

令和 5 年 5 月 25 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：21K17106

研究課題名(和文) 口腔癌の抗癌剤耐性を決定する tandem duplicator の全ゲノム解析

研究課題名(英文) Whole-genome analysis of the distribution of tandem duplication, a mechanism of drug resistance in oral cancer

研究代表者

宮本 勲 (Miyamoto, Isao)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00741836

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)：本研究では、ヒトの培養細胞の全ゲノムシーケンスデータを用いてCetuximab(CTX)耐性や感受性に関与する tandem duplication の検出を行った。アライメントデータから DELLY を用いて、SAS-R および SAS-P の tandem duplication の検出を行った。さらに、SAS-R に特異的な tandem duplication およびその領域の遺伝子を検索・同定した。SAS-R に特異的な tandem duplication 数を検索すると、10カ所存在し、17個の遺伝子や lncRNA が含まれていた。これらの遺伝子らが薬剤耐性に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のような「系統的に全ゲノム上の遺伝子の発現を制御し、発生、分化、疾患成立、治療抵抗性などに関与しているシステム」の研究が開始されて創薬も絡んだ研究に発展している。本研究も、系統的な複数の遺伝子機能の組み合わせが系統的に疾患を成立させ、各種機能を制御・決定すると考えた点に大きな発想の転換がある。まさに、新規医学・医療技術の開拓を目指した研究であり、臨床応用を見据えた非常に優れた研究である。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 tandem duplications (TDs) in cetuximab-resistant OSCC cells (SAS-R) and parental OSCC cells (SAS) using NovaSeq 6000 system and DELLY software. We found 941 TD regions in SAS-P and 783 TD regions in SAS-R. Moreover, SAS-R-specific TDs were identified in 10 regions and 17 genes were located in their regions. Among these genes, NLR family pyrin domain containing 7 (NLRP7) was significantly upregulated in cetuximab-resistant OSCC cells of our microarray (GSE114928). Analyzing the relationship between TDs formation and these genes could contribute to a new strategy for overcoming cetuximab resistance.

研究分野：口腔癌における分子生物学

キーワード：tandem duplication 次世代シーケンサー 口腔癌抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代型シーケンサーを用いたシーケンス解析研究によりゲノム配列の様々な構造変化が明らかにされ、mutation などの単純な構造異常ばかりでなく、遺伝子配列の繰り返し構造である tandem duplication (TD) の全ゲノム上における分布状態が注目され、研究されている。それに伴い、癌の発生、浸潤・転移、治療抵抗性などに特徴的な系統的構造変化が重要な役割を果たしていることが認識されるようになった。一方、口腔癌の治療における化学療法では CDDP や 5-FU が、また分子標的薬では抗 EGFR 抗体であるセツキシマブが汎く使用されている。しかし、効果は根治という観点から考えると不十分であり、生存期間の延長、QOL の向上、症状緩和が目的となることが多い。さらに抗癌剤、分子標的薬に対する耐性獲得は化学療法の全てにわたる大きな課題となっている。本研究において、抗癌剤抵抗性、分子標的薬抵抗性のある細胞株を用いて、全ゲノムワイドな解析により TD がどのような遺伝子で起きているかを検討し、その分布状態を明らかにすることで、薬剤抵抗性獲得等にどのように関与しているのかを検討する実験計画を立案した。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーによる全ゲノムワイドな解析を用いて、抗癌剤耐性口腔扁平上皮癌由来細胞株・親株に対して全ゲノム的に tandem duplication (TD) 領域の検索を行い、抗癌剤耐性獲得に関与する TD とその抗癌剤耐性候補遺伝子の検索・同定を目的とした。

