

令和元年8月29日現在

機関番号：82402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07371

研究課題名(和文)がん細胞のゲノム安定性におけるミスマッチ修復の役割

研究課題名(英文)Roles of Mismatch Repair in genome stability of cancer cells

研究代表者

宮部 泉(Miyabe, Izumi)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 腫瘍診断・予防科・研究員

研究者番号：20800155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはマイクロサテライト不安定性検査について陽性の大腸がん和陰性の大腸がんについて前途ランスクリプトーム解析を行い、融合遺伝子の検出を試みた。その結果、陽性の大腸がんのうち73.5%、陰性の大腸がんのうち33.3%から計79種類の融合遺伝子が検出された。それらのうち12種類は十分なシーケンスデータに裏付けられており、12種類のうち5種類は既知、7種類は新規の融合遺伝子だった。既知の5種類に関してはすでに臨床試験が行われている。したがって、新規の7種類についても今後詳細な解析を行うことによって新規分子標的薬の開発など臨床的に利用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、融合遺伝子の形成がミスマッチ修復欠損(マイクロサテライト不安定性検査陽性)の大腸がん、より高頻度で起こっていることが示された。これまでミスマッチ修復欠損のがんでは染色体は安定に保たれていると考えられていたが、局所的な染色体異常が引き起こされていることが本研究により明らかになった。このことはヒト細胞においてミスマッチ修復がある種の染色体異常を抑制していることを証明するものである。また本研究により、大腸がんにおいて7種類の新規融合遺伝子の検出に成功した。これらの新規融合遺伝子は今後詳細な解析を行うことによって、新規分子標的薬の開発など臨床的に利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have carried out whole transcriptome analyses for both microsatellite unstable and stable colorectal cancers to detect fusion genes caused by chromosomal rearrangements. We successfully found 79 fusion genes from 73.5% and 33.3% of microsatellite unstable and stable cancers, respectively. Out of the 79 fusion genes, 12 are supported by sufficient sequence evidence. 5 of them are already known and under clinical trials. The others have not been reported to the best of our knowledge. Therefore, fusion genes we newly identified in this study are potential candidates of new therapeutic targets. In addition, further investigation is required to elucidate the mechanisms underlying elevated formation of fusion genes in microsatellite unstable cancer and involvement of the mismatch repair pathway in formation of chromosomal rearrangements.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ミスマッチ修復 マイクロサテライト不安定性 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を正確に複製し、次世代に継承することは生命にとって必須であり、DNA複製時に生じるエラーは突然変異や発がんの原因となる。DNA複製酵素は非常に特異性が高く、正確にDNAを複製することができるが、それでも低い頻度で誤った塩基を挿入し、DNA中にミスマッチを生じることがある。ミスマッチが修復されずにそのままDNA中に残ると次のサイクルの複製で突然変異が固定される。そのため細胞はDNA中のミスマッチを修復するミスマッチ修復(MMR)機構を備えており、突然変異頻度を最小限に抑えている。ヒトにおいてミスマッチ修復は細胞のがん化と密接に関係している。大腸がんの約15%でMMRの機能異常が見られ、また生殖細胞系列におけるMMR関連遺伝子の変化はリンチ症候群と呼ばれる常染色体優性の遺伝性大腸がんを引き起こす。リンチ症候群は我が国における主要な遺伝性腫瘍の一つであり、その発症や進行過程のメカニズムを解明することは大きな課題である。

MMRはDNA複製によって生じるミスマッチだけでなく、相同組換えの際に生じるミスマッチも認識し、不完全な相同配列間での組換えを抑制する働きがあることが知られている(Nature, 460, 246-249, 2009)。実際、酵母のMMR欠損株においては不完全相同配列間での組換えによる染色体再編成が増大することが報告されている。しかしヒトにおいてMMR機能異常のがん細胞では染色体不安定性の指標の一つである遺伝子のコピー数変化はそれほど高くない。染色体はむしろ安定であるとされている。MMR関連タンパク質の酵素活性や機能は酵母からヒトまで高度に保存されており、染色体安定性に対するMMRの影響が酵母とヒトでこれだけ大きく異なる原因は知られていない。

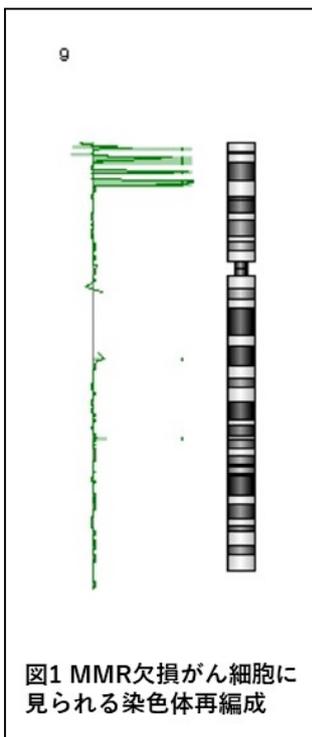
染色体再編成は転座、欠失、重複などのようなゲノム配列の大きな変化で、がん細胞や老化細胞で蓄積している。このような大きな変化が起こることによってがん化責任遺伝子(ドライバー遺伝子)となる融合遺伝子が生じることが知られており、その生成の分子機構を解明することは将来的な治療法や分子標的薬の開発につながる。

