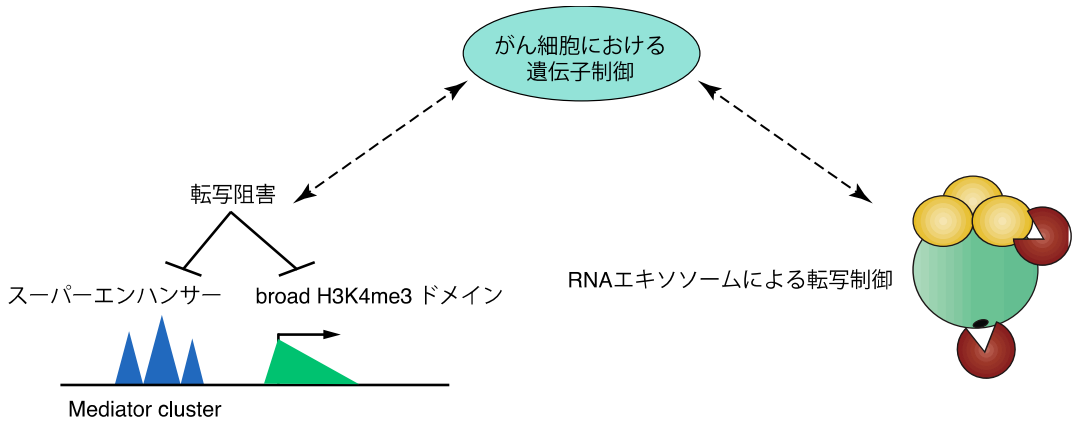
101　がんの転写脆弱性の包括的理解	鈴木　洋

【目的】がんの分子標的治療の多くは、がん細胞がその増殖や生存の維持において依存している特定のシグナルやがん遺伝子を標的にしており、このようながん遺伝子への依存性（oncogene addiction）の理解はがんの創薬シーズを探索する上で重要な戦略の一つである。スーパーエンハンサーは、マスター転写因子と一般的な転写制御因子である Mediator 複合体が高濃度に集積した複数のエンハンサー領域がクラスターを形成したゲノム領域であり、細胞種特異的な遺伝子やマイクロ RNA の発現において中心的な役割を果たす（Suzuki HI et al., Cell, 2017）。スーパーエンハンサーは、がん研究において、がん細胞で *Myc* などのがん遺伝子の発現がスーパーエンハンサーに依存していること、Brd4 などの近年同定されたがんの治療標的の分子メカニズムを説明する上でスーパーエンハンサーが重要であることから注目されている。一方で、がん細胞における転写への依存性（transcriptional addiction）がスーパーエンハンサーの挙動によって十分に説明できるかは明らかとなっていない。このような背景を踏まえ、本研究計画では、がんの治療介入ポイントとしての転写の脆弱性の共通性と多様性の包括的理解を進め、転写標的治療の応答性の理論的基盤を構築し、新規のがん転写治療標的を探索することを目的とした。

【方法】Brd4 の阻害剤に対する遺伝子応答について、スーパーエンハンサーと、その他のエピジェネティックドメイン、特に、broad H3K4me3 ドメインの関係性に注目して解析を行なった。また、近年、注目されている液 - 液相分離と転写の関係に焦点を置き、細胞内のエンハンサーRNA などの RNA をゲノムワイドで分解する RNA エキソソームをノックアウトした際に転写がどのような影響を受けるかを解析した。

【結果】がん細胞において、スーパーエンハンサー近傍の遺伝子群にあわせて、broad H3K4me3 ドメインによって制御されている遺伝子群も Brd4 の阻害剤 JQ1 によって優先的にその発現が抑制されることを見出し、スーパーエンハンサーと broad H3K4me3 ドメインの両方によって制御されている遺伝子群が特に抑制されやすいことを見出した。今後、がん細胞のより詳細なゲノム・エピゲノム解析とがん遺伝子スクリーニングを統合することにより転写依存性を標的とした治療標的の同定を進めていく。

