

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15011

研究課題名(和文)腫瘍の悪性進展過程における筋特異的カベオラ蛋白質MURCの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the caveola-specific protein during tumor progression

研究代表者

丹下 正一郎(Tange, Shoichiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40571211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、癌腫横断的に予後マーカーとなりうる遺伝子の候補として特定した遺伝子の解析を行ったものである。臨床検体のデータベースであるTCGAの情報を解析した結果、本研究の候補遺伝子は、乳癌をはじめ一部の腫瘍において発現が亢進している群の存在が確認され、高発現群の全生存期間は低発現群に対して有意に短いことが示された。乳癌細胞株を用いた実験では、同遺伝子の転写の亢進も確認されたが、蛋白質の翻訳は確認されなかった。このため、この遺伝子は腫瘍の悪性化に直接寄与しているわけではないものの、転写レベルの上昇が生存期間の短縮との相関を示しているために予後不良な悪性腫瘍のマーカーとして有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、研究対象とする遺伝子の転写産物が、同遺伝子座の周辺に位置する別の遺伝子の転写の過程で過誤的に上昇したことを示唆するデータが得られた。この原因の一つとして、細胞が受けた何らかのストレスによって転写の開始・終結に影響が及んだものと考えられた。すなわち、同遺伝子の転写産物は、腫瘍が受けるストレスによる副産物であると言える。今回の知見は、未だ全貌が明らかになっていない腫瘍における転写制御機構の理解に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the genes identified as candidate prognostic markers across carcinomas. Analysis of TCGA information in a database of clinical specimens showed that some candidate genes were up-regulated in some tumors, including breast cancer, and that the overall survival of the high expression group was significantly shorter than that of the low expression group. Quantitative PCR experiments using a breast cancer cell line cDNA also showed enhanced transcription of the gene. However, we could not observe the protein translated from the gene. Thus, although this gene does not directly contribute to the malignant transformation of tumors, it is considered to be a valid marker of poor prognosis malignancy because elevated transcriptional levels correlate with shorter survival.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：乳癌 腫瘍マーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の予後不良因子の候補としてはいくつかの遺伝子の発現や分子機序が発見され、報告されてきている。しかしながら、近年発見された遺伝子や、それを含む経路については研究が進んでおらず、予後予測に適用できるか否かが未だ確定していない場合が存在する。申請者らは、米国の癌情報データベースである TCGA のデータを用いた解析から、今回研究対象とした遺伝子の発現が一部の悪性腫瘍において亢進しており、乳癌、明細胞腎癌、乳頭状腎癌等 7 種類の悪性腫瘍においてその発現の上昇が患者の生存期間短縮と相関を示すことを見出した。この遺伝子は、正常組織では筋組織のみに発現が認められる。特に乳癌検体においては、多変量解析によって、同遺伝子の発現が独立した予後予測因子であることが示された。研究開始当初までに、腫瘍における対象遺伝子の機能を報告したものは横紋筋肉腫における幹細胞性に寄与することを述べた一報(Faggi et al., 2015)のみであり、申請者の研究テーマには独自性があった。

### 2. 研究の目的

今回の研究の目的を図 1 および下記に記す。

(1) 腫瘍、とりわけ予後の不良なものにおいて対象遺伝子の発現が亢進するような条件を明らかにする。

(2) 腫瘍における対象遺伝子の機能を解析することによって、腫瘍の悪性化過程の未知の調節機構を解明することで、この遺伝子の悪性腫瘍における機能を解明する。

(3) 対象遺伝子の発現レベル、および蛋白質レベル等が腫瘍の悪性度マーカーとして有用であるかを検討する。



図1: 申請者が本研究で明らかにしたい点の概要を示す。

### 3. 研究の方法

(1) 癌細胞株の悪性化誘導過程における同遺伝子由来の蛋白質の機能の検証: 乳癌由来の培養細胞株を用いた対象遺伝子の強制発現系、または、ノックダウン細胞の悪性化誘導処理を通じて、対象遺伝子由来の蛋白質の機能の要求性を調べる。また、各実験系において同遺伝子由来の蛋白質の機能によって発現が変動する遺伝子群を次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析によって検出する。質量分析法によって癌細胞内において結合するパートナー分子を検索し、作用機序の解明につなげる(図 2)。

