

令和元年6月12日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10775

研究課題名(和文) 上衣腫におけるTERT発現機序の解明と新規標的治療の開発に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of TERT expression and development of a novel targeted therapy in ependymomas

研究代表者

市村 幸一 (ICHIMURA, KOICHI)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：40231146

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)：多数の上衣腫検体に対してRELA融合遺伝子とTERT発現を調べ、高発現を認めた。TERT promoterのrs2853669、C228TまたはC250T 変異を含むルシフェラーゼベクターを作成しTERTの転写活性を調べたところ、TERT promoter 長に応じてこれらの変異やSNPにより異常な転写活性上昇が生じることを明らかにした。マウス上衣腫モデルを作成するために、レンチウイルスによる遺伝子導入システムを用いてRELA融合遺伝子とCdkn2a遺伝子に対するsgRNAをNestin-Cre;Cag-Cas9マウス脳に導入を行ったところ、ヒト上衣腫に類似したマウス脳腫瘍の誘導が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、100例あまりの上衣腫検体においてTERTの発現、プロモーターの点突然変異及びメチル化、TERTコピー数異常、遺伝子再配列に対して詳細な解析を行い、TERT高発現の頻度とその機序を精査した。また、TERT promoter長やその領域の点変異やSNPの有無とTERTの転写活性変化の関連性を検討した。またRELA融合遺伝子の導入によるマウス上衣腫のモデルを作成した。本研究の成果は、マウスモデルを用いたTERT標的治療の効果の検証等による上衣腫に対する新規治療標的探索研究への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated a large number of surgical ependymoma samples for the presence of RELA-fusion and TERT expression. We found RELA-fusion in the majority of supratentorial ependymomas and elevated TERT expression in all of them. To investigate the mechanism of TERT overexpression, we generated a luciferase construct with TERT promoter mutations or rs2853669 SNP. We found that the transcriptional activity of TERT promoter affected by the mutations or SNP was variable according to the length of the promoter region. In order to make a mouse model of ependymoma, we generated conditional double transgenic mouse by mating Nestin-Cre and Cag-Cas9 mouse and lentivirally introduced a RELA-fusion together with a sgRNA for Cdkn2a into the mouse brain. This resulted in development of mouse brain tumors that histologically resembles human ependymomas.

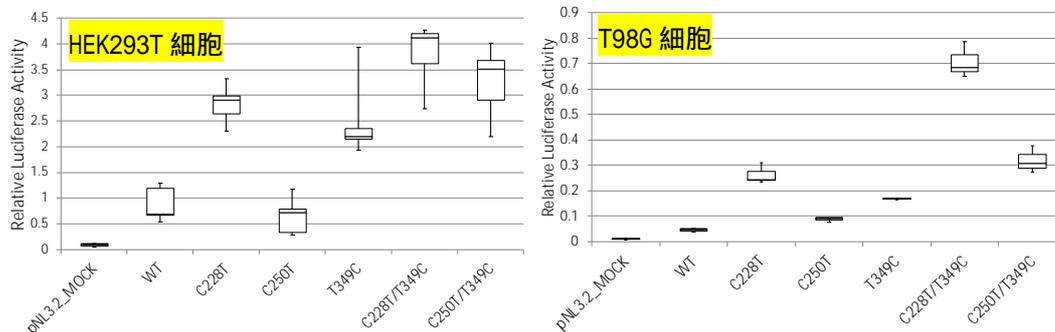
研究分野：神経腫瘍学

キーワード：上衣腫 融合遺伝子 RELA TERT トランスジェニックマウス マウス脳腫瘍モデル レンチウイルス

2) ルシフェラーゼアッセイによる TERT 発現制御領域の精査

上記の遺伝子解析では、TERT promoter の点突然変異は 113 例中 3 例にのみ認められた。これより、上衣腫における TERT の発現亢進は、点突然変異とは異なる機序により生じていることが示唆された。以前、点突然変異上流の SNP (rs2853669) が TERT promoter の点突然変異と相互作用を持つことにより TERT の発現調節に関わっていることが報告された。そこで、TERT promoter mutation と rs2853669 の関係を探る目的で、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。TERT promoter の 311 塩基と exon 1 の 163 塩基を含む 474 塩基 (TERT core promoter) の領域をクローニングし、rs2853699 の SNP の T または C (T349C)、および C228T と C250T の変異を導入したベクターを構築した。そして、これらのベクターをそれぞれ HEK293T および T98G 細胞に図に示す組み合わせで導入したところ、C228T では SNP の状態に関わらずプロモーターの活性化が認められたが、C250T は rs2853669 が C variant であったときのみ活性の亢進を認めた (Figure 2)。

Figure 2. Luciferase reporter assay of TERT core promoter (474 塩基)