スーパーエンハンサーに注目したがんの転写脆弱性の理解



101. がんの転写脆弱性の包括的理解

鈴木　洋

名古屋大学 大学院医学系研究科 附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター 分子腫瘍学

Key words：がん，スーパーエンハンサー，転写脆弱性，Brd4

緒　言

現在のがんの分子標的治療の多くは、がん細胞がその増殖や生存の維持において依存している特定のシグナルやがん遺伝子を標的にしており、このようながん遺伝子への依存性（oncogene addiction）の理解はがんの創薬シーズを探索する上で重要な戦略の一つである。スーパーエンハンサーは、マスター転写因子と一般的な転写制御因子であるMediator 複合体が高濃度に集積した複数のエンハンサー領域がクラスターを形成したゲノム領域であり、2013 年にマサチューセッツ工科大学の Richard A. Young が提唱した。スーパーエンハンサーはおのおのの細胞種において200～600 ほど同定され、筆者はこれまでにマイクロ RNA の統合解析を通じて、スーパーエンハンサーコンセプトを検証している［1］。スーパーエンハンサーは、がん研究では、がん細胞で *Myc* などのがん遺伝子の発現がスーパーエンハンサーに依存していること、Brd4 などの近年開発されたがんの治療標的の分子メカニズムを説明する上でスーパーエンハンサーが重要であることから注目されている。

Brd4 はアセチル化されたヒストンに結合するクロマチン制御因子であり、JQ1 などの阻害剤が *Myc* などの重要ながん遺伝子を選択的に抑制し抗がん活性を発揮することが知られている。一方で、転写の普遍的な調節因子である Brd4 の阻害がなぜ選択的ながん遺伝子の抑制につながり抗がん活性を発揮するのか、その理論的基盤は明確にされていなかった。この文脈で、アセチル化されたヒストンが密集したスーパーエンハンサーに Brd4 が集積し、スーパーエンハンサーに集積した Brd4 の阻害がスーパーエンハンサーによって活性化されるスーパーエンハンサー近傍のがん遺伝子をより優先的に抑制するというスーパーエンハンサーに基づく説明がこれまでに提案されている。一方で、がん細胞における転写への依存性（transcriptional addiction）がスーパーエンハンサーの挙動によって十分に説明できるかは明らかとなっていない。

このような背景を踏まえ、本研究計画では、がんの治療介入ポイントとしての転写の脆弱性の共通性と多様性の包括的理解を進め、転写標的治療の応答性の理論的基盤を構築し、新規のがん転写治療標的を探索することを目的とした。

方　法

1. がん細胞の Brd4 依存的転写におけるスーパーエンハンサーと broad H3K4me3 ドメインの役割

Brd4 の阻害剤に対する遺伝子応答について、スーパーエンハンサーと、その他のエピジェネティックドメイン、特に、broad H3K4me3 ドメインの関係性に注目して解析を行った。具体的には、多発性骨髄腫細胞において Mediator 複合体のサブユニットである MED1 または H3K27ac ヒストン修飾の ChIP-seq（chromatin immunoprecipitation sequencing）解析結果から ROSE アルゴリズムを用いてスーパーエンハンサーを同定した。さらに、H3K4me3 ヒストン修飾の ChIP-seq 解析結果に基づき、broad H3K4me3 ドメインを同定した。続いて、Brd4 の阻害剤である JQ1 の処理後の RNA-seq 結果を解析し、スーパーエンハンサー近傍の遺伝子群、または、broad H3K4me3 ドメインによってマークされる遺伝子群の遺伝子応答パターンを解析した。

2. RNA エキソソームによる転写制御機構の解析

近年、注目されている液ー液相分離と転写の関係に焦点を置き、細胞内のエンハンサーRNA などの RNA をゲノムワイドで分解する RNA エキソソーム複合体をノックアウトした際に転写がどのような影響を受けるかを解析した。筆者らがこれまでに作製した RNA エキソソームコンディショナルノックアウト細胞を用いて、PRO-seq（precision run-on sequencing）を実施した。

3. がん細胞における RNA エキソソーム依存性の解析

約 1,000 種類のがん細胞株における大規模 CRISPR スクリーニングデータベース（DepMap）を用いて、がん細胞における RNA エキソソーム複合体の各サブユニットおよび関連因子への依存性を解析した。

