

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11277

研究課題名(和文)トランスポゾンスクリーニングによる子宮平滑筋肉腫のドライバー遺伝子同定と機能解析

研究課題名(英文) Sleeping Beauty Transposon mutagenesis screen for identifying driver genes in uterine leiomyosarcoma

研究代表者

小玉 美智子 (Kodama, Michiko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70791391

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)：子宮平滑筋肉腫は非常に悪性度が高い希少悪性腫瘍であり、発症や転移の機序に不明な点が多く確立された治療法が存在しない。我々はSBトランスポゾン挿入変異により子宮平滑筋肉腫を発生する新規マウスモデルより、発癌及び血行性肺転移に関与する候補遺伝子群を同定した。ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株を使用し、候補遺伝子発現減弱による細胞増殖抑制、遊走能低下、幹細胞性抑制を確認した。また、ヒト子宮平滑筋肉腫の原発・転移組織において、候補遺伝子が高発現することを確認した。SBトランスポゾンスクリーニングで示されたマウス子宮平滑筋肉腫発生・増悪に関与した遺伝子が、ヒト平滑筋肉腫においても治療標的であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非常に悪性度が高い希少悪性腫瘍である子宮平滑筋肉腫に対する治療は確立されておらず、予後不良な疾患であり、新たな治療戦略の発見が望まれている。本研究によって得られた成果は、子宮平滑筋肉腫に対する新たな治療標的を示し、予後の改善に繋がる可能性がある。

希少疾患であることから本疾患のみからなる大規模な遺伝子プロファイルデータセットは存在せず、また将来的にも困難であると予想され、発症・増悪に関与する遺伝子異常の同定は極めて難しい。その点でもSBトランスポゾンによるフォワードジェネティクス手法が非常に効果的に機能した、有意義な研究となった。

研究成果の概要(英文)：Uterine leiomyosarcoma is a rare malignant tumor with extremely high aggressiveness. There are no standard treatments because the mechanism of its onset and metastasis have not been clarified. We identified several candidate genes involved in sarcomagenesis and hematogenous lung metastasis from a novel mouse model that developed uterine leiomyosarcoma by SB transposon insertional mutagenesis. Using human uterine leiomyosarcoma cell lines, it was confirmed that cell proliferation was suppressed, migration was reduced, and stemness was suppressed by inhibiting candidate genes. In addition, it was confirmed that the candidate gene was highly expressed in primary and metastatic tissues of human uterine leiomyosarcoma. The gene involved in the development and progression of mouse uterine leiomyosarcoma identified by SB transposon screening was shown to be a therapeutic target also in human leiomyosarcoma.

研究分野：婦人科悪性腫瘍、子宮平滑筋肉腫、フォワードジェネティクススクリーニング

キーワード：トランスポゾン スクリーニング 子宮平滑筋肉腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋肉腫は急速に増大し、かつ早期から血行性転移を来す、極めて悪性度の高い腫瘍である。本邦における予後報告では、全病期における50%生存期間は31ヶ月である。限局性腫瘍、または孤発性の遠隔転移病変については手術が適応となるものの、腹腔内再発あるいは遠隔転移が50%以上に生じるとされ、前者では平均全生存期間が28.4ヶ月、後方で12.5ヶ月と極めて予後不良の疾患である。子宮平滑筋肉腫に対する術後化学療法・放射線療法の有効性を支持する高いエビデンスはなく、手術以外に有効な治療手段は存在しないのが現状である。

現時点で推奨される化学療法としては、ドキソルビシン単剤療法あるいはドセタキセル・ゲムシタピン併用療法である。他の選択肢として、イホスファミド、トポテカン、パクリタキセル、シスプラチン、エトポシドなどが単剤療法として行われた報告はあるが、奏効率0-17%、中央生存期間は6-9ヶ月に過ぎない。前述の推奨されるゲムシタピン・ドセタキセル併用療法ですら、報告では奏効率53%、中央生存期間17.9ヶ月であり、エビデンスレベルは2Aと高くはないのが現状である(Hensley ML, J Clin Oncol 2002)。昨今の新しい治療選択肢として、本邦では再発悪性軟部腫瘍(子宮平滑筋肉腫も含む)に対してパゾパニブ、トラベクタジン、エリブリンが使用可能となっているが、効果は無増悪生存期間が各々4.6か月、4.0か月、2.6ヶ月と極めて限定的である(論文 van der Graaf WT, Lancet 2012, Demetri GD, J Clin Oncol 2016, Schoffski P, Lancet 2016)。

