

令和元年6月24日現在

機関番号：82606
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2018
 課題番号：17K16533
 研究課題名(和文) 腹膜偽粘液腫の臨床応用に向けたシーケンス解析とマウスモデル作製による基盤研究

 研究課題名(英文) Fundamental research of clinical use for pseudomyxoma peritonei: comprehensive sequencing analysis and generation of transgenic mouse models

 研究代表者
 野口 玲 (Noguchi, Rei)

 国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

 研究者番号：30779682
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、希少がんである腹膜偽粘液腫(PMP)の病態メカニズムを明らかにすること、PMP動物モデルを確立することが目的である。PMPの臨床検体を用いて、全ゲノムシーケンスとRNA-Seqを実施した。全ゲノムシーケンスではPI3K-AKT pathwayが治療標的として新たに同定された。RNA-Seqでは5747遺伝子が発現変動遺伝子として同定され、粘液産生関連遺伝子・炎症関連因子が有意に関連していた。PMPのマウスモデル作製については、大腸特異的にGNAS, KRAS変異を発現させると虫垂に腫瘍が形成されたが、特徴的なフェノタイプを得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は希少性から新薬開発を行うのが難しく、既存の治療薬のみしか使われていない腹膜偽粘液腫の臨床に役立てるための研究を行うことである。本研究の網羅的ゲノム解析により新たな治療標的としてPI3K-AKT pathwayが同定された。同定したパスウェイを阻害する既存薬の治療への応用の可能性が広がられた。この悲惨な希少がんの治療を改善させ、予後も改善することが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Pseudomyxoma peritonei (PMP) is a rare disease with distinct feature caused by cancerous cells producing mucin. Although mutations of KRAS and GNAS have been involved in carcinogenesis of PMP, druggable targets based on gene expression profiles and genomic profiles have been unknown. Additionally, there was no animal model for PMP due to its rarity. To disclose druggable targets for PMPs, comprehensive genome analysis consisting of RNA-sequencing and whole genome sequencing was conducted with PMP tissues and their matched normal tissues. Cre recombinant mice were crossed with Kras mutant mice and GNAS mutant mice. The genomic analysis reveals that PI3K-AKT pathway is identified as a new druggable target and mucin producing related genes and inflammation related genes play important role for tumorigenesis of PMP. Not only GNAS mutation but also mutations of GNAS and KRAS enable mice to generate appendiceal polyps. However, these polyps did not show PMP-unique phenotype, mucin producing.

研究分野：希少がん

キーワード：腹膜偽粘液腫 全ゲノムシーケンス RNA-Seq トランスジェニックマウス ゼノフラフト

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

1. 研究開始当初の背景

腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei: PMP) は 100 万人に 1-2 人の割合で発症し、主に虫垂原発腫瘍から腫瘍細胞が播種により腹膜に転移し、腫瘍細胞から分泌されるゼリー様物質が腹腔内に貯留し様々な症状を呈す。PMP の発症メカニズムは不明で、2011 年頃から次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析が海外で数例報告されている。2014 年頃からは全エクソンシーケンス解析が Sio らや Nummela らにより報告されている。PMP の発生には *KRAS*, *GNAS* 遺伝子変異、悪性化に関わる *TP53* 遺伝子異常が関与すると明らかになった。しかし、新たに治療応用可能な遺伝子変異・パスウェイは同定されていない。

PMP は稀少疾患で、臨床検体入手が困難で、かつ粘液中に腫瘍細胞が浮遊していることから腫瘍細胞のみの抽出が難しい。そのため、PMP の実験モデルについては、HT29-GNAS^{R201H} 細胞を皮下に投与した xenograft を用いた報告が Nishikawa らより 1 例のみであり、PMP モデルマウス作製の報告はない。そのため、PMP 実験モデル動物の作製が病態解明研究において必須である。

