

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02879

研究課題名(和文)胆管癌融合遺伝子を標的にした新規核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Novel nucleic acid medicine for the fusion genes in cholangiocarcinoma

研究代表者

榑野 正人(Nagino, Masato)

愛知県がんセンター(研究所)・副総長・副総長

研究者番号：20237564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：異時性胆管癌における次発病変の遺伝子変異は、初発病変の遺伝子変異に新しい遺伝子変異が付加されており、遺伝子変異の蓄積が胆管癌の発癌の原因の1つとして考えられた。融合遺伝子の breakpoint が遺伝子のコーディング領域上にある体細胞構造の変異解析の結果、Total数3499(3326-3655)、DEL(deletion)数2678(2620-2781)の変異を認めた。またGDC portalに登録されているbile duct cancerプロジェクトで検出された遺伝子320個上に体細胞構造変異を認めた。これらの体細胞構造変異が胆管癌の癌化に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異時性胆管癌の初発病変と次発病変の遺伝子変異を明らかにし、発癌機序を明らかにした。また融合遺伝子の breakpoint が遺伝子のコーディング領域上にある体細胞構造の変異を明らかにした。これら体細胞構造の変異は新規診断治療法の開発において重要な知見であり学術的意義が大きい。また本研究により新規治療法開発の可能性が示唆され、治療法が可能になれば、生存率を含めた治療成績の向上が期待され社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In the metachronous cholangiocarcinoma, the gene mutation in the secondary lesion has additional gene mutations to the gene mutation in the primary lesion, and their accumulations were considered to be one of the causes of the carcinogenesis in cholangiocarcinoma. Analysis of breakpoint on the coding region of the gene as somatic gene structure, demonstrated that total number is 3499 (3326-3655), the DEL (deletion) number is 2678 (2620-2781), the INV (inversion) number is 152 (136-170), INS (insertion) number 384 (364-406), DUP (tandem duplication) number 225 (192-253), and BND (breakend, interchromosomal translocation) number 58 (42-71). In addition, we revealed somatic structural variations on 320 genes, which detected in patients of the bile duct cancer in the GDC portal. These somatic structural variations were considered to be involved in the carcinogenesis of bile duct cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：融合遺伝子 胆管癌 核酸医薬 ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

癌に対する診断や治療の進歩により、一部の癌においてはその治療成績の改善が報告されている。しかし、局所高度浸潤症例や転移症例などは外科的切除ができず、十分な治療法もないためその治療成績は満足のものではない。胆管癌における治療成績の改善のためには新規治療法の開発が極めて重要である。

癌化においては染色体転座または逆位により生じる異常な遺伝子融合は、重要な発癌原因の一つと考えられている。慢性骨髄性白血病では、第9番染色体の ABL 遺伝子と第22番染色体の BCR 遺伝子の相互転座により BCR-ABL 融合遺伝子が、悪性リンパ腫においても ALK 遺伝子と NPM 遺伝子からなる NPM-ALK (p80) 融合遺伝子が同定されている。遺伝子融合を起こす染色体再配列は造血器悪性腫瘍にのみおこり、固形癌にはそのような再配列がほとんどおこらないと考えられていた。しかし前立腺癌でのセリンプロテアーゼである TMPRSS2 と転写因子である ERG の転座による TMPRSS2- ERG 融合遺伝子が同定され、非小細胞肺癌 (NSCLC) においても EML4-ALK 融合遺伝子が同定された。固形癌での融合遺伝子の存在が明らかになり、固形癌の癌化における融合遺伝子の関与が注目されている。我々は、胆管癌においても融合遺伝子が新たな癌治療法の標的となると考え、次世代シーケンサーによる胆管癌での融合遺伝子の探索を行い、複数の融合遺伝子を同定した。融合遺伝子の中にはドライバー遺伝子 (癌の機能において重要な役割を有する遺伝子) とパッセンジャー遺伝子 (発現ドライバー遺伝子亢進しているが重要な役割を有していない遺伝子) のように融合を生じていても癌化に重要なものとそうでないものが存在すると考えられる。しかしどれがドライバー遺伝子で、どれがパッセンジャー遺伝子なのか? その機能や制御はどのようにおこなわれているのか? など多くのことが明らかになっていない。

従来、癌における融合遺伝子による機能や制御が、融合遺伝子により生じた融合タンパクが異常タンパクとして癌化に関与すると考えられてきた。しかし癌における融合遺伝子の機能や制御に融合タンパクの関与しないメカニズムの存在も示唆されており、新たなメカニズムの解明により新規癌治療法の開発が可能である。