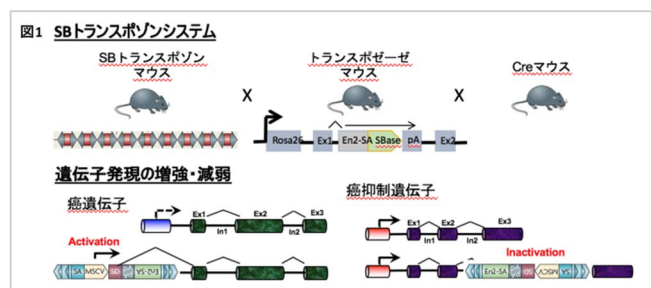
昨今、国際的プロジェクトとして各種癌に対する遺伝子解析データセットの構築が行われてきた。しかし、希少疾患においては、そもそも大規模な症例集積が困難である。子宮平滑筋肉腫を含んだ悪性軟部腫瘍は希少疾患である上に、組織型が様々な存在する為、2017年にがんゲノムアトラスグループによって報告された悪性軟部腫瘍についての網羅的遺伝子変異データベースは、肉腫のうち6組織型を対象として報告されたものであった(Cancer genome atlas program office, Cell 2017)。同報告では悪性軟部腫瘍における遺伝子プロファイルは組織型により非常に異なる事が示されており、治療戦略は組織型によって確立すべきかもしれないが、子宮平滑筋肉腫のみを対象とした症例集積によるデータセット構築は将来的にも難しいと予想され、また大規模臨床試験も症例集積の点で困難であり、新たな治療法を如何に見出すかが課題である。

2. 研究の目的

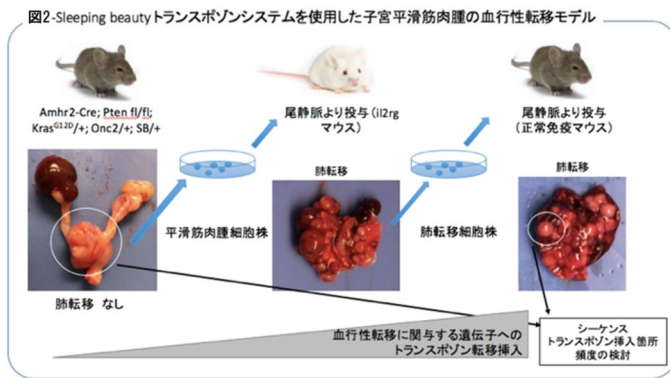
子宮平滑筋肉腫に対する新規治療戦略を見出す事を目的として行った、Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンを用いた in vivo スクリーニングで同定された、疾患発症・血行性肺転移に関与する候補遺伝子について、その機能と役割を解明することである。

3. 研究の方法

SB トランスポゾンスクリーニングとは、ゲノムワイドに無作為に遺伝子変異を起こし、免疫正常マウスの発癌を誘導し、発癌に関与した癌遺伝子を同定する手法である。臓器特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス、Cre リコンビナーゼによって発現が制御されるトランスポゼースを有するマウス、高コピーの Sleeping Beauty (SB) トランスポゾン を有するマウスを組み合わせると、標的臓器特異的に、無作為に SB トランスポゾンが転移挿入を繰り返す SB マウスが得られる(図1)。SB トランスポゾンは、転移先の遺伝子発現を挿入



位置・方向依存的に減弱・増強させるように内部の塩基配列が設計されており、癌遺伝子発現増強あるいは癌抑制遺伝子発現減弱が生じて survival advantage を獲得した細胞は増殖し、発癌するシステムである(図1)。発症した数十腫瘍のトランスポゾン挿入部位を次世代シーケンサーにより同定し、発癌に寄与した遺伝子変異を同定・解析することによって、これまでに複数の癌種において癌遺伝子スクリーニングが行われてきた。我々は子宮平滑筋細胞特異的に Pten 欠失・Kras 活性化を生じるマウスをベースに、同じく同細胞特異的にトランスポゾンによる遺伝子発現増減を起こすマウスモデル (Amhr2/SB/Pten/Kras マウス) を確立したところ、子宮平滑筋肉腫が発生し、それらの腫瘍から得た DNA を次世代シーケンサーで解析し、SB トランスポゾンが挿入変異を起こした遺伝子、すなわち腫瘍発生に關与した 19 候補遺伝子を同定した。また、図2のような血行性転移モデルを作成し、肺転移に關与する候補遺伝子の同定も行った。マウス子宮平滑筋肉腫から作成した細胞株を、免疫不全マウス尾静脈から投与し、肺転移形成を確認、肺転移巣から再度細胞株を樹立し、これを免疫正常マウスに尾静脈投与して得られた肺転移巣から DNA を抽出し、前述同様に解析を行い、3 候補遺伝子を同定した。