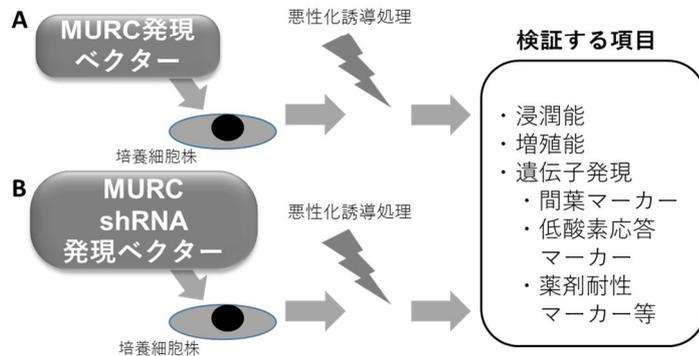


図2、申請者が検証を目指す、MURC遺伝子の強制発現(A)またはノックダウン(B)によるがん細胞株による悪性転換制御機構の検証実験のフローを示す。

(2) ゲノムの変異情報等を統合した対象遺伝子発現誘導機序の解析: TCGA を始めとする公共データベースに収録されている各種癌患者のゲノム DNA の変異情報やメチローム情報、及び米国国立衛生研究所(NIH)が保有する癌細胞株データベース(CCLE)のゲノム変異情報、RNA-Seq情報とを統合し、対象遺伝子の発現が亢進している癌患者における発現誘導メカニズム、及び異常を持つ分子機序、未報告の遺伝子変異等の解明を行う。

### 4. 研究成果

(1) 臨床の乳癌検体における、発現量と予後の相関性の検討

TCGA に収録されている乳癌患者検体の発現情報、及びおよび米国国立生物工学情報センターに収録されている別の乳癌検体の遺伝子発現量解析データをまとめたポータルサイトである Kmploater を用いた生存解析の結果、前者のデータベースでは対象遺伝子の発現の高い患者群は、発現の低い群に比べて全生存期間が短く、後者のデータベースでは無再発生存期間が短くなること示された(図 3)。

(2) 乳癌検体の発現データを用いた検討

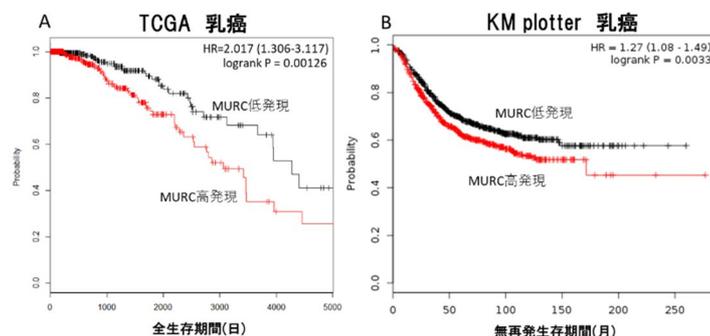


図3: A、TCGAの乳癌サンプル用いて作成した全生存期間の曲線。B、KMplotterの乳癌サンプルを用いて作成した無再発生存期間の曲線。

TCGA、および NIH のデータベース GEO に収録されている乳癌検体の RNA-Seq データを (GSE58135) 元に発現の検証を行った。これにより、予後が悪いトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) 患者において対象遺伝子の発現量が高く、ホルモンレセプター陽性 (Non-TNBC) 細胞では正常組織と同程度の発現であるとの結果が得られた (図 4)。

### (3) 乳癌細胞株を用いた転写及び発現状況の検討

乳癌由来の培養細胞株において同遺伝子の発現量を quantitativePCR 法にて定量した結果、(2) に示す乳癌患者検体を用いたデータ解析と同様、TNBC 由来の細胞株において対象の発現量が高く、Non-TNBC 細胞では発現が低いことが示された (図 5)。

### (4) 乳癌細胞株、および組織染色を用いた発現状況の検討

乳癌由来細胞株を用いたウェスタンブロット、及び乳癌組織検体の染色結果からは、この遺伝子由来の蛋白質の存在は確認されなかった。これは当初想定していない結果であった。各実験にあたっては、市販の筋組織の細胞溶解液および組織切片を用いて抗体染色のポジティブコントロールとし、実験系に問題がないことを確かめている。