2. 研究の目的

本研究の目的は染色体再編成に注目して、MMRのゲノム安定性に対する役割を解明することである。前述の背景からこれまでの研究ではがん細胞における染色体再編成の検出が不十分であることが考えられる。そこで本研究ではこれまで検出できなかった染色体再編成を網羅的に解析する。具体的にはMMRに関して正常と機能異常のがん細胞からそれぞれの染色体再編成を同定し、その接合点近傍の配列から再編成を引き起こす分子機構を推測する。MMR機能異常で有意に増大している型の再編成の形成は正常細胞ではMMRによって抑えられていると考えられる。そこでそれを検証するために培養細胞を用いて該当する型の再編成を効率的かつ特異的に検出する系を構築する。その系を用いてMMRの染色体再編成への関与を検証するところまでを期間内の目標とする。

3. 研究の方法

(1) まず患者から摘出された大腸がんからマイクロサテライト不安定性(MSI-H)を指標としてMMR欠損のがんを単離し、アレイCGH法による遺伝子のコピー数変化を検出する。高解像度で検出できるアレイを用いることによって染色体全体の欠失や重複だけでなく、<10-20kbの欠失、重複を検出する。

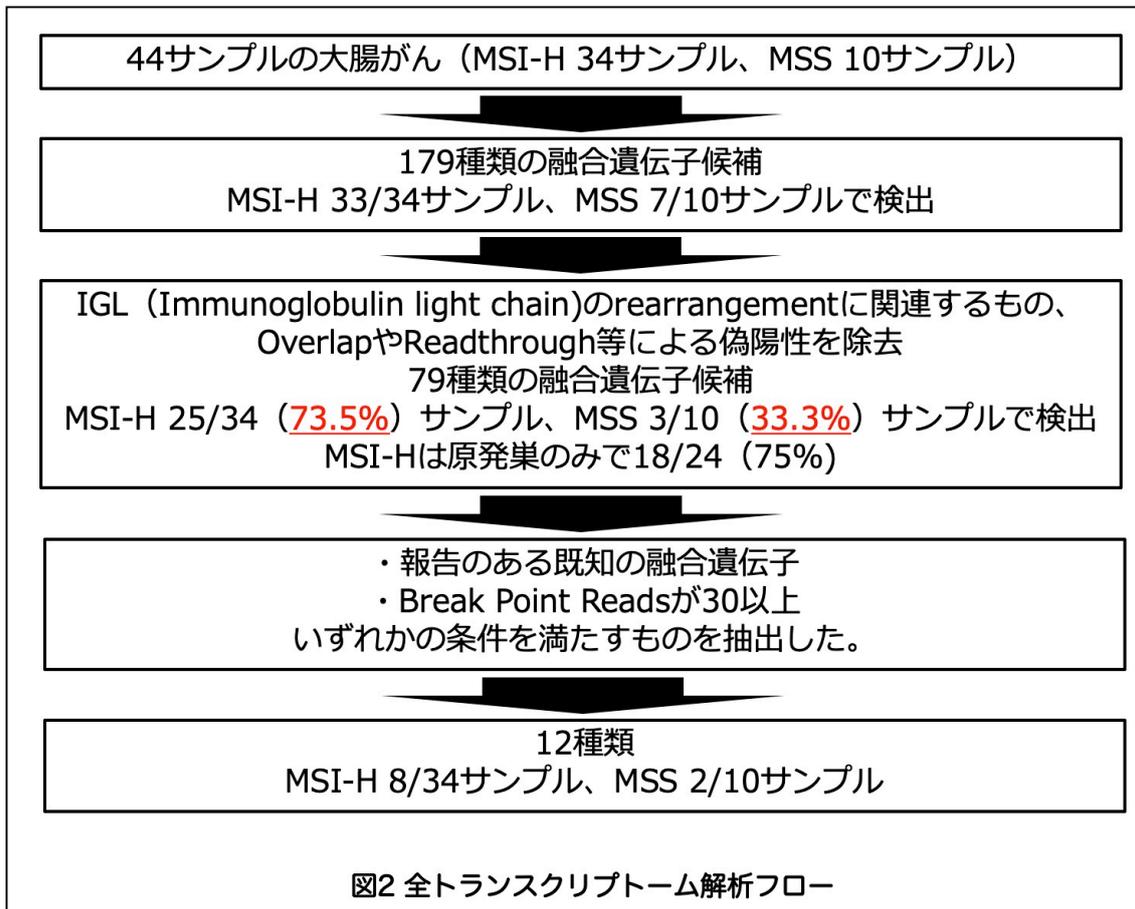


(2) また、上記のMSI-H大腸がんを用いて全トランスクリプトーム解析を行うことによって融合遺伝子の検出を行う。融合遺伝子の生成頻度をMSS(MMRに関して正常)のがんと比較することによって染色体再編成におけるMMRの影響と役割を検証する。さらに得られた融合遺伝子について臨床的に応用可能なものがあるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 我々はまずMMR欠損の大腸がんをマイクロサテライト不安定性(MSI-H)を指標として単離し、アレイCGH法による遺伝子のコピー数変化を検出することを試みた。10サンプルのMSI-H大腸がんを単離し、コピー数変化を伴う染色体再編成の同定を試みた。その結果、全染色体の欠失や重複などの大規模な変化は検出されなかったが、局所的なコピー数変化が検出された(図1)。この結果からこれまで染色体が安定に保たれるとされていたMMR欠損のがん細胞においても特定の染色体異常が高頻度で起きていることが示唆された。

(2) また、上記のMSI-H大腸がんを用いて全トランスクリプトーム解析を行い、染色体再編成によって生じる融合遺伝子の検出を試みたところ、10サンプルのMSI-H大腸がんから5種類の融合遺伝子候補が検出された。このことはMMR欠損によって融合遺



伝子の形成が促進されていることを示唆している。その仮説を検証するため、さらに 34 サンプルの MSI-H 大腸がん と 10 サンプルの MSS (マイクロサテライト安定、MMR に関して正常) 大腸がんを追加してトランスクリプトーム解析を行った (図 2)。まず、全 44 サンプルの大腸がんから 179 種類の癒合遺伝子候補が単離された。これらのうち、偽陽性がうたがわれるものを除去したところ、79 種類が候補として残った。それらの候補は MSI-H 大腸がんの 73.5% (25/34)、MSS 大腸がんの 30.0% (3/10) から得られた。この結果は MMR 欠損の大腸がんにおいて、より高頻度で融合遺伝子が形成されていることを示しており、正常細胞においては MMR 機構によって染色体再編成が抑制され、融合遺伝子等の異常が生じないように制御されていることを示している。

