

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09617

研究課題名(和文) トランスポゾンスクリーニング手法を用いた子宮平滑筋肉腫の薬剤耐性の解明

研究課題名(英文) Investigation of sarcomagenesis and progression mechanisms in uterine leiomyosarcoma by transposon screening method

研究代表者

小玉 美智子 (Kodama, Michiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70791391

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)：子宮平滑筋肉腫は非常に悪性度が高い希少悪性腫瘍であり、発症や転移の機序に不明な点が多く確立された治療法が存在しない。それらの機序解明を目指して我々はマウスモデルを用いた網羅的な癌遺伝子同定法であるSleeping beautyトランスポゾンスクリーニングを行い、子宮平滑筋肉腫発症・増悪に関与する遺伝子を複数同定した。その中より、マウス原発腫瘍に最も高頻度に認められた変異遺伝子であったZfp217及び、肺転移巣でのNrd1について、両遺伝子のヒトホモログであるZNF217及びNRDCのヒト平滑筋肉腫における働きを検証し、両遺伝子発現抑制による治療効果が期待されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非常に悪性度が高い希少疾患である子宮平滑筋肉腫に対する治療は確立されておらず、新たな治療戦略の確立が望まれている。本研究により子宮平滑筋肉腫に対する新たな治療標的を複数見出し、そのうちの2遺伝子について検証を行い有効性を確認できた。今回検証可能であった遺伝子以外についても今後期待が出来る結果と考える。

希少疾患であることから本疾患を対象とした大規模な遺伝子プロファイルデータセットは存在せず、また将来的にも困難であると想定される。このような希少疾患の発症・増悪に関与する遺伝子異常の同定は極めて難しく、その点においてSBトランスポゾンによるフォワードジェネティクス手法が非常に有用であったと考える。

研究成果の概要(英文)：Uterine leiomyosarcoma is a rare malignancy with extremely high malignant potential. The pathogenesis and metastasis of this tumor are still unknown, therefore, there are no well-established treatments for it. To elucidate the mechanism, we performed a comprehensive forward genetics screen using Sleeping Beauty transposon. This system could identify several genes involved in the onset and progression of uterine leiomyosarcoma in the mouse model. Among them, Zfp217 was the most frequently mutated gene in primary uterine tumors of mice, and Nrd1 was the most frequently mutated gene in lung metastases. ZNF217 and NRDC, human homologs of both genes, were validated in human leiomyosarcoma tissue and cell lines. The therapeutic potential of suppressing these genes was suggested.

研究分野：婦人科悪性腫瘍、フォワードジェネティクス

キーワード：Sleeping beauty トランスポゾンスクリーニング 子宮平滑筋肉腫 発症 増悪 薬剤抵抗性 フォワードジェネティクス

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

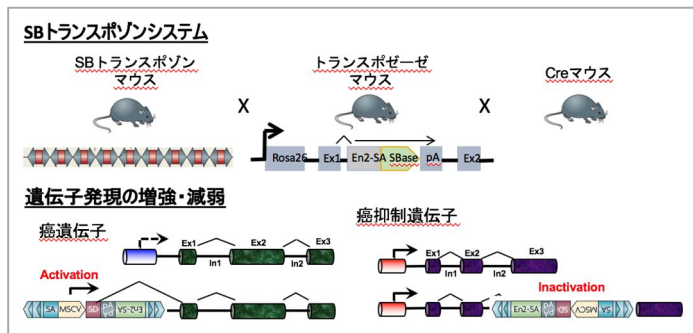
子宮平滑筋肉腫は急速に増大し、かつ早期から血行性転移を来たす、極めて悪性度の高い腫瘍である。本邦における予後報告では、全病期における 50% 生存期間は 31 ヶ月である。限局性腫瘍、または孤発性の遠隔転移病変については手術が適応となるものの、腹腔内再発あるいは遠隔転移が 50% 以上に生じるとされ、前者では平均全生存期間が 28.4 ヶ月、後者で 12.5 ヶ月と極めて予後不良の疾患である。子宮平滑筋肉腫に対する術後化学療法・放射線療法の有効性を支持する高いエビデンスはなく、手術以外に有効な治療手段は存在しないのが現状である。