2. 研究の目的

腹膜偽粘液腫の病態メカニズムを明らかにすること、及び動物モデルを作製することである。

3. 研究の方法

方法として、腹膜偽粘液腫の臨床検体を用いて、全ゲノムシーケンス・網羅的発現解析を行い、体細胞変異やコピー数変異や構造変異を同定し、頻度の高い遺伝子変異を同定し、薬剤標的となる遺伝子やパスウェイを同定する。また動物モデル作製については、腹膜偽粘液腫で高頻度に変異が認められる *KRAS* 遺伝子変異と *GNAS* 遺伝子変異を有するマウスと CDX2-Cre マウスを交配することで、*KRAS* 遺伝子変異と *GNAS* 遺伝子変異を大腸特異的に発現させたマウスを作製する。作製したトランスジェニックマウスにフェノタイプが出現するかどうかが調べる。

4. 研究成果

腹膜偽粘液腫の臨床検体 10 例の腫瘍組織と正常組織を用いて、全ゲノムシーケンスと RNA-Seq による網羅的発現解析を実施した。全ゲノムシーケンスでは遺伝子変異・コピー数変異・構造変異を同定した。以前より報告されている *KRAS*, *GNAS* の遺伝子変異が高頻度に認められ、*KRAS*・*GNAS* が腫瘍発生に関わることを確認した。悪性化についても *TP53* が有意に関係することが明らかになった。それ以外に、新たな薬剤標的として PI3K-AKT pathway が有意に腫瘍で関係していることが明らかになった。RNA-Seq では、クラスター解析にて腫瘍と正常が 2 群に分かれ、これより腫瘍と正常では発現 profile が異なることがわかった。5747 遺伝子が発現変動遺伝子として同定され、複数の粘液産生関連遺伝子が Principal component analysis で有意に発現変動していた。また、発現変動遺伝子を用いて Gene set enrichment analysis を行ったところ、炎症関連因子、epithelial mesenchymal transition 関連因子、Tumor-necrosis factor -NF- κ B 関連因子などと有意に相関していた。これらより新たな薬剤標的として PI3K-AKT pathway が同定された。また、発現プロファイルでは腹膜偽粘液腫は疾

患の本体である粘液産生の特徴を有し、病態の基本として炎症が大事な役目をしていることが示唆された。

また、腹膜偽粘液腫のマウスモデル作製については、初回に作成した CDX2-Cre マウスにおいて胎生致死が生じて、CDX2-Cre マウスの変更を行い、時間がかかった。GNAS のみの変異発現では腫瘍形成は認められず、GNAS と KRAS の変異を大腸特異的に発現させた場合にのみ虫垂に腫瘍を作製することができた。作製されたマウスにおいて虫垂に腫瘍は形成されたものの、疾患の特徴である著しい粘液産生のフェノタイプは認められなかった。GNAS・KRAS 変異マウスおよび KRAS 変異マウスにて数を増やし、病理学的に差が生じるのかどうか経過観察したものの、有意差はでなかった。そのため、トランスジェニックマウスモデル作製ではなく、腹膜偽粘液腫の腫瘍組織をヌードマウスに移植してつくる、患者由来ゼノグラフトを行った。腫瘍組織は腹腔内に移植する同所性移植を行い、結果として、50%の割合でヌードマウスに腹膜偽粘液腫を作製することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

[1]招待講演

○野口玲、近藤格, Novel anti-cancer drugs for pseudomyxoma peritonei: genome, screening, and model, Australia-Japan Research Symposium, 2018年9月10日、オーストラリア大使館、東京

[2]口頭発表(査読有)

Rei Noguchi, Yoshimasa Gohda, Yasutaka Shuno, Toru Igari, Yasunori Ohta, Kiyoshi Yamaguchi, Tsuneo Ikenoue, Hideaki Yano, Yoichi Furukawa

Gene expression profile of pseudomyxoma peritonei to investigate pathological mechanism, 第76回日本癌学会学術総会 横浜、2017年9月

[3][ポスター](査読有)

野口玲、矢野秀朗、合田良政、須田竜一郎、大田泰徳、山口貴世志、寺門侑美、池上恒雄、古川洋一

Ovarian pseudomyxoma peritonei caused by mismatch repair deficiency in a patient with Lynch syndrome

第75回日本癌学会学術総会 横浜、2016年10月

〔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：なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

特になし

(2)研究協力者
特になし

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。