

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16423

研究課題名(和文) 家族性肺癌における新規ドライバー遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of new driver candidate genes in familial lung cancer

研究代表者

朝重 耕一 (TOMOSHIGE, Koichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：70457547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いたある家系の連鎖解析によって肺がんの新規ドライバー遺伝子の候補として挙げられた4つの遺伝子について、肺がん細胞株を用い、各遺伝子の発現の有無及び発現している細胞株においてはsi-RNAによる各遺伝子のノックダウンを行い、遺伝子発現の変化を確認した。また、細胞増殖マーカー遺伝子についても発現量の変化をq-PCRにて確認した。遺伝子発現の低下を認めた細胞株においては、sh-RNA下に細胞の増殖能、足場非依存性増殖、浸潤能を検討したが、発現レベルの低下に伴い、増殖能、足場非依存性増殖、浸潤能の低下を認める遺伝子について再現性を持った結果は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

肺がんは遺伝性は稀であるが、常染色体優勢遺伝が強く疑われる肺がん家系においてその発症の原因となる遺伝子を見出したため、発がんやがんの進展に関与しているかどうか、肺がん細胞株を用いた実験を行った。今回実施した実験では見出した遺伝子が発癌やがんの進展と関わっているかどうかを明らかにすることはできなかったが、この結果から本家系の肺がんの発症原因は単純な塩基変化ではなく、他の原因があるものと推察された。そのため今後は全ゲノム解析により本家系に特徴的なゲノム変化を発見し、その機能解析を行っていく。

研究成果の概要(英文)：For the four genes that were identified as candidates for novel driver genes of lung cancer by linkage analysis of a family tree using a next-generation sequencer, lung cancer cell lines were used to confirm whether each gene was expressed or not, and in those cell lines where the genes were expressed, each gene was knocked down by si-RNA to check for changes in gene expression. The changes in gene expression were confirmed by knockdown of each gene by si-RNA in the cell lines that expressed the genes. Changes in expression of cell proliferation marker genes were also confirmed by q-PCR. In cell lines with decreased gene expression, we examined the proliferative ability, scaffold-independent proliferation, and invasive ability of cells under sh-RNA, but we could not obtain reproducible results for genes whose proliferative ability, scaffold-independent proliferation, and invasive ability decreased with decreased expression levels.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 遺伝性腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

家族性肺癌家系は世界的に見ても稀であり、6q23-25の変異(1)や、15q24-25.1(2)、5p15.33、6p21.33、6q23-25/RGS17、15q24-25(3)のSNPが発癌と関連すると報告されているが、ドライバー遺伝子は特定されていなかった。2011年、2014年に日本の研究グループからEGFRとHER2に認められたgerm line mutationsが家族性肺癌のドライバー遺伝子であるという報告(4、5)がなされたが、これらの遺伝子は既に肺癌一般集団(いわゆる非家族性肺癌)におけるドライバー遺伝子として知られていた遺伝子であった。近年、肺癌一般集団に対し次世代型シーケンサーを用いた大規模な解析が次々と発表されている(6)。しかしながら、約40%の非小細胞肺癌においてはドライバー遺伝子が未だに同定されておらず(7)、この40%に含まれる非小細胞肺癌の発癌メカニズムについても解明していく必要があった。

2. 研究の目的

我々はFigure1の家系図に示されるような3世代16人に肺腺癌(非小細胞肺癌)を発症した肺癌家系に遭遇した。肺癌罹患者3名、非罹患者1名に対しExomeシーケンスで解析を行ったところ、MAST1、CENPE、CACNB2、LCTの4遺伝子が肺癌罹患者にのみ共通して認める遺伝子変異であることを発見した。(8)これらの遺伝子はこれまで非小細胞肺癌のドライバー遺伝子として報告されておらず、新規ドライバー遺伝子である可能性がある。そこで、本研究では各遺伝子について機能解析研究を行い、新規ドライバー遺伝子であるかどうかを明らかにすることを目的とした。

