

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17081

研究課題名(和文)クロマチンアクセシビリティ解析による口腔癌放射線耐性因子の同定と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of radiation resistance factor in oral cancer by chromatin accessibility analysis and development of novel treatment

研究代表者

齋藤 智昭 (Saitoh, Tomoaki)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40833554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチンアクセシビリティ解析によって、放射線耐性口腔癌細胞や放射線感受性口腔癌細胞のオープンクロマチン領域やクローズクロマチン領域を同定し、その領域の近傍遺伝子群を検索した。さらに、DAVID-GO解析や発現解析を組み合わせて、放射線耐性関連候補遺伝子としてadenylate cyclase 2 (ADCY2)を同定した。ADCY2発現抑制細胞を作成し、放射線照射後の細胞生存率を比較すると、ADCY2発現抑制細胞では有意に低下していた。本研究では、放射線照射によって惹起するADCY2の発現上昇は細胞の放射線抵抗性に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌に関しては、クロマチンアクセシビリティに注目した治療法(抗癌剤・放射線治療)

の報告はない。さらに、本研究は個々の耐性関連機能ではなく、エピジェネティックな制御機構を同定・利用するという点が大きな発想の転換であり、まさに、新規医学・医療技術の開拓を目指した研究である。担癌患者の長期社会復帰などを実現させる可能性があり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：We evaluated chromatin accessibility in radioresistant (HSC-3) and radiosensitive (KOSC-2) cells using ATAC-seq. We found 1273 peaks (open chromatin regions) related to 8 Gy irradiation in HSC-3, among which 235 genes located around the chromatin open peaks were identified by ChIPpeakAnno analysis. Subsequently, 12 genes were selected as signal transduction-related genes by Gene Ontology analysis, and RT-qPCR confirmed 12 genes' expression. Among these genes, adenylate cyclase 2 (ADCY2) was significantly upregulated after irradiation in HSC-3 but not KOSC-2 cells. To further evaluate ADCY2 function in radioresistant cells, we performed ADCY2 knockdown by transfection of siADCY2. Cell viability after irradiation was significantly decreased in siADCY2-transfected cells compared with that in control cells. These results suggested that ADCY2 expression was related to the open chromatin region in radioresistant OSCC cells and therapeutic efficacy when used in combination with radiotherapy.

研究分野：口腔癌における分子生物学

キーワード：クロマチンアクセシビリティ ATAC-seq 口腔癌放射線耐性 オープンクロマチン ヘテロクロマチン

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、癌研究においても全ゲノムワイドなエピジェネティックな発現制御機構の解析が行われており、クロマチンの「利用しやすさ」(クロマチンアクセシビリティ)についても注目されている。特に、アクセシビリティが高い状態にあるオープンクロマチン領域(クロマチン構造が緩まっている領域)は、プロモーターやエンハンサーといった遺伝子発現制御領域に対応することが報告されている。癌の放射線耐性機構に多くの遺伝子が深く関与していると考えられるが、放射線耐性・感受性に関するオープンクロマチン領域の存在の有無さえ報告されていない。本研究は、クロマチンのアクセシビリティ解析を基盤とし、放射線耐性メカニズムをゲノムレベルから系統的に検討することで、放射線耐性に特異的な標的因子の同定ならびに解析を行い、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

Assay for Transposase-Accessible Chromatin with sequencing (ATAC-seq) を用いて、口腔扁平上皮癌由来細胞株に対して全ゲノム的にオープンクロマチン領域の検索を行い、放射線耐性克服の一役を担う放射線耐性候補遺伝子の検索・同定を目的とした。

