

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07320

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳がんの腫瘍成長因子 発現亢進に関わるゲノム高次構造異常の解析

研究課題名（英文）Analysis of chromosomal structural variations associated with increased expression of tumor growth factor-alpha in triple-negative breast cancer

研究代表者

河津 正人（Kawazu, Masahito）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：20401078

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳がんの病態を解明するために、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）14症例およびエストロゲン受容体陽性乳がん8症例の臨床検体を用いて、ロングリードシーケンサーによる網羅的全長RNAシーケンスを行った。乳がんにおける転写産物の全体像を明らかにし、いくつかの遺伝子においてはサブタイプ特異的な転写アイソフォームを同定した。特に、細胞骨格の制御に関わる遺伝子TNS3の新規転写バリエーションがTNBC特異的に発現し、その病態に関わることを明らかにした。また、染色体構造異常の結果として内在性レトロウイルス遺伝子ERVFRD-1の発現が脱抑制するという新たな免疫回避のメカニズムを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ここ数年のロングリードシーケンサー技術の進歩により、がんゲノム解析研究へのロングリードシーケンサーの応用の期待が高まっている。しかしながら、そのデータ解析手法は発展途上であり、詳細なデータ解析が十分に行われていないのが現状である。本研究においては網羅的全長RNAシーケンスの解析パイプラインを開発し、それによりこれまで知られていなかったトリプルネガティブ乳がんの病態を明らかにした。本研究で示した解析の枠組みを応用することで、ロングリードシーケンサーによるがんゲノム研究が推進されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathogenesis of triple-negative breast cancer (TNBC), we performed comprehensive full-length RNA sequencing by long read sequencing using clinical specimens from 14 TNBCs and 8 estrogen receptor-positive breast cancers. We revealed a landscape of the transcriptome in breast cancer and identified subtype-specific isoforms in several genes. In particular, we found that a novel variant of TNS3, a gene involved in cytoskeletal regulation, is expressed specifically in TNBC and has implication in its pathogenesis. In addition, we discovered a novel mechanism of immune evasion in which the expression of the endogenous retroviral gene ERVFRD-1 is de-repressed as a consequence of chromosomal structural abnormalities.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳がん ロングリードシーケンサー 全長RNAシーケンス 染色体構造異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんのゲノム解析の臨床応用(ゲノム医療)が現実のものとなりつつあるが、既存のアミノ酸置換に注目した解析方法ではドライバー変異がほとんど検出されないがん種/症例も多い。例えば、比較的ドライバー変異が明確な肺腺癌においても25%では明らかなドライバー変異が検出されない。治療標的の同定が困難な症例において、たんぱく質非コード領域の異常もゲノム医療の対象とするために、たんぱく質非コード領域のゲノム異常による発がんメカニズムについての系統的解析手法確立が必要とされている。

トリプルネガティブ乳がん(TNBC)はエストロゲン受容体陰性、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)陰性の予後不良な疾患単位であり、診断マーカーおよび治療標的の同定が強く求められている。

2. 研究の目的

申請者はTNBCの一部の症例において、上皮成長因子受容体(EGFR)の強力なリガンドである腫瘍成長因子をコードする*TGFA*の発現制御領域のゲノム構造異常により*TGFA*の発現が亢進していることを見出した(Kawazu, et al. PLOS Genetics 2017)。本研究計画では、*TGFA*をTNBCの新たな診断マーカーおよび治療標的として利用するための基礎的知見を得ることを目的とした。

また、トリプルネガティブ乳がんについて、ロングリードシーケンサーによる全長RNAシーケンスデータと全ゲノムシーケンス(WES)データとの統合解析を進めることにより、たんぱく質非コード領域のゲノム異常の解析手法確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) PDXモデルによる薬剤投与実験

雌 NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ マウスの背部皮下に PDX 乳がん組織を移植した。移植 12 日後に 3 群 (各群 n=8) に群分けを行った (Day 0)。群分け時の各群の腫瘍体積は約 262 ~ 267 mm³ であった。Afatinib 20 mg/kg および Osimertinib 5 mg/kg を 1 回/日、21 日間、連日経口投与した。

(2) ロングリードシーケンサーによる全長転写産物解析 (IsoSeq)