続いて私たちは、TERT の転写活性制御の機序をさらに精査するために、474 塩基の TERT core promoter 領域に TERT promoter の上流を含めた 2.5kb の領域のルシフェラーゼレポーターベクターを構築した。そして、rs2853669 の SNP (T349C) と C228T, C250T の TERT promoter mutation の有無で 6 通り組み合わせにて、同様に TERT の転写活性に対する影響を HEK293T 細胞にて精査した。興味深いことに、C250T を持つコンストラクトで TERT promoter の転写活性の上昇を認めた。一方で、rs2853669 の variant T349C による発現増強作用は認めなかった (Figure 3)。これらは TERT promoter core region (474bp) のベクターと比較して異なる結果であった (Figure 2)。以上の解析より、TERT の転写活性は、SNP、C228T や C250T により影響されることに加えて、さらに、これらの転写活性異常は TERT の promoter 領域の配列によりさらに影響され、TERT promoter 領域配列の複雑な遺伝子発現制御機序の存在が示唆された。現在 rs2853669 の genotyping のアッセイを構築しており、上衣腫において rs2853669 の SNP と TERT 発現との関係を調べるとともに、その機序の解明を検討している。なお、これらの上衣腫の臨床検体における、RELA 融合遺伝子を持つ上衣腫に TERT 発現の著しい上昇があるという結果については論文化し、報告を行った。

3) 上衣腫モデルの作成

続いて、上衣腫における融合遺伝子と TERT の上衣腫発生機序における役割を検討するために、私たちはヒト腫瘍組織より培養細胞株や PDX の樹立を試みた。しかしながら、困難であるとの過去の報告と同様に、当研究室における試みも樹立には至らなかった。そこで、PDX による上衣腫モデルに替えて、遺伝子導入による上衣腫動物モデルの作成を検討することにした。

最近、私たちは RELA 融合遺伝子が単独でヒト上衣腫に類似した脳腫瘍を誘導できるがん遺伝子であることを RCAS/tv-a 技術によるトランスジェニックマウスを使ったモデルを用いて明

Figure 1B. TERT expression in ependymomas (PFA and PFB; posterior fossa type A and B ependymoma, RELA (-) and (+) ST; RELA fusion negative and positive supratentorial ependymoma)

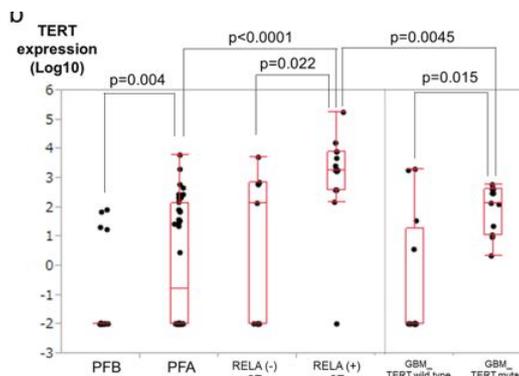
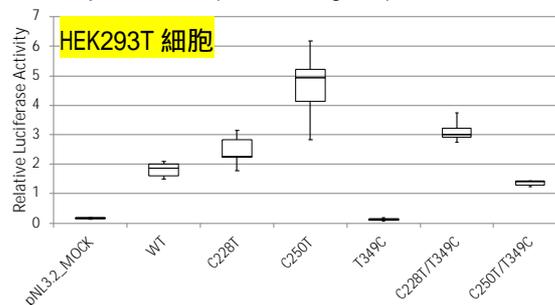
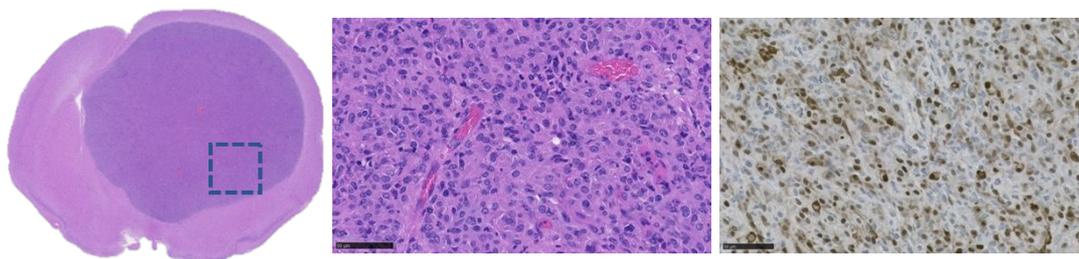


Figure 3. Luciferase reporter assay of TERT promoter (2.5kb region)



