

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09367

研究課題名（和文）尿路上皮癌治療耐性に関与するスーパー-Enhancerの同定とマスター遺伝子の探索

研究課題名（英文）Identification of super-enhancer and master genes involved in treatment resistance of urothelial cancer

研究代表者

加藤 繭子（KATO, MAYUKO）

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：80733857

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）：進行した尿路上皮癌に対しては、シスプラチン含む複数の抗癌剤を組み合わせる多剤併用化学療法が行われている。しかしながら、癌細胞は抗癌剤に対して治療抵抗性を獲得する。癌細胞が、治療抵抗性を獲得する分子機構は未だ不明である。抗癌剤暴露時に生じるエピジェネティックな変化をChIP-seq.およびATAC-seq.により解析した。シスプラチン暴露時の極初期に、AP-1/Fra-1の転写因子がオープンクロマチン領域に結合し、標的となる遺伝子群の発現を制御している事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根治的切除不能、もしくは転移のある尿路上皮癌（腎盂・尿管癌、膀胱癌）に対しては、複数の抗癌剤を組み合わせる多剤併用化学療法が行われる。しかしながら、治療過程で尿路上皮癌細胞はこれら抗癌剤に対して治療抵抗性を獲得する。治療抵抗性を獲得した癌細胞に対する有効な治療法は未だ存在しない。癌細胞が抗癌剤耐性を獲得する分子機構の解明は、治療抵抗性に至った患者に対する新規治療法開発に向けて重要な課題である。

研究成果の概要（英文）：Multidrug chemotherapy, which combines multiple anticancer drugs including cisplatin, is used for advanced urothelial cancer. Nevertheless, a significant proportion of patients experience rapidly developed chemoresistance, leading to treatment ineffectiveness. The molecular mechanism by which cancer cells acquire treatment resistance is still unknown. Epigenetic changes that occur upon exposure to anticancer drugs were analyzed using ChIP-seq. and ATAC-seq. It has become clear that AP-1/Fra-1 transcription factors bind to open chromatin regions and regulate the expression of target genes at the very early stage of cisplatin exposure.

研究分野：マイクロRNA

キーワード：尿路上皮癌 治療抵抗性 シスプラチン ATAC sequence マイクロRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の日常診療において、治療開始時には効果が得られた薬剤が、治療経過と共に効果を失い、癌細胞が治療抵抗性を獲得する事にしばしば遭遇する。現在、様々な分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬が登場し、患者の予後を改善しているが、その恩恵の少ない癌種も未だ存在する。尿路上皮癌（腎盂癌・尿管癌・膀胱癌）は、癌死亡者数の5%を占める難治性癌である。外科的治療で根治できない、切除不能局所進行または転移性尿路上皮癌の治療として、複数の抗癌剤を組み合わせる多剤併用化学療法が行われている。このような患者に対しては、GC療法（ゲムシタピン塩酸塩とシスプラチン）が標準治療となっている。初回の治療に対して、約7割の患者が反応するが、治療経過中に治療抵抗性に至る患者も少なくない。また、初回の治療に反応しない患者も少なからず存在する。治療抵抗性を獲得した癌細胞に対する有効な治療法は未だ存在しない。治療抵抗性を生じる分子機序を解明することは、新たに効果的な尿路上皮癌治療法を開発する上で重要である。

(2) ゲノム上に存在する機能性 RNA 遺伝子の発現は、クロマチンの状態と転写因子によって厳密に制御されている。最近のゲノム科学の新しい概念として、細胞の運命を決定する極めて重要な場面において、ゲノム上で「スーパーエンハンサー」と定義される強力な転写制御領域が形成され、細胞の運命を決定する機能性分子を発現誘導するという概念が提唱された。スーパーエンハンサーは、ヒストン H3K27 のアセチル化が広範囲（10~20kb）に亘って起こっているゲノム上の領域であり、この領域に結合する転写因子や様々なコファクターと共に、転写活性の高い大きな複合体を形成している。スーパーエンハンサーは、従来のエンハンサーより遥かに転写活性化が高い事が知られている。癌細胞が薬剤に暴露された際に、癌細胞は自らの生存を賭けて、スーパーエンハンサーを形成し、薬剤耐性に関与する機能性 RNA 分子を強力に発現すると考えられる。