Pacific Biosciences 社の Single-Molecule Real-Time (SMRT) シーケンシング技術 (SMRTbell Template Prep Kit 1.0, Sequel Binding Kit 2.0, Sequel Sequencing Kit 2.0, all from Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) を用いてロングリードシーケンシングを行った。SMARTer® cDNA synthesis kit (Takara Bio, Kusatsu, Shiga Japan) を用いて、1 µg の total RNA から完全長 cDNA ライブラリーを構築した。PCR 増幅は、PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いた。1 µg の PCR 産物から SMRT シーケンスに使用するシーケンステンプレート (SMRTbell) を構築した。DNA 損傷と末端修復の後、SMRTbell アダプターを PCR アンプリコンにライゲーションし、続いて 0.6 容量の Agencourt AMPure PB (Pacific Biosciences) で精製した。シーケンスプライマーを 80°C で 2 分間変性させ、4°C に冷却した後、20°C で 30 分間ライブラリーとインキュベートすることによりテンプレートにアニーリングさせた。SMRTlink を用いて IsoSeq2 パイプラインで解析し consensus circular sequence を取得した。

4. 研究成果

(1) 新たな治療標的として *TGFA* のゲノム異常の検証

TGFA 近傍の構造異常およびそれに基づく *TGFA* の発現亢進が TNBC の治療標的となるのか、患者由来腫瘍異種移植系 (PDX) を用いた解析を行った。既存の TNBC の PDX の 19 系統の中から、ゲノム異常を背景として *TGFA* の高発現している PDX 系統を 1 系統同定した。同系統を用いて EGFR 阻害剤 (Afatinib および Osimertinib) の治療効果を検証した。Vehicle 投与群の腫瘍体積は経時的に増加し、Day 21 には $2208.61 \pm 1618.07 \text{ mm}^3$ となり、腫瘍体積の変化率は約 900%であった。Afatinib 投与群の腫瘍体積は Day 7 から Day 21 まで、Vehicle 群と比較して低値であったが有意な差ではなかった。また Osimertinib 投与群の腫瘍体積は Vehicle 投与群と比較して有意な差はなかった。以上の結果から、Afatinib または Osimertinib は今回使用した PDX マウスに対して、明らかな抗腫瘍作用を示さなかった (図 1)。

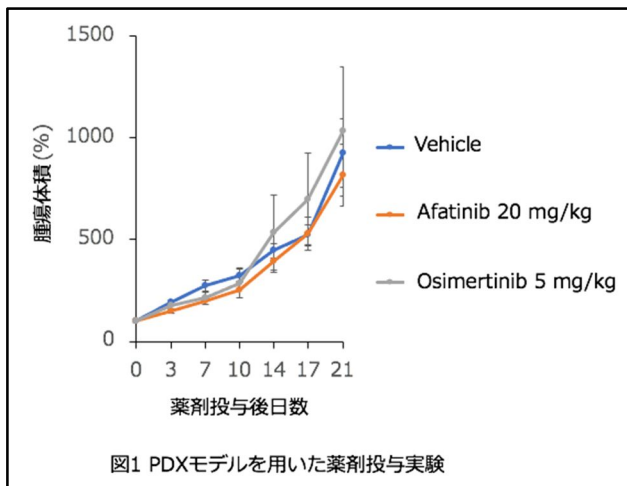


図1 PDXモデルを用いた薬剤投与実験

薬剤投与開始時の腫瘍体積を 100%とした。エラーバーは標準偏差を示す。

抗腫瘍効果が見られなかった原因として、*TGFA* の高発現が腫瘍の増殖に寄与していない可能性、*TGFA* の効果抑制に EGFR 阻害剤は適切でない可能性、今回用いた腫瘍細胞が *TGFA* 以外のドライバー変異に強く依存していた可能性などが考えられた。

(2) IsoSeq 解析パイプライン MuSTA の構築

TGFA を治療標的とすることの妥当性が十分に示せなかったため、以下ではロングリードシーケンサーを用いて TNBC の全長転写産物の網羅的解析 (IsoSeq) を進めた。*TGFA* については、IsoSeq においてもゲノム構造異常に基づく転写活性化を示すデータおよび転写制御を変えるような *TGFA* の融合遺伝子が検出され、これまでの研究および IsoSeq による転写産物解析の妥当性が示された。*TGFA* 以外のより有用な治療標的・バイオマーカー探索を進めるために、IsoSeq による網羅的な転写産物解析を効率的に行うための解析パイプライン MuSTA を構築した (<https://github.com/shinichinamba/MuSTA>、<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.15.199851v1>)。本パイプラインにより、ショートリードシーケンサーでは詳細な解析が難しい複雑な構造異常に基づく融合遺伝子の検出などが可能となった。