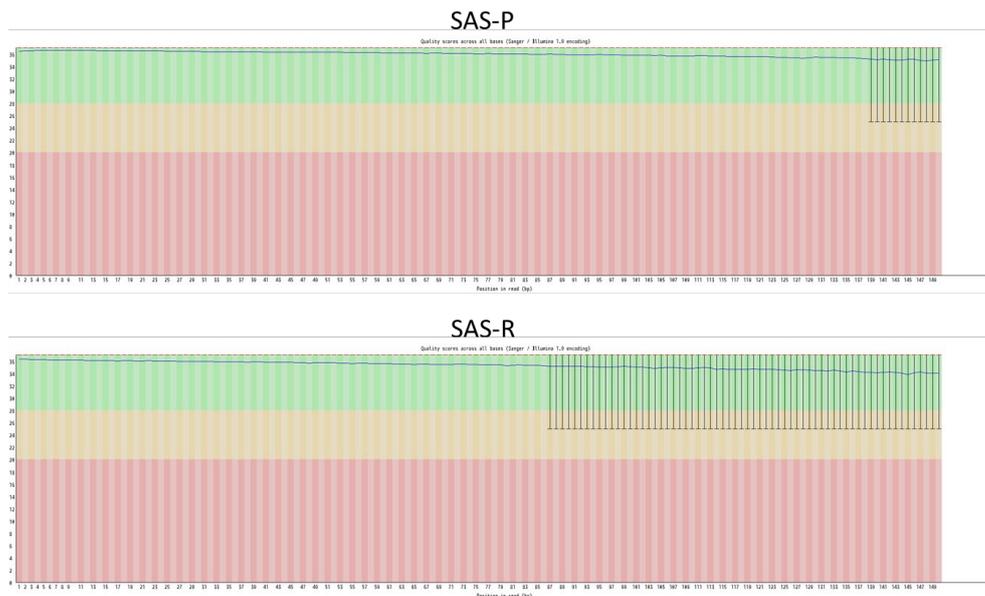
3. 研究の方法

- (1) 独自に樹立した 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 TD を次世代シーケンサーおよび DELLY を用いて検索する。
- (2) CTX 耐性口腔癌細胞株に特異的な TD を検索・同定する。
- (3) (2) で同定した TD に由来する遺伝子を検索・同定する。
- (4) (3) で同定した遺伝子の発現解析や文献的検討を行う。

4. 研究成果

- (1) CTX 耐性口腔癌細胞株・親株を用いて、各々における TD を次世代シーケンサーおよび DELLY を用いて検索する。

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、CTX 耐性口腔癌細胞株 (SAS-R) およびその親株(SAS-P)を用いた。各々の細胞から Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega)を使用して gDNA を抽出し、シーケンス解析をした。シーケンスデータ (FASTQ) のクオリティチェックは、FastQC を用いて行った。いずれも塩基やリードのクオリティは高く、アダプター配列の混入などもなく高クオリティのデータであった (図 1)。



(図 1) FastQC を用いたシーケンスデータのクオリティチェック

次に、BWA を用いて参照配列 (hg38) にアライメントを行い、GATK MarkDuplicates を用いて重複リードの除去を行った。いずれもマッピング率は 90%以上で、良好なマッピング率が得られた。平均

depth は x25 以上で、deep に読むことができていた（表 1）。

sample	SAS-R	SAS-P
YieldReads	587,730,804	665,292,328
YieldBases	85,766,632,387	97,144,765,451
MappedReads	559,056,908	665,013,102
MappedReadsPct	95.12	99.95
WgsCoverageMean	26.31	31.32
WgsCoverageMedian	24	29
WgsCoverageBases1	2,892,711,870	2,894,083,831
WgsCoverageBases1Pct	93.67	93.71
WgsCoverageBases10	2,782,122,815	2,838,765,428
WgsCoverageBases10Pct	90.09	91.92
WgsCoverageBases50	122,122,872	254,044,729
WgsCoverageBases50Pct	3.954	8.226

（表 1）アライメントデータのマップ率・カバー率

アライメントデータから DELLY を用いて、SAS-R および SAS-P の tandem duplication の検出を行った。さらに、SAS-R に特異的な tandem duplication およびその領域の遺伝子を検索・同定した。DELly の TD 検出アルゴリズムは、IMPRCISE (paired-end; 変異の breakpoint を挟むシーケンスリードのペアから変異を検出する) と PRECISE (split-read; 変異の breakpoint をまたぐシーケンスリードから変異を検出する) を用いた（図 2）。