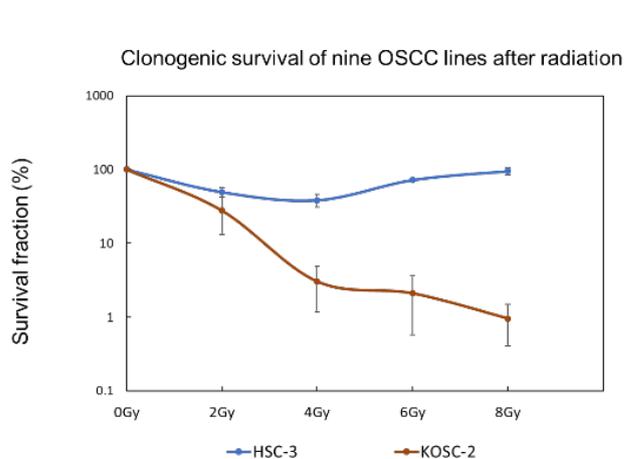
3. 研究の方法

- (1) 同定した口腔扁平上皮癌放射線耐性細胞・感受性細胞に対して、ATAC-seq 解析を用いておいて全ゲノムワイドな解析をおこなう。各細胞のオープンクロマチン領域とクローズクロマチン領域を抽出する。
- (2) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域の近傍遺伝子の抽出
放射線耐性細胞・感受性細胞に対して、放射線照射によって変動した各ピークの近傍(overlap Start"で shortest Distance が 50kb 以下) 遺伝子の抽出を行う。
- (3) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域(ピーク)の近傍遺伝子のGO解析
(2)にて抽出した遺伝子群に対して、DAVID-GO 解析を行う。
- (4) (3)で抽出/同定した遺伝子の発現状況を qRT-PCR などで確認する。
- (5) (4)で同定した口腔扁平上皮癌における放射線耐性を規定する候補遺伝子に対して発現抑制細胞を作成し、放射線耐性や感受性の変化の有無について機能解析を行う。
- (6) 上記で同定した放射線耐性遺伝子のパスウェイ解析を行う。

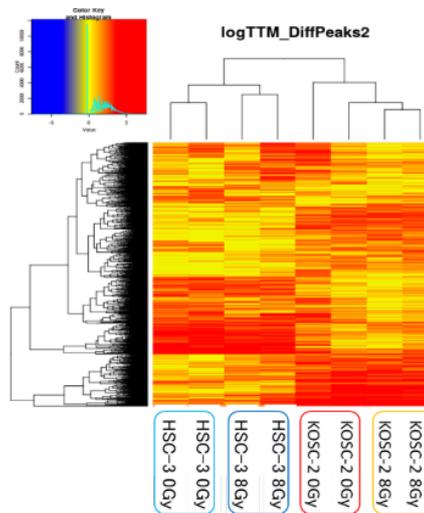
4. 研究成果

1) 口腔扁平上皮癌放射線耐性細胞・感受性細胞に対して、ATAC-seq 解析

先行研究で同定した口腔癌放射線耐性細胞(HSC-3)・感受性細胞(KOSC-2)を使用した(図1)。HSC-3細胞(0Gy・8Gy)ならびにKOSC-2細胞(0Gy・8Gy)を用いてATAC-seq解析を施行し、最初に放射線照射による変動領域(ピーク)の抽出を行い、ヒートマップを作製した。階層的クラスタリング解析では、HSC-3細胞の放射線処理(比較A vs B)は0Gyと8Gyがそれぞれ別のクラスターになったが、KOSC-2細胞の放射線処理(比較C vs D)はあまり大きく分かれなかった。KOSC2の放射線照射によるクロマチンの変化(それぞれのピークの大きさの変化)は小さめであることが示唆された(図2)。