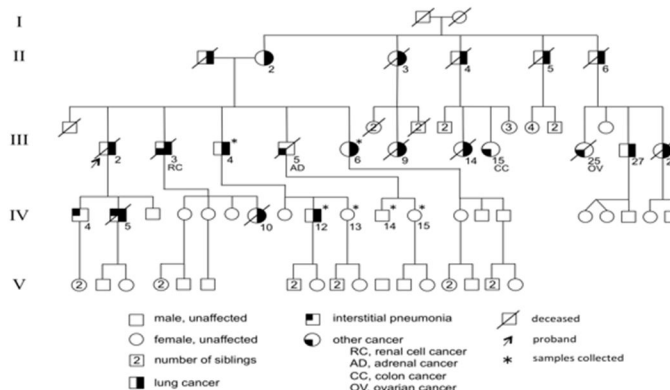


Figure1

3. 研究の方法

【候補遺伝子のノックダウン(loss of function)】

まず最も可能性が高いと考えたMAST1について、同遺伝子を発現している細胞に対し、MAST1の発現を抑制することでその細胞の増殖能が低下するかどうかを検討する。Klijnらは598個の癌細胞株におけるmRNAの発現を網羅的に解析し報告している(9)。収載されている150個の肺癌細胞株についてMAST1の発現($10 < \text{fpkm}$)を調べ、発現が上昇していた非小細胞肺癌細胞株(NCI-H1155)についての実験を行う。MAST1をノックダウンし、細胞遊走能、増殖能が減少するかどうかをin vitro実験系で証明する。MAST1のノックダウンにより細胞増殖が低下すれば、MAST1が細胞増殖における重要な因子であることを証明することができる。また、PTENがMAST1を介して阻害されているならば、MAST1のノックダウンによりPTENの発現が上昇する可能性がある。今回使用する細胞株のPTEN発現はいずれも $3 > \text{fpkm}$ と低発現であるため、MAST1のノックダウンに伴うPTEN発現の変化も併せて検討する予定である。上記と同様の内容で、他の3遺伝子についても検討をおこなう。

4. 研究成果

次世代シーケンサーを用いたある家系の連鎖解析によって肺がんのドライバー遺伝子の候補として挙げられた4つの遺伝子(MAST1、CENPE、CACNB2、LCT)のうち、19p13領域に含まれており、最もドライバー遺伝子である可能性が高いMAST1について、安定的にMAST1遺伝子が発現しているH1155細胞株を用い、si-RNAによるMAST1遺伝子のノックダウン(Loss of function)を行い、q-PCRにて遺伝子発現の変化を確認

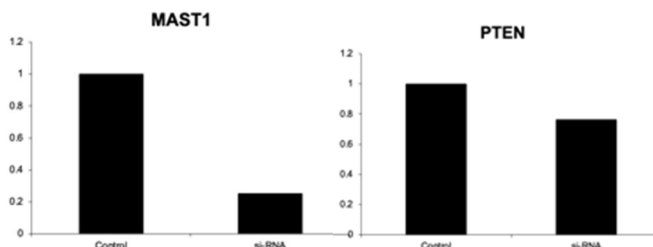


Figure2

Figure3

し優位な低下を認めた。(Figure2)。また、MAST1は癌抑制遺伝子の一つであるPTENの発現との

相関関係が確認されており、PTENの発現レベルの変化についても同時に解析を行なったが、MAST1の発現レベルの低下とPTEN発現レベルには明らかな相関は認められなかった (Figure3)。

並行して、残りの3つの候補遺伝子であるCENPE、CACNB2、LCTについても、A549、H1975、PC9、HCC827、H1437、H1299細胞株を用い、各遺伝子の発現の有無及び発現している細胞株においてはsi-RNAによる各遺伝子のノックダウン (Loss of function) を行い、q-PCRにて遺伝子発現の変化を確認したが、いずれの遺伝子においても発現レベルの優位な低下を認めることはなかった (Figure4:LCT)。Controlの発現レベルが低値であることも一因であった。