(3) MuSTA による新規 *TNS3* アイソフォームの同定

14 症例の TNBC と、その対照として 8 症例のエストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がんの RNA の IsoSeq を行った。MuSTA を用いてサブタイプごとにアイソフォームの割合が異なるような遺伝子を探索したところ 465 の遺伝子が検出できた (図 2)。

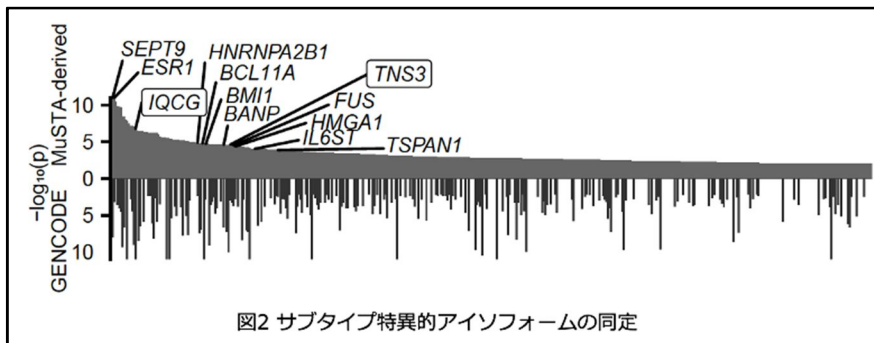


図2 サブタイプ特異的アイソフォームの同定

MuSTA による解析結果を上側に、GENCODE リファレンスを用いた解析を下側に示す。MuSTA 解析において P 値が低いものから並べた。乳がん関連遺伝子については遺伝子名を示す。

がん関連遺伝子は 46 であり、そのうち乳がんとの関連が報告されているものは 10 遺伝子であった。特に機能的に意義があると考えられた *TNS3* (Tensin 3) と *IQCG* について定量的 PCR を行ったところ、実際にサブタイプによってアイソフォームの割合が異なることが確認された。*TNS3* は典型的なタンパク質をコードするアイソフォームは ER 陽性乳がんの特異的に発現しており、一方 N 末端が欠ける短いタンパク質をコードするアイソフォームは TNBC に特異的に発現が高くなっていることが確認された (図 3)。TNBC 特異的アイソフォームはこれまでに報告の無い、新規アイソフォームであった。

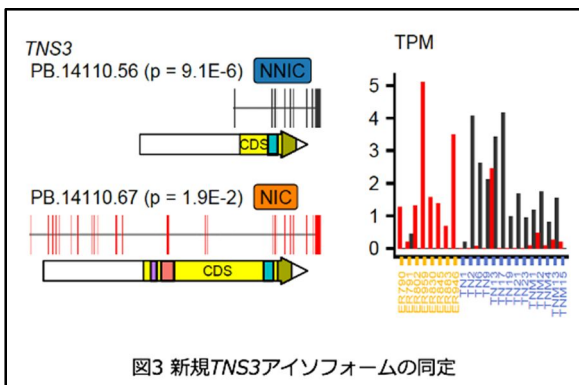


図3 新規*TNS3*アイソフォームの同定

古典的アイソフォームを赤で、新規アイソフォームを黒で示す。右側に RNA-seq の結果を示す。TPM は transcript per million を示す。

TNS3 は細胞骨格、細胞接着、細胞外マトリクス等の制御にかかわる遺伝子であり、TNBC の病態に関わる可能性が高いと考えられる。今後 *TNS3* 新規アイソフォームの機能解析を進める予定である。

(4) MuSTA による *ERVFRD-1* 融合遺伝子の同定

全ゲノム解析との統合解析により融合遺伝子の探索も行った。興味深いことに 3 つの遺伝子領域がつながったような融合転写産物が複数確認された。代表例としてヒストン遺伝子と *ERVFRD-1* が融合したものを示す (図 4)。