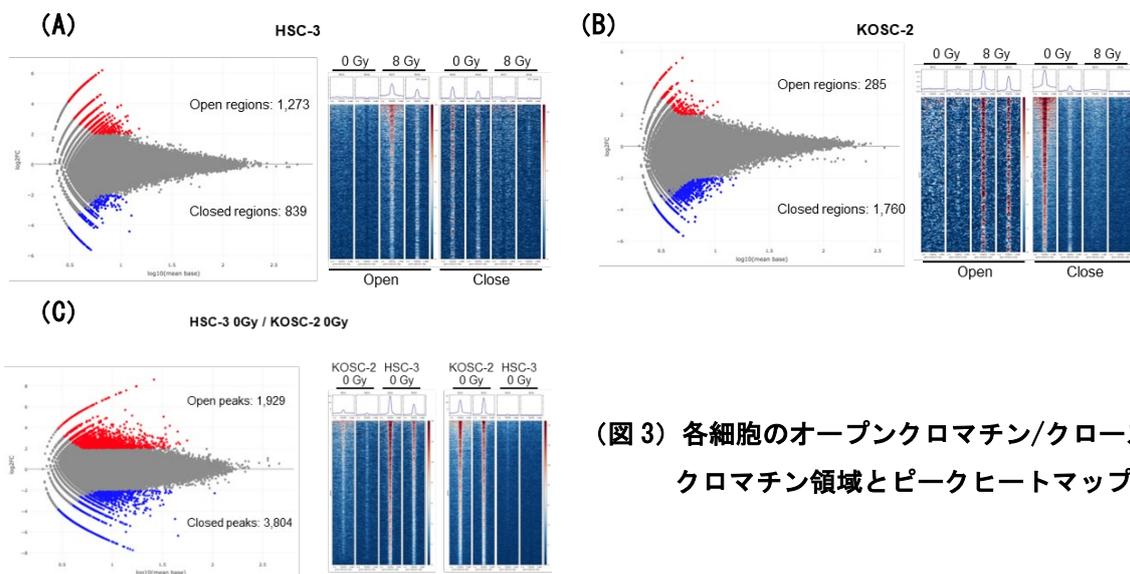
(図1) 放射線耐性細胞・感受性細胞の同定



(図2) ヒートマップ

(総変動ピーク; logTTM)
階層的クラスタリング

オープンクロマチン領域およびクローズクロマチン領域については、HSC-3 細胞では、放射線照射によるオープンクロマチン領域を 1273・クローズクロマチン領域を 839 認めた (図 3A)。KOSC-2 細胞では、放射線照射によるオープンクロマチン領域を 285・クローズクロマチン領域を 1760 認めた (図 3B)。HSC-3 細胞と KOSC-2 細胞の 0Gy 同士の比較では、HSC-3 細胞に特異的なオープンクロマチン領域は、1929・KOSC-2 細胞に特異的なオープンクロマチン領域は、3804 認めた (図 3C)。



(図 3) 各細胞のオープンクロマチン/クローズクロマチン領域とピークヒートマップ

2) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域の近傍遺伝子の抽出

各変動ピークに対する近傍遺伝子 (overlap Start"で shortest Distance が 50kb 以下) は、HSC-3 細胞では、オープンクロマチン 1273 ピークに対して 235 遺伝子・クローズクロマチン 839 ピークに対して 122 遺伝子抽出された。KOSC-2 細胞では、オープンクロマチン 285 ピークに対して 46 遺伝子・クローズクロマチン 1760 ピークに対して 310 遺伝子抽出された。

3) 口腔扁平上皮癌細胞株における放射線耐性を規定する変動領域 (ピーク) の近傍遺伝子の GO 解析・発現解析

上記近傍遺伝子に対して DAVID-GO 解析を行い P<0.001 以下の遺伝子を抽出した。HSC-3 細胞では、照射後に intracellular signal transduction, response to virus(表 1)がオープンになっており、これらのシグナル経路が放射線照射後に利用可能になっている可能性があった。

Category	Term	Count	%	PValue	Genes
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0035556--intracellular signal transduction	12	5.309734513	5.8.E-03	PRKD1, ADCY2, ADCY5, PSEN2, ANP32A, SOCS6, SH2B2, ASB3, CLNK, STMN1, RGS9, DCLK1
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009615--response to virus	6	2.654867257	7.9.E-03	IRAK3, OASL, STMN1, HMGA2, DCLK1, ADAR

(表 1) HSC-3 細胞で照射後に open になった遺伝子群

KOSC-2 細胞では、positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter 遺伝子(主に転写因子)群が、照射後にクローズになっており (表 2) , 複数の転写因子の下流シグナルが抑制されている可能性があった。