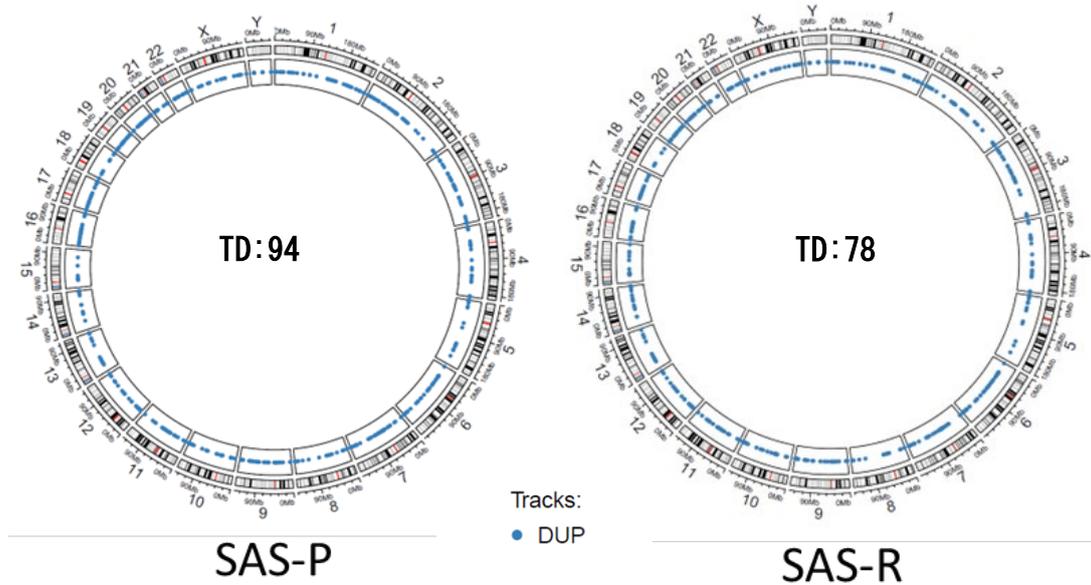


（図 2）DELly の検出アルゴリズム

SAS-P に認められた TD 数は、941 個（内訳；IMPRCISE：746 個、PRECISE：85 個、IMPRCISE と PRECISE の両方：110 個）であり、SAS-R に認められた tandem duplication 数は、783 個（内訳；IMPRCISE：609 個、PRECISE：64 個、IMPRCISE と PRECISE の両方：110 個）であった（図 3）。さらに、SAS-P および SAS-R の TD について、circos plot を作製しその分布を確認した（図 4）。

サンプル名	高クオリティ tandem duplication 数		
	IMPRCISE	PRECISE	both
SAS-P	941		
	746	85	110
SAS-R	783		
	609	64	110

（図 3）SAS-P と SAS-R の TD 数とその内訳



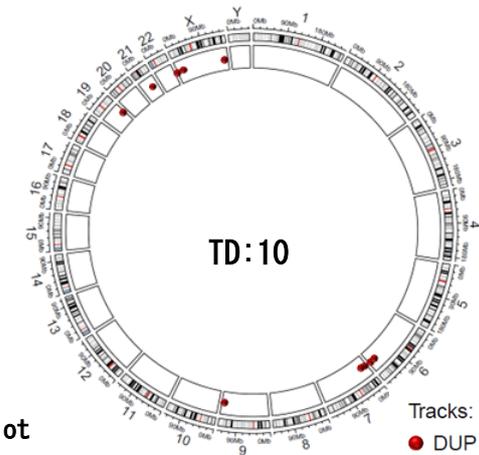
(図3) SAS-P と SAS-R の circos plot

(2) CTX 耐性口腔癌細胞株に特異的な TD を検索・同定する

さらに, SAS-R に特異的な TD 数を検索した. SAS-P と SAS-R で重複しているが, 一部違いがある TD 数は, 156 個 (内訳; IMPRCISE : 37 個, PRECISE : 34 個, IMPRCISE と PRECISE の両方 : 85 個) であった. そして, SAS-R に特異的な TD 数を検索すると, 10 個 (内訳; IMPRCISE : 10 個, PRECISE : 0 個, IMPRCISE と PRECISE の両方 : 0 個) であり, SAS-R に特異的な TD について, circos plot を作製しその分布を確認した (図 4) .

