

令和元年6月19日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10431

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析によるデスモイド腫瘍の腫瘍原性の解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the tumorigenesis of desmoid tumor and searching for new therapeutic target by comprehensive genomic analysis

研究代表者

河野 博隆 (Hiroataka, Kawano)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：20345218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：デスモイド腫瘍は、深部軟部組織に発生する線維性腫瘍で、局所浸潤傾向があり、手術後の再発率が高いことが知られている。デスモイド腫瘍に対する標準的な治療はwait and seeであるが、症状がある場合または重要臓器に近接している場合、薬物治療が行われる。本研究は、デスモイド腫瘍の新規治療標的を探索するために、網羅的ゲノム解析を行った。まず、デスモイド腫瘍からcDNAライブラリーを作成し、NIH3T3細胞に安定導入し、形質転換した細胞がいくつか見られたが、共通して導入された遺伝子は同定できなかった。また、Exom-seqを行ったが、既知のbeta-catenin以外の異常は同定できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、デスモイド腫瘍の新規治療法を開発するために、腫瘍の検体を用いて2つの解析を行った。まず腫瘍から得られた遺伝子を非腫瘍細胞にいて、細胞の性状が変化するか否かを調べたが、デスモイド腫瘍の原因となりうるような遺伝子は同定できなかった。また、腫瘍検体の遺伝子を調べたところ、これまで知られているカテニンという遺伝子の異常以外に新たな遺伝子異常は同定できなかった。今後、異なる手法を用いて、デスモイド腫瘍に対する治療法を探索する予定である。

研究成果の概要(英文)：Desmoid tumor is monoclonal fibroblastic neoplasm that arises in deep soft tissue, and characterized by infiltrative growth and a tendency towards local recurrence after radical surgery. Standard strategy of treatment for demoid tumor is a wait-and-see policy. In symptomatic patients or in those where tumor grows near and around vital structures, several nonsurgical medical options may be proposed. The purpose of this research is to elucidate the tumorigenesis of desmoid tumor and to search for new therapeutic target by comprehensive genomic analysis. We created cDNA library from the specimen of demoid tumor, and performed retrovirus mediated gene transfer to the NIH3T3 cells. Several transformed cells were gained, but no common gene which was transferred by retrovirus was observed. Next, we performed exom-sequence, but we could not detect recurrent mutation other than beta-catenin, which is well known mutated gene in demoid tumor.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：デスモイド腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

デスモイド腫瘍は、クローナルな線維芽細胞の増殖を特徴とし、小児から成人までの四肢及び体幹、特に深部組織に発生する。転移することなく、良性腫瘍に分類されるが、非常に強い局所浸潤傾向を示す疾患であり、局所での増大による機能障害や時に重要臓器に浸潤することで致死的となる。治療法は、手術療法と薬物療法があるが、手術療法では広範な組織欠損を伴うにも関わらず、再発率は10～40%と報告されている。また、薬物療法として、Cox2阻害薬、抗女性ホルモン療法、抗腫瘍薬などが一定の効果を示すことがあるが、確立したものはない(C. Escobar, *Annals of Oncology*, 2007)。

デスモイド腫瘍は、 β -catenin のリン酸化部位の遺伝子変異による恒常活性により T-cell factor(TCF)依存性の転写が亢進することに由来すると考えられている。また、APC 遺伝子の胚細胞変異による家族性大腸腺腫症罹患患者でデスモイド腫瘍が発生することが知られており、デスモイド腫瘍の発症には、Wnt/ β -catenin シグナルの異常が関与していると考えられる。一方で、 β -catenin の遺伝子異常が検出できないものがあること、家族性大腸腺腫症の罹患患者でもデスモイド腫瘍の発生頻度は約10～15%であることから(C. Escobar, *Annals of Oncology*, 2007)、その発症原因は不明であり、Wnt/ β -catenin シグナルの遺伝子異常の他に腫瘍原生に関わるドライバー遺伝子の存在が示唆される。