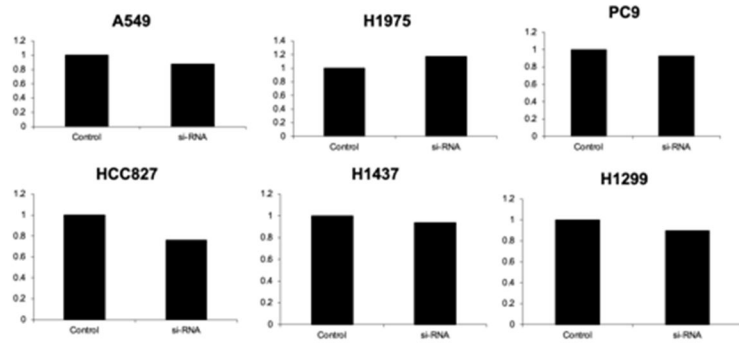


Figure4

MAST1遺伝子発現の低下を認めたH1155細胞株については、レンチウイルスを用い、sh-RNA下に細胞の増殖能、足場非依存性増殖、浸潤能を確認した。その結果、MAST1の発現レベルの低下に伴った細胞増殖能 (MTS assay)、足場非依存性増殖 (Colony formation assay)、浸潤能の低下 (Scratch assay) を確認したが、再現性を有する結果が得られなかった。いずれの実験系も triplicateで行った。(Figure5)

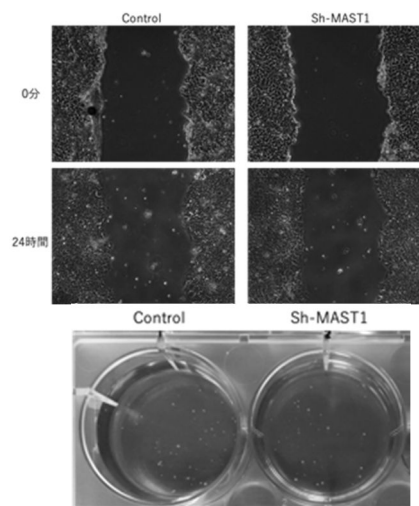


Figure5

当該遺伝子の機能解析ではドライバー変異である証拠は得られず、真の原因は別にあるものと示唆された。単純な塩基変化のみならず、遺伝子の構造異常やプロモーター領域のメチル化によるがん抑制遺伝子の不活化といった複雑なゲノム異常やエピゲノム異常が関係していると考えられるが そのためには全ゲノム解析が必要となる。肺癌罹患者2名から抽出したDNAについて長鎖シーケンサー (PromethION) を用い解析を行なった (Figure6)。サンプルは coverageの平均 15.5x、総リード数 46.7Gb、リード長 最大 232kb、平均長 5.9kb、サンプルは coverageの平均 15.1x、総リード数 45.4Gb、リード長 最大 294kb、平均長 6.4kb のデータ量が得られた。

また、本解析に先立ちサンプル①とサンプル②は短鎖シーケンスにて全ゲノム解析を実施した。サンプル①は平均 coverage54.3x、サンプル②は平均 coverage32.45x のデータ量が得られた。今後は、残りのサンプル (肺癌罹患者1名、家系内非罹患者1名) についても同様に長鎖シーケンサーを用いて解析し、家系内患者に特異的な遺伝子変異や構造異常を見出す予定である。

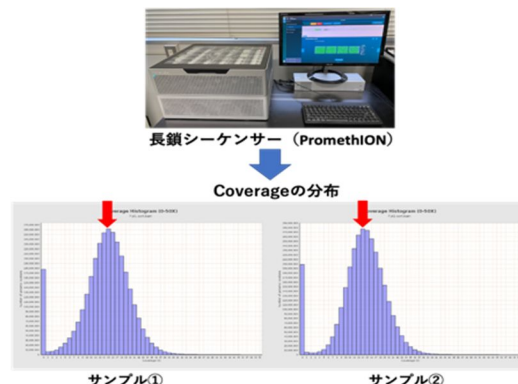


Figure6

- 1 . *Am. J. Hum. Genet.* 2004;75:460-474
- 2 . *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:1326-1330
- 3 . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:517-524
- 4 . *J Clin Oncol.* 2011;29:e191-2
- 5 . *J Natl Cancer Inst.* 2014;106:djt338
- 6 . *Nature.* 2014;511:543-50, *Nature.* 2012;489:519-25
- 7 . *Cancer Sci.* 2016;107:713-20
- 8 . **Tomoshige et al.** *J Hum Genet.* 2015; 60:597-603
- 9 . *Nature Biotechnol.* 2015;33:306-12

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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