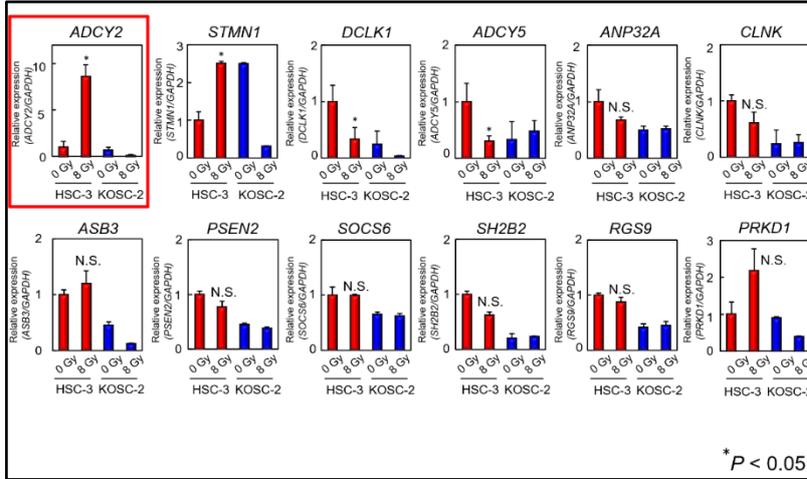
Category	Term	Count	%	PValue	Genes
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045766--positive regulation of angiogenesis	7	2.333333333	4.E-03	CCL24, PRKD1, PTGIS, ETS1, HMOX1, GREM1, ENG
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045944--positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	24	8	4.E-03	CSF3, UTF1, LMO2, IKZF1, DRD2, ONECUT3, GSX1, ESRRG, GREM1, CITED1, MIXL1, FLT3LG, PRKD1, EBF3, ETS1, EBF2, MED17, POU4F1, SUPT4H1, MAFA, NRG1, FSHB, ENG, NFIA
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0040037--negative regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway	3	1	7.E-03	WNT4, SHISA2, GPC1
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030336--negative regulation of cell migration	6	2	8.E-03	WNT4, PODN, MAGI2, DRD2, ENG, IGFBP5

(表 2) KOSC-2 細胞で照射後に close になった遺伝子群

4) DAVID-GO 解析で抽出した遺伝子や転写因子の発現解析

本研究では、表 1 の intracellular signal transduction の 12 遺伝子を放射線耐性候補遺伝子として注目し解析を進めることとした。HSC-3 (0Gy・8Gy) および KOSC-2 (0Gy・8Gy) における mRNA

レベルでの発現変化を quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR)法で解析した。HSC-3細胞では、8Gy照射後にADCY2・STMN1の発現が有意に増加していた。