これまで、Wnt/ β -catenin シグナル以外では、CSMD1, PAI-1, Rhamm の異常がデスモイド腫瘍の発症に関与していると言われている(Philipp Erben, *Onkologie*, 2012, Catherine F. Li, *Familial Cancer*, 2007, Cornelia Tolg, *Oncogene*, 2003)しかしながら、これまで同定された遺伝子異常は治療対象としてはなっておらず、さらなる病態解明を目指した研究が望まれる。

cDNA ライブラリーを利用した網羅的な解析は、臨床癌検体から単離される微量の cDNA を基にレトロウイルス発現ライブラリーを構築する機能スクリーニングシステムである。本手法を、線維芽細胞を用いる形質転換アッセイと組み合わせることで、発癌原因 cDNA を組み込んだウイルス粒子を同定することが可能であり、このシステムは癌種にかかわらず発癌変異のスクリーニングに利用可能と考えられる(Naoto Yoshizuka, *J Biol Chem*, 2004, Manabu Soda, *Nature*, 2007)。また、近年の次世代シーケンサーを用いた癌ゲノム研究は、その網羅的解析により新規遺伝子異常が次々と報告されており、癌治療のテーラーメイド医療にも寄与している(Kohno T., *Nature med.* 2011, Yoshida K., *Nature* 2011, Wang L et al. *Genom Res*, 2012)。

本研究の目的は、2つの網羅的解析により、デスモイド腫瘍の腫瘍原生に関与する遺伝子異常を同定し、病態を解明することで、新規治療ターゲットを探索することである。

以上の背景から、本研究遂行には腫瘍の臨床・基礎両面の研究能力が必要とされるだけでなく、次世代シーケンサーなどハード面の充実が必須である。東大整形外科は分子生物学的研究で世界的に高く評価される実績をあげているだけでなく、臨床面でも骨軟部腫瘍のセンター病院として、永年に渡り症例の質・量とも高いレベルを維持している。また、共同研究施設である東京大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座 細胞情報分野の間野博行研究室では、これまで cDNA ライブラリーおよび次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行い、世界的な業績をあげている。当該領域研究において、我々が既に得たアドバンテージを十分に活かしながら本研究を推進することで、臨床応用に向けての実り多い成果が得られるものと確信する。

2. 研究の目的

デスモイド腫瘍は小児から成人までの四肢及び体幹に発生し、非常に強い局所浸潤傾向を示す腫瘍性疾患である。良性腫瘍に区分され、転移をすることはないが、局所浸潤性が強く、運動

器の機能障害を生じ、時に重要臓器への浸潤のため致死的となる。治療は、手術療法および薬物療法があるが、確立した治療方法はない。デスマイド腫瘍の発症には、Wnt/ β -catenin シグナルの異常の存在が知られているが、これらの遺伝子の異常のないデスマイド腫瘍の存在や APC 遺伝子の異常による家族性大腸腺腫症患者のデスマイド腫瘍罹患率が 10%と低いことから、他のデスマイド腫瘍のドライバー遺伝子の存在が示唆される。本研究では、腫瘍の cDNA ライブラリーと次世代シーケンサーを用いた網羅的手法を用いて、デスマイド腫瘍の腫瘍原生に関わるゲノム異常を同定し、その病態を解明することで、新規治療ターゲットを探索することを目的とする。

3. 研究の方法

デスマイド腫瘍の原因遺伝子の探索を目的として、2つの網羅的解析を行う。1つ目は、デスマイド腫瘍の cDNA ライブラリーを作成し、これを線維芽細胞株に安定導入し、形質転換が生じた細胞から genomic DNA を抽出し、ドライバー遺伝子の候補をあげる。2つ目は、次世代シーケンサーを用いて Exome sequencing, RNA sequencing を行う。これらによって候補に挙げられた遺伝子について in vitro および in vivo で腫瘍原生能の検討を行い、ドライバー遺伝子を同定する。この遺伝子の発現を腫瘍検体を用いて免疫組織染色、遺伝子発現で確認する。最後に同定された遺伝子および下流シグナルをを標的とした治療効果を検討し創薬に直結する。これまで、東大病院では、デスマイド腫瘍に対して肥厚性瘢痕治療薬であるトラニラストを用いた探索的臨床試験を行っており、多施設に類をみない症例数の蓄積がある。また、東大病院倫理委員会に骨軟部腫瘍患者サンプルを用いた遺伝子発現解析、全ゲノム解析について承認を得ており、長年の腫瘍検体および血液資料を収集している。これらの資料を用いて、研究計画の内容について解析を進めているところである。また、希少な腫瘍であるが故に、関係病院および国内のがんセンターとの協力体制を築いているところである。現在遂行している骨軟部腫瘍のゲノム解析の共同研究施設と協力し、検体の収集を行う。