### 2. 研究の目的

尿路上皮癌・抗癌剤治療に対して治療抵抗性を獲得する際に形成されるオープンクロマチン領域を検出し、その領域から転写される機能性 RNA 遺伝子の探索をおこなう事を目的とした。

### 3. 研究の方法

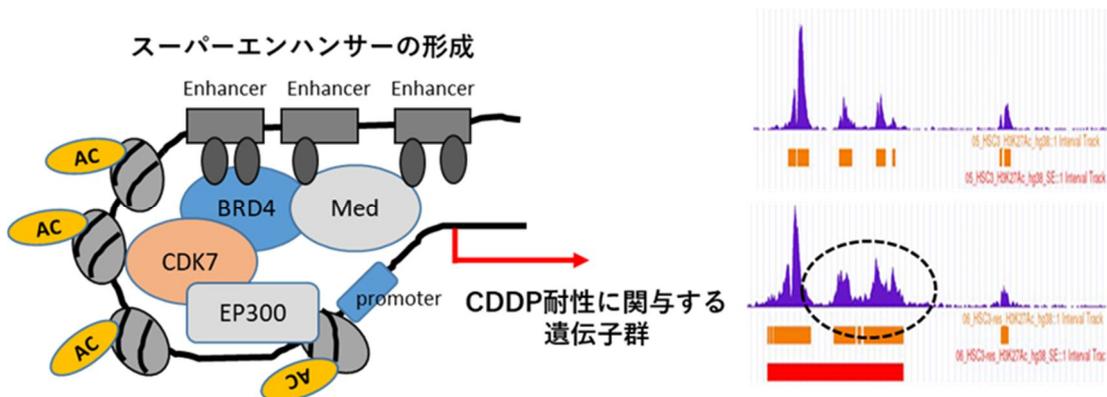
(1) 尿路上皮癌細胞に対する抗癌剤暴露で形成されるスーパーエンハンサーの同定  
膀胱癌細胞株（T24）に対して、抗癌剤（シスプラチン）を暴露させ、時間経過に伴い形成されるスーパーエンハンサー領域を検出する。スーパーエンハンサーの検出は、免疫沈降法（Chromatin immunoprecipitation: ChIP）と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-sequence により行う。ChIP に用いる抗体として、H3K27AC および BRD4 を用いる。

(2) 尿路上皮癌細胞に対する抗癌剤暴露で形成されるオープンクロマチン領域の同定  
膀胱癌細胞株（T24）に対して、抗癌剤（シスプラチン）を暴露させ、初期に誘発されるオープンクロマチン領域を Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) -sequence により解析する。また、オープンクロマチン領域の DNA 配列に対するモチーフ解析から、この領域に結合する転写因子の予測を行う。