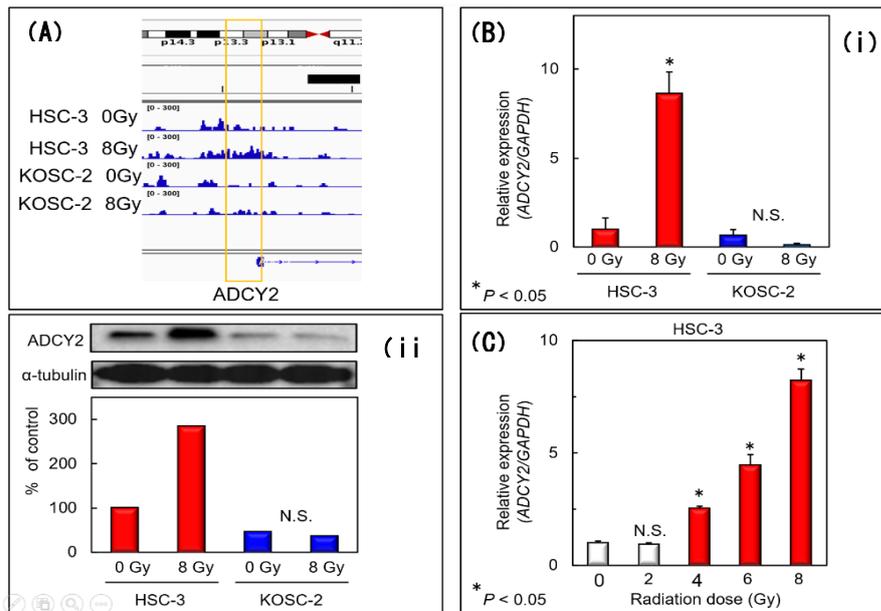


(図4) qRT-PCR法での放射線耐性関連候補遺伝子の発現状況

特にADCY2は、HSC-3細胞では8倍程度の発現増加が認められ、KOSC-2細胞では有意ではないが発現が減弱していた(図4)。そのため、adenylate cyclase 2 (ADCY2)に着目し詳細に解析することにした。

Integrative Genomics Viewer (IGV)を用いてADCY2近傍の変動ピークを検索したところ、HSC-3細胞

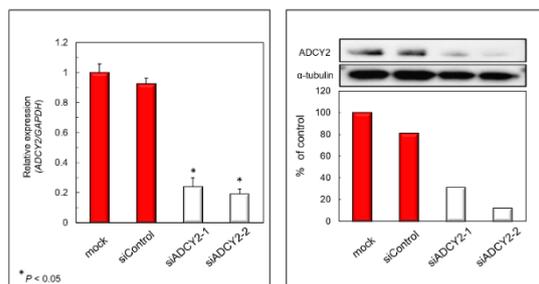
の放射線照射後にADCY2のプロモーター領域(2000bp)に変動ピークの上昇を認めた(図5A)。さらに、ADCY2発現量の変化をqRT-PCRおよびWestern Blottingで確認した(図5Bi, ii)。また、HSC-3細胞において、線量依存的にADCY2の発現量が増加していくことも確認した(図5C)。



(図5) ADCY2の発現

5) ADCY2発現抑制細胞の作製と放射線耐性の変化について機能解析

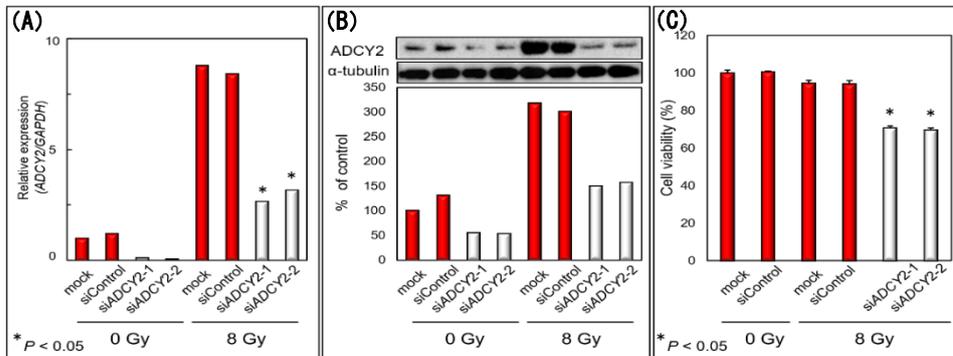
HSC-3細胞において2種類のsiRNAを用いて、ADCY2発現抑制HSC-3の作製を行い、qRT-PCRおよびWestern BlottingにてADCY2の有意な発現減弱を確認した(図6)。