平成27年度

(1)デスマイド腫瘍の cDNA ライブラリーを用いたデスマイド腫瘍ドライバー遺伝子の探索

(1)-1 デスマイド腫瘍の cDNA ライブラリーの作成

デスマイド腫瘍の患者から得られた検体を使用して cDNA ライブラリーを作成する。腫瘍から 1 μ g の total RNA を抽出し、SMART cDNA library construction kit(Clontech)を用いて 1 kb 以上の cDNA の断片を持つ cDNA ライブラリーを作成する。

(1)-2 cDNA ライブラリーの細胞株への安定導入による腫瘍原生の検討

(1)-1 の cDNA ライブラリーをレトロウイルスベクターによりマウス線維芽細胞細胞株である NIH3T3 細胞に安定導入する。これを 2-4 週培養し、形質転換能を Focus formation assay によりスクリーニングする。これにより形質転換がみられた細胞から genomic DNA を抽出し、ウイルスベクターのプライマーを用いて PCR による遺伝子の増幅を行う。これをベクターに組み込んでシーケンシングを行い、腫瘍原生に関わる遺伝子の配列決定を行う。この遺伝子配列を Genbank™ データベースで BLAST search tool を利用して比較して遺伝子を同定する。さらにデータベースにある同定された遺伝子と正常遺伝子配列を比較し、転座、変異など遺伝子異常について解析する。

(2)次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析によるデスマイド腫瘍の遺伝子異常の探索

(2)-1 検体の採取・収集、個人情報管理

東大病院および関連施設において、ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査で承認を得た上で、

対象疾患の患者である研究資料提供者（以下、提供者）に研究についての説明をし、書面によるインフォームドコンセントを取得する。その後、手術による腫瘍サンプルの採取、提供者より試料（血液10ml）を採取し併せて研究に必要な診療情報を収集する。すでに手術治療を受け、腫瘍サンプルがある提供者の場合は、既存の腫瘍切除サンプル（凍結サンプルもしくはパラフィン包埋サンプル）を用いる。対象とする腫瘍サンプル数は15例を予定する。得られた試料もしくは既存の試料および診療情報は、東京大学医学部整形外科脊椎外科で収集・保存する。さらに、個人情報の管理は、東京大学企画情報運営部に依頼し、連結可能匿名化を行い、個人識別情報分担管理者がコードナンバーとして暗号化し、患者が特定されることが無いよう配慮する。

平成28年度以降

(2)-2 次世代シーケンサーによる解析

・ Exome sequencing

提供者の腫瘍サンプルと血液から抽出された Genomic DNA を断片化した後にエクソンキャプチャーを用いてエクソン領域を抽出する。次世代型シーケンサー（イルミナ社 GAIIX）で解析し、得られた核酸配列情報を既知のヒトゲノムデータベース上にマッピングする。各腫瘍サンプルと血液から得られた配列情報を比較する。これにより、ゲノムワイドな体細胞変異の有無を検出する。

・ RNA sequencing

提供者の腫瘍サンプルと市販のヒト間葉系幹細胞から抽出した total RNA を断片化した後に、cDNA を作成する。ペアエンドプライマーを用いて PCR を行った後に、次世代型シーケンサー（イルミナ社 GAIIX）で解析し、得られた核酸配列情報を既知のヒトゲノムデータベース上にマッピングし、比較する。これにより、染色体転座の有無、腫瘍特異的なアイソフォームの探索、腫瘍細胞特異的に発現している遺伝子、RNA 編集などを検出する。

平成28年度以降

(3) 同定された遺伝子による腫瘍原生成の検討

遺伝子の安定導入による腫瘍原生成の in vitro および in vivo での検討

候補遺伝子をマウス線維芽細胞細胞株である NIH3T3 細胞にレトロウイルスベクターを用いて安定導入する。遺伝子の安定導入を行った後に、腫瘍原生成の検討として、以下の項目を検討する。