4. 研究成果

平滑筋肉腫発生に關する 19 候補遺伝子リストにおいては、有意に既知のガン遺伝子が含まれており ($p=3.08E-17$)、今回同定された候補遺伝子にこれまでに明らかとされていないがん遺伝子が含まれていることが示唆された。これら 19 候補遺伝子のうち、トランスポゾン挿入パターンから癌遺伝子として機能すると予測される遺伝子について検証を開始した。その中でもドライバー遺伝子解析により、ドライバー遺伝子として高頻度の変異が認められたジンクフィンガー蛋白の一つ ZNF217 に着目した。ZNF217 は乳癌において癌遺伝子として機能することが報告されているが、これまでに子宮平滑筋肉腫に置いての機能は明らかにされていない。ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株 SK-UT1, SK-LMS1, SKN を使用して、siRNA を用いた遺伝子阻害により、MTS アッセイ、細胞数カウントアッセイにて、有意に細胞増殖能が抑制されることを確認した。また、スクラッチアッセイにて、ZNF217 阻害は有意に細胞遊走能を低下させることが示された。コロニー形成アッセイにて細胞増殖能について検討を試みたが、非常に細胞株の遊走能が高いため、評価が困難であり、軟寒天コロニー形成アッセイを行ったところ、ZNF217 抑制は有意にコロニー形成を抑制し、足場非依存性細胞増殖能を抑制しうることが示された。そこで、足場非依存性細胞増殖能に ZNF217 が關与するのであれば、がん幹細胞化についても影響を及ぼすのではないかと考え、非接着性プレートでの腫瘍スフィア形成アッセイを行ったところ、スフィア形成を ZNF217 抑制が有意に抑制することがわかった。

一方、肺転移に關与する候補遺伝子として、NRDC に着目した。NRDC はナルディライジンをコードする遺伝子であり、膜貫通型蛋白を細胞膜近傍で切断し、細胞外領域を放出させるシェディングを増強させる機能を持っている。ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株を用いた in vitro アッセイにおいて、同遺伝子阻害により細胞増殖能は変化しなかったが、細胞遊走能及び接着能が有意に抑制された。

これらの候補遺伝子について、当院での子宮平滑筋肉腫症例のパラフィン包埋ブロック組織を用い、原発腫瘍・転移巣組織において免疫染色を行い、同定された遺伝子がヒト腫瘍組織においても、高発現することを確認した。SB トランスポゾンスクリーニングで示されたマウス子宮平滑筋肉腫発生・増悪に関与した遺伝子が、ヒト平滑筋肉腫においても治療標的になりうることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Michiko Kodama, Kosuke Yoshihara, Aya Nakae, Kae Hashimoto, Seiji Mabuchi, Kenjiro Sawada, Tadashi Kimura.
2. 発表標題 In vivo loss of function screen with pooled shRNA library identifies KPNB1 as a new drug target for epithelial ovarian cancer
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Michiko Kodama, Takahiro Kodama, Justin Y. Newberg, Jean C. Tien, Roberto Rangel, Aya Nakae, Kae Hashimoto, Seiji Mabuchi, Kenjiro Sawada, Tadashi Kimura, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland.
2. 発表標題 Sleeping Beauty transposon mutagenesis screen identifies cancer genes of uterine leiomyosarcoma driving sarcomagenesis and lung metastasis.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michiko Kodama, Hiroko Shimura, Aya Nakae, Kae Hashimoto, Seiji Mabuchi, Kenjiro Sawada, Tadashi Kimura.
2. 発表標題 Sleeping beauty transposon insertional mutagenesis identified driver genes of uterine leiomyosarcoma.
3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (International Gynecologic Cancer Society) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉美智子 中江彩 志村寛子 橋本香映 馬淵誠士 澤田健二郎 木村正
2. 発表標題 トランスポゾンを用いたマウス子宮平滑筋肉腫発症に関与するドライバー遺伝子のスクリーニング
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michiko Kodama, Takahiro Kodama, Justin Y. Newberg, Jean C. Tien, Roberto Rangel, Aya Nakae, Tadashi Kimura, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins.
2. 発表標題 Sleeping Beauty transposon insertional mutagenesis screen of uterine leiomyosarcoma identified cancer genes driving sarcomagenesis.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉美智子 中江彩 吉原弘祐 橋本香映 澤田健二郎 木村正
2. 発表標題 Sleeping beauty transposon mutagenesis screen identified cancer genes driving sarcomagenesis and metastases of uterine leiomyosarcoma
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小玉美智子
2. 発表標題 平滑筋肉腫の新しい動物モデルを用いたゲノム解析
3. 学会等名 第4回日本肉腫学会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro) (00452392)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	馬淵 誠士 (Mabuchi Seiji) (00452441)	奈良県立大学・医学部・講師 (24601)	
研究分担者	橋本 香映 (Hashimoto Kae) (90612078)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究協力者	吉原 弘祐 (Yoshihara Kosuke) (40547535)	新潟大学・大学院医歯学総合研究科・助教（兼任）研究准教授 (13101)	
研究協力者	中江 彩 (Nakae Aya)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	志村 寛子 (Shimura Hiroko)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	