#### 4. 研究成果

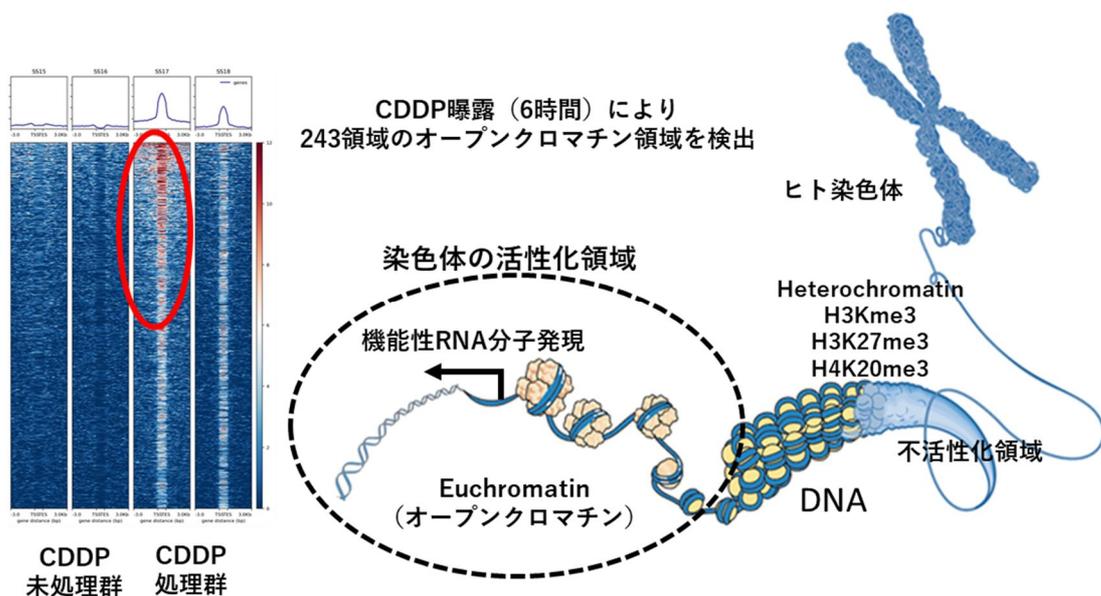
##### (1) 尿路上皮癌細胞に対する抗癌剤暴露で形成されるスーパーエンハンサーの同定

膀胱癌細胞株 (T24) にシスプラチン (5  $\mu\text{mol}$ ) を曝露させ、6 時間後に形成されるスーパーエンハンサー領域を histone H3 lysine 27 acetylation (H3K27ac) 抗体を用いた chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) により解析した。シスプラチン未処理細胞と比べ、64 カ所の染色体領域にスーパーエンハンサーが形成されている事が示された。更に、これらの領域に存在する機能性 RNA 分子を探索した結果、131 種の機能性 RNA 分子の存在が明らかとなった。この中には、多数のマイクロ RNA が存在していた。



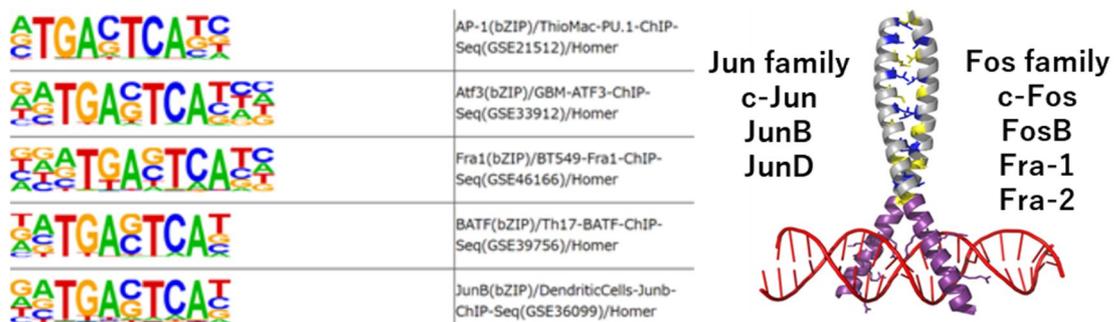
##### (2) 尿路上皮癌細胞に対する抗癌剤暴露で形成されるオープンクロマチン領域の同定

膀胱癌細胞株 (T24) にシスプラチン (5  $\mu\text{mol}$ ) を曝露させ、6 時間後に形成されるオープンクロマチン領域を ATAC-sequence により解析した。シスプラチンを曝露した細胞では、243 カ所のオープンクロマチン領域が検出された。現在、この領域に存在する機能性 RNA 分子について、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いた解析を行っている。