(図6) ADCY2発現抑制HSC-3の作製

上記の作製したADCY2発現抑制HSC-3細胞を用いて、放射線照射後の発現変化や細胞生存率を解析した。通常のHSC-3細胞では、8Gy放

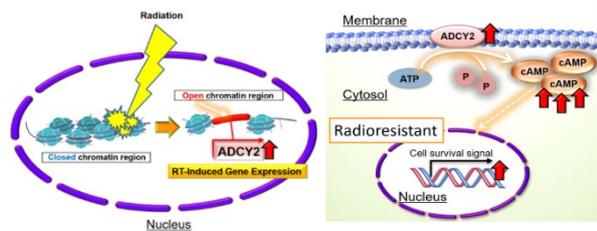
放射線照射後に ADCY2 の発現量が約 8 倍に上昇したが、ADCY2 発現抑制 HSC-3 細胞では、発現上昇が抑制されたことを qRT-PCR および Western Blotting で確認した (図 7A, B). さらに、ADCY2 発現抑制による放射線照射後の細胞生存率への影響について MTS assay を用いて評価した. HSC-3 mock や siControl HSC-3 細胞では、細胞生存率が 8Gy 照射後も 95%程度であったが、ADCY2 発現抑制 HSC-3 細胞では、68%程度であった (図 7C). そのため、放射線照射によって惹起する ADCY2 の発現上昇は、細胞の放射線抵抗性に関与する可能性が示唆された.



(図 7) ADCY2 発現抑制 HSC-3 細胞による機能解析

6) ADCY2 のパスウェイ解析

adenylate cyclase 2 (ADCY2) は、ADCY ファミリーのひとつであり、1-10 まで全 10 種類が報告されていた。ADCY2 は細胞膜に局在する 12 回膜貫通型タンパクをコードする遺伝子であり、ATP を cAMP へ触媒する働きを持っており、cAMP シグナル伝達を通して細胞生存に関与している可能性が考えられた (図 8).



(図 8) ADCY2 による放射線耐性機構の想定図

まとめ

本研究では、ATAC-seq 解析によって、8Gy の放射線照射後に HSC-3 (放射線耐性細胞) では、クロマチンの 1273 領域がオープンになり、KOSC-2 (放射線感受性細胞) では 1760 領域がクローズになったことを確認した。さらに、8Gy 照射後の HSC-3 でオープン領域の近傍遺伝子群 (235 遺伝子) を抽出し、DAVID-GO 解析で絞り込みをした。細胞内シグナル伝達に関与する 12 遺伝子が有意に認められ、12 遺伝子の中で ADCY2 のみが HSC-3 で 8 倍程度の発現増加が認められた。また、未照射の状態では、HSC-3 と KOSC-2 で ADCY2 の発現に有意な差は認めなかった。IGV では、HSC-3 の放射線照射後に ADCY2 のプロモーター領域 (2000bp) に変動ピークの上昇が確認された。さらに、線量依存的に ADCY2 の発現量が増加していくことも mRNA レベルで確認した。ADCY2 発現抑制 HSC-3 細胞では、放射線照射後の細胞生存率は、有意に低下した。ADCY2 による放射線耐性獲得の想定 pathway として、放射線耐性細胞 (HSC-3) では放射線照射によって ADCY2 のプロモーターが存在する領域のクロマチンが開くことによって ADCY2 の発現が増加し、そして cAMP の形成を触媒することで細胞質内の cAMP 濃度が上昇する。その下流に存在する細胞生存シグナルに作用することによって、放射線耐性傾向を獲得すると考えられた。反対に放射線感受性細胞 (KOSC-2) では放射線照射によって ADCY2 のプロモーター領域は閉じたまま (変化しない) であり、放射線照射によって ADCY2 の発現は上昇せず、その下流の細胞生存シグナルにも影響を及ぼさないと考えられた。以上より、ADCY2 は放射線耐性口腔扁平上皮癌の放射線耐性克服に有用な分子であることが示唆された。

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 Nobuchi Takafumi, Saito Tomoaki, Kasamatsu Atsushi, Kawasaki Kohei, Nozaki Ryunosuke, Kase Yutaro, Iyoda Manabu, Saito Masayoshi, Uno Takashi, Uzawa Katsuhiko	4. 巻 597
2. 論文標題 Assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing reveals radioresistance-related genes in oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 115 ~ 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.122	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 野淵 崇史, 齋藤 智昭, 笠松 厚志, 宮本 勲, 伊豫田 学, 中嶋 大, 坂本 洋右, 鶴澤 一弘
2. 発表標題 Identification of radioresistant-related genes in oral squamous cell carcinoma cells by ATAC-sequencing.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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