2. 研究の目的

本研究では胆管癌の次世代シーケンサーにより同定した融合遺伝子の作用機序を解明し、胆管癌の融合遺伝子に対する核酸医薬およびバイオマーカーの開発を行うことである。

3. 研究の方法

【包括的遺伝子配列解析】

異時性胆管癌 4 例について初発病変と次発病変に関して次世代シーケンサーによる包括的遺伝子配列解析を行った。

【融合遺伝子探索】

胆管癌症例において、次世代シーケンサーによるヒトの RNA-Seq データに関して、以下の FuSeq を用いて融合遺伝子候補の検出およびフィルタリングを実施した。

- 1) 参照ゲノム (GRCh37 を FuSeq 用に加工したもの: FuSeq) に対し、シーケンスリードの Quasi マッピング。
- 2) split read (リード配列が複数遺伝子の境界を含む) および、mapped read (ペアリードが異なる遺伝子にマッピングされる) を用いて融合遺伝子候補の抽出。
- 3) 複数のフィルタリングおよび統計的検討。

【全ゲノム解析による変異高次解析】

末梢胆管、肝門部、遠位胆管、胆嚢管に発生した胆管癌より 8 症例を選択した。各症例の癌組織と血液サンプルから DNA を抽出した。血液サンプルからの DNA をリファレンスとして、全ゲノム解析を行なった。遺伝子変異、非コード領域におけるゲノム変異、欠失、組込み、重複、逆位、染色体の転座などのゲノム構造異常、病原体ゲノムの検討を行なった。また体細胞

構造変異解析に関して、正常および腫瘍組織の BAM ファイルと参照ゲノム配列から、DELLY の call 機能を用いて腫瘍特異的な体細胞構造変異の検出を行った。検出された体細胞構造変異解析を総数および変異種別 DEL(deletion)、INV(inversion)、INS(insertion)、DUP(tandem duplication)、BND(breakend、染色体間転座) ごとに集計した。また集計結果の IGV による可視化を行った。さらに Breakpoint が遺伝子のコーディング領域上にある体細胞構造変異と GDC portal に登録されている bile duct cancer プロジェクトにおいて検出された遺伝子上にある体細胞構造変異について比較検討した。

4. 研究成果

【異時性胆管癌に対する包括的遺伝子配列解析】

異時性胆管癌に対する包括的遺伝子配列解析を行った。症例 1 の初発病変においては APC、CDKN2A、CDKN2B、CDKN1B、MDM2、CD274、STK11 に変異を認め、次発病変において APC、CDKN2A、CDKN2B、CDKN1B、MDM2、CD274、STK11、PTPRD、SMAD4、KEAP1、ARID1A、FBXW7、PIK3R1 に変異を認めた。PTPRD、SMAD4、KEAP1、ARID1A、FBXW7、PIK3R1 の変異を次発病変で新たに認めた。症例 2 の初発病変においては APC、TP53、JAK1、RB1、SMAD4、AMER1 に変異を認め、次発病変において APC、TP53、JAK1、RB1、SMAD4、AMER1、KRAS、CDKN2A、CDKN2B に変異を認めた。KRAS、CDKN2A、CDKN2B の変異を次発病変に新たに認めた。異時性胆管癌において初発病変に認められた変異が次発病変にも認められ、次発病変において新たな変異が付加されていることを明らかになった。また症例 3 において、PIK3C、CCND1、CDKN2A、CDKN2B、PTEN、AXIN1、ARID1A、XPO1、FBXW7、PIK3R1、APC、CKND1A、PALB2、FLCN、PTPRD、SMAD4 に変異を認めた。症例 4 においては、ERBB2、CDKN2A、NF1、ACVR2A、TGFB2、ATR、AXIN1、RNF43、SMAD4、CDK12 に変異を認めた。

異時性胆管癌の発生部位における遺伝子変異については、末梢胆管、肝門部、遠位胆管などの部位特異的な遺伝子変異を認めなかった。初発病変の部位は末梢胆管、肝門部、胆嚢管など様々な部位であったが、次発病変は遠位胆管に多かった。初発病変では遺伝子変異に一定の傾向は認められず、heterogeneity の強いことが明らかになった。また遠位胆管に発症した次発病変では、CDKN2A、2B の loss および変異部位は異なるが SMAD4 と APC に共通した遺伝子変異を認めた。これら 4 症例において、同一患者では初発病変と次発病変において共通した遺伝子に変異を認めたが、共通する遺伝子変異は、症例ごとで異なっていた。また次発病変の遺伝子変異は、初発病変の遺伝子変異に新しい遺伝子変異が付加されていた。これらの結果より、胆管癌の発癌機序は、症例ごとで異なり複数存在していることが示唆された。また同一患者での発癌機序はほぼ同じで、遺伝子変異の蓄積が胆管癌の発癌の原因の 1 つとして考えられた。

