更が必要となった。しかし、SETD5 の欠失細胞を作製し、in vitro で薬剤に対する応答性、in vivo での増殖能を検討した結果、いずれも有意な差を認めることができた。In vitro 培養条件下での Transcriptome 解析では、これらの現象を説明できる遺伝子を見出すことはできなかったが、今後、MEK 阻害薬処理をした細胞や、形成された腫瘍を探索することで、SETD5 が腫瘍増殖に与える分子機構を明らかにしたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 Aihara Yu, Shirota Matsuyuki, Kikuchi Atsuo, Katata Yu, Abe Yu, Niihori Tetsuya, Funayama Ryo, Nakayama Keiko, Aoki Yoko, Kure Shigeo	4. 巻 68
2. 論文標題 A novel variant in the transmembrane 4 domain of ANO3 identified in a two-year-old girl with developmental delay and tremor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 51-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01082-5	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 Iemura Kenji, Anzawa Hayato, Funayama Ryo, Iwakami Runa, Nakayama Keiko, Kinoshita Kengo, Tanaka Kozo	4. 巻 113
2. 論文標題 High levels of chromosomal instability facilitate the tumor growth and sphere formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2727-2737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15457	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 Yu Zhiqian, Ueno Kazuko, Funayama Ryo, Sakai Mai, Nariyai Naoki, Kojima Kaname, Kikuchi Yoshie, Li Xue, Ono Chiaki, Kanatani Junpei, Ono Jiro, Iwamoto Kazuya, Hashimoto Kenji, Kinoshita Kengo, Nakayama Keiko, Nagasaki Masao, Tomita Hiroaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Sex-Specific Differences in the Transcriptome of the Human Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 1083-1098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-022-03109-6	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 Kanno Miyako, Suzuki Mitsuyoshi, Tanikawa Ken, Numakura Chikahiko, Matsuzawa Shu-ichi, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko, Matsubara Yoichi, Makino Satoshi, Tamiya Gen, Nakano Satoshi, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Nakayama Keiko, Mitsui Tetsuo, Hayasaka Kiyoshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Heterozygous calcyclin-binding protein/Siah1-interacting protein (CACYPB/SIP) gene pathogenic variant linked to a dominant family with paucity of interlobular bile duct	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 393-397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01017-0	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 Nakagawa Tadashi、Hattori Satoko、Hosoi Toru、Nakayama Keiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Neurobehavioral characteristics of mice with SETD5 mutations as models of IDD23 and KBG syndromes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2022.1022339	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 Nakagawa Tadashi、Morohoshi Akane、Nagasawa Yuko、Nakagawa Makiko、Hosogane Masaki、Noda Yasuhiro、Hosoi Toru、Nakayama Keiko	4. 巻 38
2. 論文標題 SPT16 ubiquitylation by DCAF14-CRL4 regulates FACT binding to histones	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110541~110541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110541	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 Kanno Miyako、Suzuki Mitsuyoshi、Tanikawa Ken、Numakura Chikahiko、Matsuzawa Shu-ichi、Niihori Tetsuya、Aoki Yoko、Matsubara Yoichi、Makino Satoshi、Tamiya Gen、Nakano Satoshi、Funayama Ryo、Shirota Matsuyuki、Nakayama Keiko、Mitsui Tetsuo、Hayasaka Kiyoshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Heterozygous calcyclin-binding protein/Siah1-interacting protein (CACYPB/SIP) gene pathogenic variant linked to a dominant family with paucity of interlobular bile duct	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 393~397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01017-0	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 Niihori Tetsuya、Tanoshima Reo、Sasahara Yoji、Sato Atsushi、Irie Masahiro、Saito-Nanjo Yuka、Funayama Ryo、Shirota Matsuyuki、Abe Taiki、Okuyama Yuko、Ishii Naoto、Nakayama Keiko、Kure Shigeo、Imaizumi Masue、Aoki Yoko	4. 巻 6
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity in individuals with MECOM variants 2 families	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 5257 ~ 5261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003812	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 Kanno Miyako, Suzuki Mitsuyoshi, Tanikawa Ken, Numakura Chikahiko, Matsuzawa Shu-ichi, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko, Matsubara Yoichi, Makino Satoshi, Tamiya Gen, Nakano Satoshi, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Nakayama Keiko, Mitsui Tetsuo, Hayasaka Kiyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Heterozygous calcyclin-binding protein/Siah1-interacting protein (CACYP/SIP) gene pathogenic variant linked to a dominant family with paucity of interlobular bile duct	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01017-0	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 Niihori Tetsuya, Tanoshima Reo, Sasahara Yoji, Sato Atsushi, Irie Masahiro, Saito-Nanjo Yuka, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Abe Taiki, Okuyama Yuko, Ishii Naoto, Nakayama Keiko, Kure Shigeo, Imaizumi Masue, Aoki Yoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity in individuals with <i>MECOM</i> variants in 2 families	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003812	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 Nakagawa Tadashi, Morohoshi Akane, Nagasawa Yuko, Nakagawa Makiko, Hosogane Masaki, Noda Yasuhiro, Hosoi Toru, Nakayama Keiko	4. 巻 38
2. 論文標題 SPT16 ubiquitylation by DCAF14-CRL4 regulates FACT binding to histones	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110541 ~ 110541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110541	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 舟山亮, 望月保志, 城田松之, 菊川柚奈, 大平優丈, 中山啓子
2. 発表標題 マイクロエクソンの選択的スプライシングは大腸がん細胞の転移を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学 細胞増殖制御分野  
<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/>  
細胞増殖制御分野HP  
<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/>

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	舟山 亮 (Funayama Ryo) (20452295)	東北大学・医学系研究科・准教授  (11301)	
研究分担者	細金 正樹 (Hosogane Masaki) (30734347)	東北大学・医学系研究科・助教  (11301)	
研究分担者	中川 直 (Nakagawa Tadashi) (30707013)	山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・講師  (25503)	

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