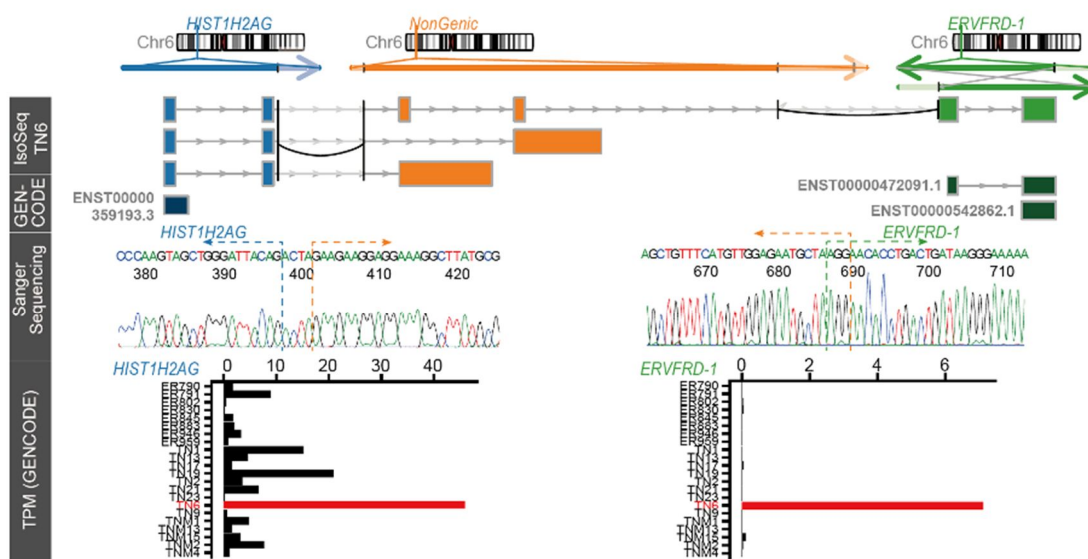


図4 ERVFRD-1高発現をもたらす融合型転写産物の検出

全ゲノム解析および IsoSeq 解析により同定された融合遺伝子の 1 例。融合遺伝子の遺伝子構造を上段に示す。サンガー法による融合部位の確認を中段に示す。RNA-seq による発現状態を下段に示す。本来ほとんど発現していない ERVFRD-1 が融合遺伝子を有する腫瘍において発現していた。

2 つの遺伝子領域の間に介在する遺伝子の記載のない領域においてもスプライシングを受けて融合転写産物が生じており、これまでに報告のない形態の融合型転写産物が同定できたとと言える。ERVFRD-1 のコーディング領域全長が含まれており、本来胎盤でのみ発現する ERVFRD-1 が、この融合遺伝子を有する症例においてのみ発現していた。ヒストン遺伝子領域に存在する遺伝子制御領域により発現促進されたものと考えられる。ERVFRD-1 は allogenic なマウス腫瘍モデルにおいて抗腫瘍免疫を抑制することが報告されている。したがって、この融合型転写産物による ERVFRD-1 の異常な発現が、実際にがんの発生あるいは進展に重要な役割を果たしていると考えられる。今後 ERVFRD-1 の機能解析を進める予定である。