高クオリティ tandem duplication数		
10		
IMPRCISE	PRECISE	both
10	0	0

SAS-R specific



(図3) SAS-R 特異的な TD と circos plot

(3) CTX 耐性に特異的な TD に由来する遺伝子を検索・同定する

上記 10 カ所の TD には, 表 2 に示す 17 個の遺伝子や lncRNA が含まれていた.

CHROM	START	END	LENGTH	Gene	Effect
chr6	167686807	167687016	209	LINC02487, LINC01558	upstream_gene_variant, intergenic_region
chr6	168614610	168615674	1064	SMOC2	intron_variant
chr7	467961	468250	289	LOC442497, PDGFA	intergenic_region, intergenic_region
chr7	588511	588872	361	PRKAR1B	intron_variant
chr9	137102318	137103176	858	MAN1B1	intron_variant
chr19	54964373	54965621	1248	NLRP2, NLRP7	upstream_gene_variant, intergenic_region
chr21	35631655	35658512	26857	LOC100506403, MIR802	intergenic_region, intergenic_region
chrX	436759	437214	455	PPP2R3B, SHOX	intergenic_region, intergenic_region
chrX	870204	870862	658	SHOX, CRLF2	intergenic_region, intergenic_region
chrX	153383132	153383667	535	LOC105373378, PNMA6E	intergenic_region, intergenic_region

(表2) CTX 耐性に特異的な TD に関連した遺伝子らのリスト

(4) 同定した遺伝子の発現解析および文献的検討

以前に報告した複数の CTX 耐性細胞株 (HSC-3-R, Sa3-R, SAS-R) ・それらの親株 (HSC-3-P, Sa3-P, SAS-P) における microarray 解析 (GSE114928) で, 上記 17 遺伝子らの発現状況を確認した. NLR family pyrin domain containing 7 (NLRP7) が, CTX 耐性株で FC が 14 倍と発現亢進していた (表 3). NLRP7 は, 免疫応答で重要な役割を果たすタンパク質ファミリーである NOD 様受容体 (NLR) のメンバーである. 癌においては, NLRP7 発現の増加は, 結腸直腸癌や子宮内膜癌の予後不良と関連している. NLR は, NF- κ B の活性化因子としても報告されていることから, NLRP7 が CTX 耐性に関与する可能性も考えられ, タンパクレベルでの発現解析や発現抑制株の作製など検討していく必要があると考えられる.

HSC-3-P	HSC-3-R	Sa3-P	Sa3-R	SAS-P	SAS-R	P_Value	Fold change
3.76045117	701.561117	770.40625	6131.91385	10.734402	20.0657033	0.193848	14.053768

(表 3) CTX 耐性細胞株 microarray 解析における NLRP7

まとめ

本研究では, CTX 耐性口腔癌細胞株 (SAS-R) およびその親株 (SAS-P) における TD の検出を次世代シーケンサーおよび DELLY を用いて検索・同定した. SAS-P に認められた TD 数は, 941 個 (内訳; IMPRCISE: 746 個, PRECISE: 85 個, IMPRCISE と PRECISE の両方: 110 個) であり, SAS-R に認められた TD 数は, 783 個 (内訳; IMPRCISE: 609 個, PRECISE: 64 個, IMPRCISE と PRECISE の両方: 110 個) であった. また, SAS-P と SAS-R で重複しているが, 一部違いがある TD 数は, 156 個 (内訳; IMPRCISE: 37 個, PRECISE: 34 個, IMPRCISE と PRECISE の両方: 85 個) であった. さらに, SAS-R に特異的な TD 数を検索すると, SAS-R に特異的な TD 数を検索すると, 10 個 (内訳; IMPRCISE: 10 個, PRECISE: 0 個, IMPRCISE と PRECISE の両方: 0 個) であった. 上記らの TD については, circos plot も作製しその分布を確認した. SAS-R に特異的な TD10 か所には, 17 個の遺伝子や lncRNA が含まれており, 先行研究の microarray 解析と合わせて CTX 耐性候補遺伝子を抽出した. 今後, 候補遺伝子の CTX シグナルにおける詳細な役割を分析し, TD 形成や CTX 耐性獲得に関与しているか検討することが, 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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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