(3) シスプラチン暴露時に形成されるオープンクロマチン領域に結合する転写因子の探索  
 モチーフ解析により、オープンクロマチン上の転写調節因子結合部位を推定する事が可能である。また、転写調節因子の結合部位近傍にある遺伝子を抽出し、目的の転写調節因子によって転写調節を受ける遺伝子群を網羅的に探索する事も可能である。

シスプラチン曝露により形成されたオープンクロマチン領域に結合する転写因子として Fra-1 (FOS-like antigen 1)および JunB( JunB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit) が探索された。AP-1 (activator protein 1) は、c-Fos や c-Jun ファミリーに属するタンパク質でヘテロ 2 量体を構成している転写因子である。AP-1 は、細胞の増殖・発生・癌化などに関する遺伝子の発現に関与する転写制御因子である事が知られている。転写因子 (AP-1) により発現誘導される機能性 RNA 遺伝子がどのようにシスプラチン耐性に関与するか、現在検討を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Chikashi Minemura, Shunichi Asai, Ayaka Koma, Naoko Kikkawa, Mayuko Kato, Atsushi Kasamatsu, Katsuhiko Uzawa, Toyoyuki Hanazawa, Naohiko Seki	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of Antitumor miR-30e-5p Controlled Genes; Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes(Basel)	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes13071225.	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 Shunichi Asai, Yusuke Goto, Kengo Tanigawa, Yuya Tomioka, Mayuko Kato, Keiko Mizuno, Shinichi Sakamoto, Naohiko Seki	4. 巻 -
2. 論文標題 MiR-15b-5p inhibits castration-resistant growth of prostate cancer cells by targeting the muscarinic cholinergic receptor CHRM3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letter	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） 10.1002/1873-3468.14598.	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 Shunichi Asai, Ayaka Koma, Nijiro Nohata, Takashi Kinoshita, Naoko Kikkawa, Mayuko Kato, Chikashi Minemura, Katsuhiko Uzawa, Toyoyuki Hanazawa, Naohiko Seki	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of miR-1/miR-133 clustered miRNAs: PFN2 facilitates malignant phenotypes in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hagihara Yoko, Tomioka Yuya, Suetsugu Takayuki, Shinmura Masahiro, Misono Shunsuke, Goto Yusuke, Kikkawa Naoko, Kato Mayuko, Inoue Hiromasa, Mizuno Keiko, Seki Naohiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of Tumor-Suppressive miR-139-3p-Regulated Genes: TRIP13 as a Therapeutic Target in Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5571 ~ 5571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15235571	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 Mitsueda Reiko, Toda Hiroko, Shinden Yoshiaki, Fukuda Kosuke, Yasudome Ryutarō, Kato Mayuko, Kikkawa Naoko, Ohtsuka Takao, Nakajo Akihiro, Seki Naohiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Oncogenic Targets Regulated by Tumor-Suppressive miR-30c-1-3p and miR-30c-2-3p: TRIP13 Facilitates Cancer Cell Aggressiveness in Breast Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4189 ~ 4189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15164189	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 Fukuda Kosuke, Seki Naohiko, Yasudome Ryutarō, Mitsueda Reiko, Asai Shunichi, Kato Mayuko, Idichi Tetsuya, Kurahara Hiroshi, Ohtsuka Takao	4. 巻 14
2. 論文標題 Coronin 1C, Regulated by Multiple microRNAs, Facilitates Cancer Cell Aggressiveness in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 995 ~ 995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14050995	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0件

〔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	五島 悠介 (GOTO YUSUKE) (00710576)	千葉大学・大学院医学研究院・助教  (12501)	
研究分担者	市川 智彦 (ICHIKAWA TOMOHIKO) (20241953)	千葉大学・大学院医学研究院・教授  (12501)	
研究分担者	関 直彦 (SEKI NAOHIKO) (50345013)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授  (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
---------	---------