5 . 結語

複雑なゲノム構造異常を有する TNBC のゲノム解析を進めるために、ロングリードシーケンサーによる転写産物解析の手法を確立した。それにより、TNBC の病態に関わる新規転写アイソフォームと新規融合遺伝子を同定した。本研究で確立した IsoSeq 解析手法は、これまでに解析の難しかった複雑なゲノム構造異常や転写制御領域異常の研究を推進するために有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaoka Kensuke, Kawazu Masahito, Koya Junji, Yoshimi Akihide, Masamoto Yosuke, Maki Hiroaki, Toya Takashi, Kobayashi Takashi, Nannya Yasuhito, Arai Shunya, Ueno Toshihide, Ueno Hironori, Suzuki Kenshi, Harada Hironori, Manabe Atsushi, Hayashi Yasuhide, Mano Hiroyuki, Kurokawa Mineo	4. 巻 33
2. 論文標題 A germline HLTf mutation in familial MDS induces DNA damage accumulation through impaired PCNA polyubiquitination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1773 ~ 1782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0385-0	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 Namba Shinichi, Sato Kazuhito, Kojima Shinya, Ueno Toshihide, Yamamoto Yoko, Tanaka Yosuke, Inoue Satoshi, Nagae Genta, Iinuma Hisae, Hazama Shoichi, Ishihara Soichiro, Aburatani Hiroyuki, Mano Hiroyuki, Kawazu Masahito	4. 巻 110
2. 論文標題 Differential regulation of CpG island methylation within divergent and unidirectional promoters in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13937	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 Inoue Satoshi, Hirota Yasushi, Ueno Toshihide, 十人省略, Tanaka Yosuke, Sakata Seiji, Takeuchi Kengo, Muraoka Ayako, Osuka Satoko, Saito Tsuyoshi, Oda Katsutoshi, Osuga Yutaka, Terao Yasuhisa, Kawazu Masahito, Mano Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Uterine adenomyosis is an oligoclonal disorder associated with KRAS mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13708-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kumagai Shogo, Togashi Yosuke, Kamada Takahiro, 十六人省略, Kawazu Masahito, Ueno Toshihide, Yamazaki Naoya, Goto Koichi, Tsuboi Masahiro, Mano Hiroyuki, Doi Toshihiko, Shitara Kohei, Nishikawa Hiroyoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-020-0769-3	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 Tateishi Kensuke, Miyake Yohei, Kawazu Masahito, 十六人省略, Miyazaki Ryohei, Suenaga Jun, Murata Hidetoshi, Aoki Ichio, Miller Julie J., Fujii Yukihiko, Ryo Akihito, Yamanaka Shoji, Mano Hiroyuki, Cahill Daniel P., Wakimoto Hiroaki, Chi Andrew S., Batchelor Tracy T., Nagane Motoo, Ichimura Koichi, Yamamoto Tetsuya	4. 巻 80
2. 論文標題 A Hyperactive RelA/p65-Hexokinase 2 Signaling Axis Drives Primary Central Nervous System Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5330 ~ 5343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-2425	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 Kawazoe Akihito, Kuboki Yasutoshi, Shinozaki Eiji, Hara Hiroki, Nishina Tomohiro, Komatsu Yoshito, Yuki Satoshi, Wakabayashi Masashi, Nomura Shogo, Sato Akihiro, Kuwata Takeshi, Kawazu Masahito, Mano Hiroyuki, Togashi Yosuke, Nishikawa Hiroyoshi, Yoshino Takayuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Multicenter Phase I/II Trial of Napabucasin and Pembrolizumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer (EPOC1503/SCOOP Trial)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5887 ~ 5894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-20-1803	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 Kumagai Shogo, Togashi Yosuke, Sakai Chika, Kawazoe Akihito, Kawazu Masahito, Ueno Toshihide, Sato Eiichi, Kuwata Takeshi, Kinoshita Takahiro, Yamamoto Masami, Nomura Sachiyo, Tsukamoto Tetsuya, Mano Hiroyuki, Shitara Kohei, Nishikawa Hiroyoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 An Oncogenic Alteration Creates a Microenvironment that Promotes Tumor Progression by Conferring a Metabolic Advantage to Regulatory T Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 187 ~ 203.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2020.06.016	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 Inoue Satoshi, Yoshida Emiko, Fukui Yamato, Ueno Toshihide, Kawazu Masahito, Takeyama Reina, Ikemura Masako, Osuga Yutaka, Terao Yasuhisa, Hirota Yasushi, Mano Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 KRAS mutations in uterine endometrium are associated with gravidity and parity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2559-0	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 Kohsaka Shinji, Hayashi Takuo, Nagano Masaaki, Ueno Toshihide, Kojima Shinya, Kawazu Masahito, Shiraishi Yuichi, Kishikawa Satsuki, Suehara Yoshiyuki, Takahashi Fumiyuki, Takahashi Kazuhisa, Suzuki Kenji, Takamochi Kazuya, Mano Hiroyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of Novel CD74-NRG2 Fusion From Comprehensive Profiling of Lung Adenocarcinoma in Japanese Never or Light Smokers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 948 ~ 961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2020.01.021	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 難波真一、河津正人、上野敏秀、間野博行
2. 発表標題 癌cDNA全長シーケンス解析手法の開発と乳がんへの応用
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 河津正人
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳がんにおけるゲノム構造異常の解析
3. 学会等名 ゲノムテクノロジー第164委員会 第56回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 難波真一、上野敏秀、間野博行、河津正人
2. 発表標題 全長RNAシーケンスの複数検体統合解析手法の開発と乳がん22検体への応用
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河津正人、岸上史士、上野敏秀、波江野洋、石原聡一郎、西川博嘉、間野博行
2. 発表標題 マイクロサテライト高度不安定性大腸がんにおけるクラスI HLA変異解析と免疫学的状態の分類
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河津正人、岸上史士、波江野洋、石原聡一郎、間野博行
2. 発表標題 学的分類によるマイクロサテライト高度不安定性大腸がんの免疫回避機構の解明
3. 学会等名 第18日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021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

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
---------	---------