### (5) 腫瘍特異的転写物の検証

(4) の結果より、同遺伝子は腫瘍内において転写されるものの翻訳がなされていない状態となっていることが示唆された。この仮説を検証するため、TNBC 細胞株から抽出した total RNA を元に同遺伝子の転写産物の配列をサンガーシークエンスによって調べることにした。これにより、対象としている遺伝子と、その遺伝子座の近傍に存在する別の遺伝子 X の一部を含む未知な構造の転写産物の存在が示唆される結果が得られた。細胞が受ける一部のストレスが、遺伝子の転写終結のための分子機序に影響を与えるとする説はこれまでも提唱されている (Vilborg and Steitz, 2017)。このことから、腫瘍細胞が周囲の微小環境から受けるストレスによって、この新規転写産物が副産物として生じる可能性が考えられた。これを検証するため、乳癌細胞株において培地にストレス誘導物質を添加する実験によって対象遺伝子の発現レベルの変化を確認した結果、転写レベルが上昇する実験結果が一部のストレスによって確認された。

このため、この遺伝子の転写レベルは腫瘍の悪性化に直接寄与しているわけではないものの、転写レベルの上昇が生存期間の短縮との相関を示しているために予後不良な悪性腫瘍のマーカーとして有効であると考えられた。現在は、引き続きこの遺伝子の詳細な転写機序について解析していると同時に、他のデータセットにおいても同様の結果が得られるか、またこのストレス環境が臨床検体においてどのような意義を持っているかの検討も引き続き行っている。

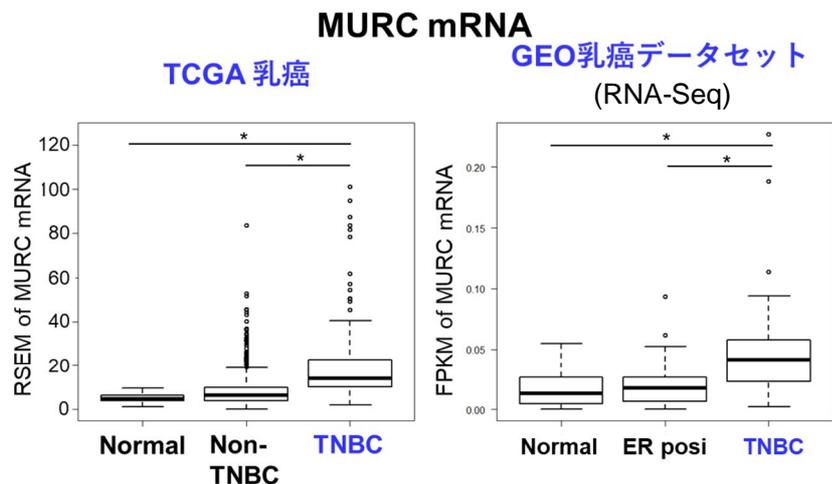


図4. TCGAおよびGEOから取得した乳癌患者データにおけるMURCの発現量を示す。どちらのデータセットにおいても、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)患者由来組織のMURCの発現は他のサブタイプの乳癌検体、または正常乳腺組織よりも亢進していた (\*: p<0.001)

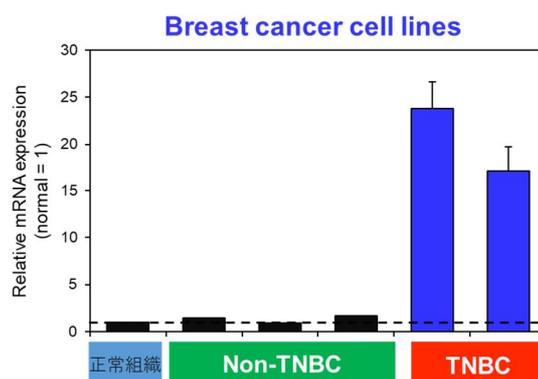


図5. qPCR法によるMURC発現の定量結果を示す。正常乳腺組織由来のcDNAにおけるMURCの発現量を相対値で示す。トリプルネガティブ乳癌(TNBC)患者由来の細胞では高発現であったのに対し、レセプター陽性(Non-TNBC)の細胞株では正常組織と同程度の、微量の発現であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丹下正一朗、井戸川雅史、時野隆至
2. 発表標題 悪性腫瘍の新規予後マーカー-CPIG7.2の解析
3. 学会等名 第120回北海道癌談話会
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
--	---------------------------	-----------------------	----