- ・ MTT assay あるいは増殖曲線を用いた細胞増殖に関する検討
- ・ Scratch assay ならびに Boyden chamber による細胞遊走能に関する検討
 - ・ Matrigel coating chamber による組織侵入能に関する検討
 - ・ Soft agar assay による足場非依存性増殖の検討
- ・ ノドマウス造腫瘍能アッセイによる検討

(4) 腫瘍組織での免疫組織学的手法および遺伝子発現による発現確認

腫瘍細胞における候補遺伝子の発現を、今回解析に使用した検体および東大病院および関連施設から収集したパラフィン包埋固定された検体を用いて免疫組織染色で確認する。さらに、キメラ遺伝子、遺伝子変異などの遺伝子異常について凍結検体を用いて検討する。

(5) 同定された遺伝子を標的とした新規治療法の探索

同定された遺伝子を直接または、その下流シグナルを阻害する薬剤による治療効果を（3）であげた解析手法を用いて in vitro および in vivo で検討する。In vivo の実験では、薬剤投与による全身的な有害事象に留意して解析を行う。

4 . 研究成果

(1) デスモイド腫瘍の cDNA ライブラリーを用いたデスモイド腫瘍ドライバー遺伝子の探索

デスモイド腫瘍の検体から cDNA ライブラリー作成を行った。針生検体の一部から、デスモイド腫瘍のライブラリー作成を行ったが、検体量が不十分である、または腫瘍内の細胞成分が少ないなどの理由から十分な DNA 量が採取できず、ライブラリー作成に難渋した。これまで切除した検体および新規に切除した検体を用いて cDNA ライブラリーを作成した。作成した cDNA ライブラリーを NIH3T3 細胞に安定導入し、これを 2-4 週培養し、形質転換能を Focus formation assay によりスクリーニングを行った。cDNA ライブラリーの安定導入が安定して行えなかったこと、形質転換が見られるものが少なく、解析に難渋した。形質転換がみられた細胞から genomic DNA を抽出し、ウィルスベクターのプライマーを用いて PCR による遺伝子の増幅を行い、これをベクターに組み込んでシーケンシングを行い、腫瘍原生に関わる遺伝子の配列決定を行い、この遺伝子配列を Genbank™ データベースで BLAST search tool を利用して比較して遺伝子を同定した。

本研究期間中、合計 8 例の症例を用いて行い、4 つの形質転換が生じた細胞があり、これらを調べたところ、導入された遺伝子に共通性はなく、本実験によって、デスモイド腫瘍のドライバーとなる遺伝子変異の同定はなし得なかった。

(2) 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析によるデスモイド腫瘍の遺伝子異常の探索

研究開始時からデスモイド腫瘍の検体収集を行った。近年、デスモイド腫瘍は wait and see を基本方針としているため、腫瘍検体の収集に難渋した。これまで収集してあった検体については、患者にインフォームドコンセントを行い、同意を得た上で検体を使用した。これまで収集した症例および新規の症例の検体を用いて、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。結果として、既知の β -catenin 以外の遺伝子変異以外に反復してみられる変異が残念ながら同定できなかった。また、当院が参加しているゲノムコンソーシアムでもデスモイド腫瘍に対するゲノム解析を行うこととなった

こと、デスモイド腫瘍の新規症例がなかったことから、当研究での解析を中止した。また、主任研究者の移動に伴って、主任研究施設での研究での遂行が困難となり、研究が滞ったため研究費を返済することとした。

以上から、デスモイド腫瘍の cDNA ライブラリーを用いたデスモイド腫瘍ドライバー遺伝子の探索、また次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析によるデスモイド腫瘍の遺伝子異常の探索によってデスモイド腫瘍のドライバー遺伝子の同定は残念ながらなし得なかった。そのため、計画していた同定された遺伝子による腫瘍原生能の検討、腫瘍組織での免疫組織学的手法および遺伝子発現による発現確認、同定された遺伝子を標的とした新規治療法の探索は行わなかった。

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〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 寛

ローマ字氏名：(Hiroshi Kobayashi)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 20407951

研究分担者氏名：澤田 良子 (2017年3月29日異動のため削除)

ローマ字氏名：(Ryoko Sawada)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：病院診療医

研究者番号(8桁): 30648308

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。