結果および考察

1. がん細胞の Brd4 依存的転写におけるスーパーエンハンサーと broad H3K4me3 ドメインの役割

がん細胞では、重要ながん遺伝子の近傍にスーパーエンハンサーの形成が見られ、多発性骨髄腫細胞でも *MYC*、*IGLL5*、*XBP1* といったがん遺伝子、または、多発性骨髄腫において重要な遺伝子の近傍にスーパーエンハンサーの形成が見られた。一方で、ヒストン修飾の 1 つである H3K4me3 の幅広い修飾（broad H3K4me3 ドメイン）も、*PRDM1*、*IGLL5*、*XBP1*、*MYC* などの多発性骨髄腫において重要な遺伝子群の転写開始点周囲に形成されることが明らかとなった（図 1a）。筆者らは、これまでに、マウス ES 細胞において、ES 細胞の制御において重要な遺伝子群がしばしばスーパーエンハンサーと broad H3K4me3 ドメインの両方によって制御されていることを報告してきたが [1]、多発性骨髄腫における解析結果はこれに合致するものであった。

続いて、スーパーエンハンサーおよび broad H3K4me3 ドメインによって制御される遺伝子群の JQ1 に対する応答性を解析し、スーパーエンハンサー近傍の遺伝子群にあわせて、broad H3K4me3 ドメインによって制御されている遺伝子群も Brd4 の阻害剤である JQ1 によって優先的にその発現が抑制されることを見出し（図 1b）、スーパーエンハンサーと broad H3K4me3 ドメインの両方によって制御されている遺伝子群が特に抑制されやすいことを見出した。

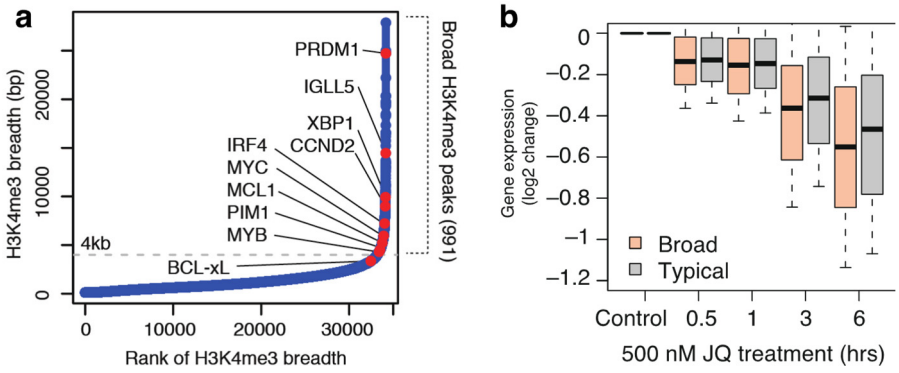


図 1. がん細胞の Brd4 依存的転写における broad H3K4me3 ドメインの役割

a）多発性骨髄腫細胞株における broad H3K4me3 ドメインの同定。

b）broad H3K4me3 ドメインによって制御される遺伝子群の JQ1 に対する応答性。

2. RNA エキソソームによる転写制御機構の解析

RNA エキソソームコンディショナルノックアウト細胞を用いて［2］、PRO-seq（precision run-on sequencing）を実施し、図 2 に示すように良好な PRO-seq シグナルを得た。

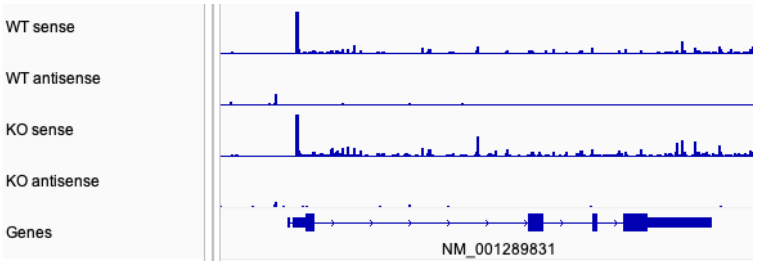


図 2. PRO-seq に基づく RNA エキソソームによる転写制御機構の解析
RNA エキソソームコンディショナルノックアウト細胞における PRO-seq の結果を示す。