以上で得られた 79 種類の融合遺伝子のうち、十分なシーケンスデータに裏付けられた 12 種類を抽出した (表 1)。これらのうち 5 種類はすでに学術論文等で報告されている既知融合遺伝子で、残りの 7 種類は新規の融合遺伝子である。

GR No.	Fusion Genes	P or M	MSI	Location	Break Point Reads	Total Spanning Reads	Fusion Point	Direction
1054	NCOA4-RET	P	MSI-H	Int (chr10)	45	100	exon9/exon12	←←
3478	KIAA0196-ADCY8	M	MSI-H	Int (chr8)	13	87	exon28/exon10	←←
4177	ELP2-FHOD3	P	MSI-H	Int (chr18)	33	44	—	→→
4276	TPM3-NTRK1	M	MSI-H	Int (chr1)	1589	2695	exon7/exon9	↔
4276	PPF1BP1-CCDC91	M	MSI-H	Int (chr12)	31	62	exon24/exon8	→→
6471	KANK1-NTRK3	P	MSI-H	ext (chr9-chr15)	16	41	exon7/exon14	→←
6472	KANK1-NTRK3	M	MSI-H	ext (chr9-chr15)	53	111	exon7/exon14	→←
7736	EIF3E-RSP02	P	MSI-H	Int (chr8)	22	55	exon1/exon2	→→
3149	ZNF141-OTF21RD1P1	P	MSS	ext (chr4-chr7)	116	143	exon3-exon10	→←
311	TXNDC11-ZC3H7A	P	MSS	Int (chr6)	81	234	exon4/exon22	←←
311	POLR1D-FLT1	P	MSS	Int (chr13)	69	67	exon1/exon11	→←
311	PTPRK-RSP03	P	MSS	Int (chr6)	21	30	exon6/exon2	↔

表 1 本研究で単離された融合遺伝子

表中に赤字で記したものはすでに報告されている融合遺伝子で、黒字で記されているものが新規の融合遺伝子である。既知融合遺伝子はすでに臨床試験が始まっている融合遺伝子である。したがって、本研究で同定した新規融合遺伝子についても今後詳細な解析を行うことによって新規分子標的薬の開発など臨床的に応用できる可能性がある。

融合遺伝子の形成において染色体内、染色体間あるいは遺伝子の向きに関して MSI-H と MSS の間で大きな違いは見られなかった。MMR による染色体再編成の抑制機構を解明するためにはさらに詳細な研究が必要である。

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 1 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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。