【胆管癌における融合遺伝子の探索】

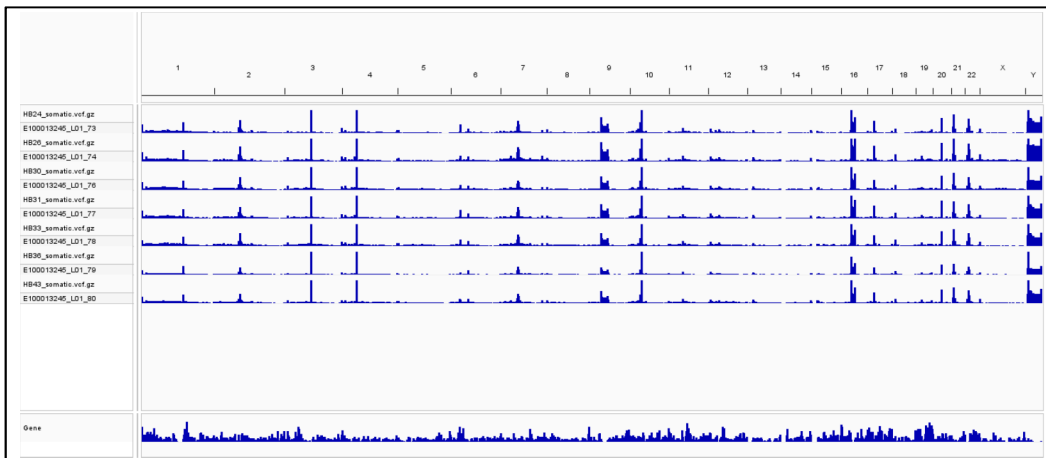
次世代シーケンサーによる融合遺伝子の探索で得られたヒトの胆管癌の RNA-Seq データに関して、FuSeq を用いた融合遺伝子候補の検出およびフィルタリングを実施した結果、最終的な融合遺伝子候補として、新たに以下の融合遺伝子の候補を同定した。

ENSG00000198839-ENSG00000183246 (supprotCount : 2191, uniCount : 2191, correctedCount : 2191.00)、 ENSG00000256618-ENSG00000269028 (supprotCount : 125, uniCount : 123, correctedCount : 123.67) ENSG00000269028-ENSG00000256618 (supprotCount : 44, uniCount : 42, correctedCount : 43.00)、 ENSG00000205176-ENSG00000173212 (supprotCount : 6, uniCount : 6, correctedCount : 6.00)

【胆管癌におけるゲノム構造解析】

体細胞構造変異解析の集計結果の IGV による可視化により全サンプルに共通して構造変異が検出された (図 1)。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)



これらは、ゲノム配列自体による構造変異の検出されやすい箇所と考えられた。そのため、構造変異解析の変異数などの集計値は、SNV/indel 解析やコピー数解析と比べ、サンプルの傾向を反映していない可能性が考えられた。GDC portal に登録されている bile duct cancer プロジェクトにおいて検出された遺伝子の体細胞構造変異の検討により、Breakpoint が遺伝子のコーディング領域上にある体細胞構造の結果、Total 数 3499(3326-3655)、DEL 数 2678(2620-2781)、INV 数 152(136-170)、INS 数 384(364-406)、DUP 数 225(192-253)、BND 数 58(42-71)の変異を認めた(図2)。また GDC portal に登録されている bile duct cancer プロジェクトの患者において検出されたタンパク質をコードしている遺伝子 320 個上の体細胞構造変異を認めた。

図 2

	Total	DEL	INV	INS	DUP	BND
HB24	3,480	2,638	154	393	236	59
HB26	3,326	2,557	143	366	218	42
HB30	3,655	2,781	170	402	245	57
HB31	3,486	2,710	136	372	215	53
HB33	3,460	2,679	154	364	192	71
HB36	3,486	2,620	162	386	253	65
HB43	3,606	2,767	151	406	221	61

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasebe Keiji, Yamaguchi Junpei, Kokuryo Toshio, Yokoyama Yukihiro, Ochiai Yosuke, Nagino Masato, Ebata Tomoki	4. 巻 42
2. 論文標題 Trefoil factor family 2 inhibits cholangiocarcinogenesis by regulating the PTEN pathway in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1496 ~ 1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgab093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Junpei, Kokuryo Toshio, Yokoyama Yukihiro, Ebata Tomoki, Ochiai Yosuke, Nagino Masato	4. 巻 40
2. 論文標題 Premalignant pancreatic cells seed stealth metastasis in distant organs in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2273 ~ 2284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-01706-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai Yosuke, Yamaguchi Junpei, Kokuryo Toshio, Yokoyama Yukihiro, Ebata Tomoki, Nagino Masato	4. 巻 72
2. 論文標題 Trefoil Factor Family 1 Inhibits the Development of Hepatocellular Carcinoma by Regulating Catenin Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 503 ~ 517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31039	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	江畑 智希 (EBATA Tomoki) (60362258)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	國料 俊男 (KOKURYO Toshio) (60378023)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	山口 淳平 (YAMAGUCHI Junpei) (00566987)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関