3. がん細胞における RNA エキソソーム依存性の解析

DepMap において 1,054 種のがん細胞株における RNA エキソソーム複合体の各サブユニットおよび関連因子への依存性を解析した[3]。ほとんどの細胞株において RNA エキソソーム複合体を構成する EXOSC1-10 遺伝子群と DIS3（EXOSC11）が生存に必須であることが確認された（図 3）。RNA エキソソーム複合体の複数のアダプター複合体に共通する MTR4 も同様にほとんどのがん細胞株において必須遺伝子であり、ポリ（A）鎖を標的としたアダプター複合体に含まれる ZFC3H1 は約半数のがん細胞株において必須遺伝子であることが見出された。

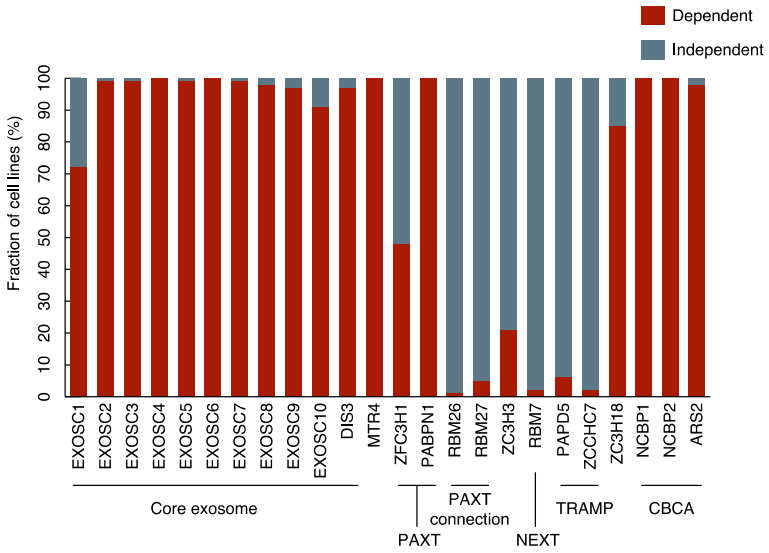


図 3. 大規模がん細胞株データベースにおける RNA エキソソーム依存性の解析
1,054 種のがん細胞株における RNA エキソソーム複合体の各サブユニットおよび関連因子への依存性。依存性スコアが 0.5 より大きいものを依存性ありと評価した。

4. 今後の研究方針

本研究により、がん細胞株における Brd4 阻害剤に対する遺伝子応答がスーパーエンハンサーと broad H3K4me3 ドメインの組み合わせによって複雑に制御されていることが示唆された。今後、がん細胞のより詳細なゲノム・エピゲノム解析とがん遺伝子スクリーニングを統合することにより転写依存性を標的とした新たな治療標的の同定を進めていきたい。

また、近年、液ー液相分離・転写・がんの関係が注目されており、RNA 分解（RNA エキソソーム）に注目した本研究の結果を起点として、がんにおける液ー液相分離・転写の関係性の包括的理解を進めていく予定である［3，4］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター分子腫瘍学の尾上耕一である。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に心より深謝申し上げます。

文　献

1） Suzuki HI, Young RA, Sharp PA. Super-Enhancer-Mediated RNA Processing Revealed by Integrative MicroRNA Network Analysis. Cell. 2017 Mar 9;168(6):1000-1014.e15. PMID: 28283057 DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.015.

2） Chiu AC, Suzuki HI, Wu X, Mahat DB, Kriz AJ, Sharp PA. Transcriptional Pause Sites Delineate Stable Nucleosome-Associated Premature Polyadenylation Suppressed by U1 snRNP. Mol Cell. 2018 Feb 15;69(4):648-663.e7. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29398447 DOI: 10.1016/j.molcel.2018.01.006.

3） Ogami K, Suzuki HI. Nuclear RNA Exosome and Pervasive Transcription: Dual Sculptors of Genome Function. Int J Mol Sci. 2021 Dec 13;22(24):13401. PMID: 34948199 DOI: 10.3390/ijms222413401.

4） Suzuki HI, Onimaru K. Biomolecular condensates in cancer biology. Cancer Sci. 2022 Feb;113(2):382-391. Epub 2021 Dec 14. PMID: 34865286 DOI: 10.1111/cas.15232.