らかにした。そこで、レンチウイルスによる遺伝子導入システムを用いた上衣腫モデルの確立を行ない、TERT の発現異常と上衣腫発生機序の関連性について検討を行うこととした。はじめに、脳腫瘍関連遺伝子の導入やがん抑制遺伝子の不活化を脳腫瘍の発生起源と考えられている神経幹細胞に特異的に達成するために、Nestin-cre マウスと Cag-Cas9 マウスの交配によるコンディショナルダブルトランスジェニックマウスを作成した。当該系統の交配・継代や表現型に問題がないことが確認できたことから、続いて、RELA 融合遺伝子をレンチウイルスの成体マウスや新生仔マウス脳(Nestin expressing cell of origin)への注入により導入を行った。また、RELA 融合遺伝子陽性上衣腫では、CDKN2A 遺伝子の変異が好発することから、CDKN2A 遺伝子に対する sgRNA を作成し、そのレンチウイルスを脳内に注入し CDKN2A 遺伝子のノックアウトも同時に行った。その結果、RCAS/tv-a 技術を用いて観察を行った我々の以前の報告と同様に、RELA 遺伝子の導入後約 2 ヶ月頃にヒト上衣腫に類似したマウス脳腫瘍の誘導が観察され、本モデルシステムが十分に機能することが確認された (Figure 4)。なお、CRISPR-Cas9 技術による CDKN2A 遺伝子不活化は本モデルマウス脳より樹立した Neurosphere line を用いた実験で確認できた。現在、RELA 融合遺伝子に加えて YAP1 融合遺伝子の脳腫瘍誘導能の検討も進めており、これらの上衣腫融合遺伝子の導入を行ったマウスの表現型の観察を行なっている。さらに、CRISPR-Cas9 技術を用いてマウス脳内で染色体・遺伝子再構成を行い内因性の RELA 融合遺伝子を誘導する脳腫瘍モデルの作成も試みている。これまでに、培養細胞にて内因性の RELA 融合遺伝子の誘導に成功したことから、関連レンチウイルスをマウス脳内に注入し同様に脳腫瘍の発生を観察している。将来的には、上記実験より再現性のある上衣腫モデルが確立された場合には、本モデルを用いて引き続き TERT の発現検討やエリブリンの抗腫瘍効果を調べるとともに、あらたな治療法の開発研究に応用し、上衣腫の治療標的の同定を目指し

Figure 4. Representative images of H&E stain (Left and middle panels) and RELA immunostaining (Right panel) for mouse ependymoma lentivirally induced with RELA fusion and Cdkn2a loss.



ていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Fukuoka K, Kanemura Y, Shofuda T, Fukushima S, Yamashita S, Narushima D, Kato M, Honda-Kitahara M, Ichikawa H, Kohno T, Sasaki A, Hirato J, Hirose T, Komori T, Satomi K, Yoshida A, Yamasaki K, Nakano Y, Takada A, Nakamura T, Takami H, Matsushita Y, Suzuki T, Nakamura H, Makino K, Sonoda Y, Saito R, Tominaga T, Matsusaka Y, Kobayashi K, Nagane M, Furuta T, Nakada M, Narita Y, Hirose Y, Ohba S, Wada A, Shimizu K, Kurozumi K, Date I, Fukai J, Miyairi Y, Kagawa N, Kawamura A, Yoshida M, Nishida N, Wataya T, Yamaoka M, Tsuyuguchi N, Uda T, Takahashi M, Nakano Y, Akai T, Izumoto S, Nonaka M, Yoshifuji K, Kodama Y, Mano M, Ozawa T, Ramaswamy V, Taylor MD, Ushijima T, Shibui S, Yamasaki M, Arai H, Sakamoto H, Nishikawa R, Ichimura K; Japan Pediatric Molecular Neuro-Oncology Group (JPMNG). “Significance of molecular classification of ependymomas: C11orf95-RELA fusion-negative supratentorial ependymomas are a heterogeneous group of tumors.” *Acta Neuropathol Commun*. 2018 Dec 4;6(1):134. doi: 10.1186/s40478-018-0630-1.
2. Sasaki A, Hirato J, Hirose T, Fukuoka K, Kanemura Y, Hashimoto N, Kodama Y, Ichimura K, Sakamoto H, Nishikawa R. “Review of ependymomas: assessment of consensus in pathological diagnosis and correlations with genetic profiles and outcome.” *Brain Tumor Pathol*. 2019 Mar 30. doi: 10.1007/s10014-019-00338-x. [Epub ahead of print]
3. Pajtler KW, Mack SC, Ramaswamy V, Smith CA, Witt H, Smith A, Hansford JR, von Hoff K, Wright KD, Hwang E, Frappaz D, Kanemura Y, Massimino M, Faure-Contier C, Modena P, Tabori U, Warren KE, Holland EC, Ichimura K, Giangaspero F, Castel D, von Deimling A, Kool M, Dirks PB, Grundy RG, Foreman NK, Gajjar A, Korshunov A, Finlay J, Gilbertson

RJ, Ellison DW, Aldape KD, Merchant TE, Bouffet E, Pfister SM, Taylor MD. "The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants." **Acta Neuropathol** 133(1):5-12, 2017

〔学会発表〕(計 2件)

1. Molecular classification of supratentorial and posterior fossa ependymomas、市村幸一、第59回日本小児血液・がん学会、2017
2. Significance of molecular classification of ependymomas、市村幸一、日本脳腫瘍病理学会、2018

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔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：小澤達也

ローマ字氏名：Tatsuya Ozawa

所属研究機関名：国立がん研究センター研究所

部局名：脳腫瘍連携研究分野

職名：主任研究員

研究者番号(8桁)：80296483

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高寺睦見

ローマ字氏名：Mutsumi Takadera

※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。