現時点で推奨される化学療法としては、ドキソルビシン単剤療法あるいはドセタキセル・ゲムシタピン併用療法である。他の選択肢として、イホスファミド、トポテカン、パクリタキセル、シスプラチン、エトポシドなどが単剤療法として行われた報告はあるが、奏効率 0-17%、中央生存期間は 6-9 ヶ月に過ぎない。前述の推奨されるゲムシタピン・ドセタキセル併用療法ですら、報告では奏効率 53%、中央生存期間 17.9 ヶ月であり、エビデンスレベルは 2A と高くないのが現状である (Hensley ML, J Clin Oncol 2002)。昨今の新しい治療選択肢として、本邦では再発悪性軟部腫瘍 (子宮平滑筋肉腫も含む) に対してパゾパニブ、トラベクタジン、エリブリンが使用可能となっているが、効果は無増悪生存期間が各々 4.6 か月、4.0 か月、2.6 ヶ月と極めて限定的である (論文 van der Graaf WT, Lancet 2012, Demetri GD, J Clin Oncol 2016, Schoffski P, Lancet 2016)。

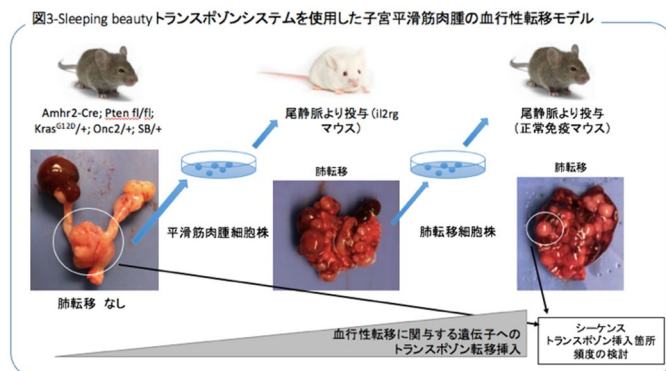
昨今、国際的プロジェクトとして各種癌に対する遺伝子解析データセットの構築が行われてきた。しかし、希少疾患においては、そもそも大規模な症例集積が困難である。子宮平滑筋肉腫を含んだ悪性軟部腫瘍は希少疾患である上に、組織型が様々に存在する為、2017 年にがんゲノムアトラスグループによって報告された悪性軟部腫瘍についての網羅的遺伝子変異データベースは、肉腫のうち 6 組織型を対象として報告されたものであった (Cancer genome atlas program office, Cell 2017)。同報告では悪性軟部腫瘍における遺伝子プロファイルは組織型により非常に異なる事が示されており、治療戦略は組織型によって確立すべきかもしれないが、子宮平滑筋肉腫のみを対象とした症例集積によるデータセット構築は将来的にも難しいと予想され、また大規模臨床試験も症例集積の点で困難であり、新たな治療法を如何に見出すかが課題である。

近年、各種癌に対する新規治療標的を発見する有用な手段として、プール型の RNAi や CRISPR-Cas ライブラリーを用いた Forward genetic screening の手法が用いられている。しかし、その殆どは in vitro で行われており、手技的な困難さから in vivo スクリーニングによる研究報告は非常に少ない。申請者は、より生体内を模倣している in vivo スクリーニングで得られた候補遺伝子は、in vitro で得られる候補遺伝子よりも、実臨床への応用可能性が高いと考え、マウス遺伝学の権威である Nancy Jenkins 博士、Neal Copeland 博士の下で、動物モデルを用いた forward genetic screen のシステムを習得した。同博士らの研究室において、申請者を含む複数の研究者により、これまでに多数の臓器において mutagenic transposon を用いた癌遺伝子スクリーニングを行い、各種癌のドライバー遺伝子を同定し、報告した。SB トランスポゾンスクリーニングとは、ゲノムワイドに無作為に遺伝子変異を起こし、免疫正常マウスの発癌を誘導し、発癌に関与した癌遺伝子を同定する手法である。臓器特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス、Cre リコンビナーゼによって発現が制御されるトランスポゼースを有するマウス、高コピーの Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンを持つマウスを組み合わせると、標的臓器特異

的に、無作為に SB トランスポゾン
が転移挿入を繰り返す SB マウスが
得られる(右図)。SB トランスポゾ
ンは、転移先の遺伝子発現を挿入
位置・方向依存的に減弱・増強させ
るように内部の塩基配列が設計さ
れており、癌遺伝子発現増強ある
いは癌抑制遺伝子発現減弱が生じ



て survival advantage を獲得した細胞は増殖し、発癌するシステムである。発症した数十腫瘍のトランスポゾン挿入部位を次世代シーケンサーにより同定し、発癌に寄与した遺伝子変異を同定・解析することによって、これまでに複数の癌種において癌遺伝子スクリーニングが行われてきた。我々は子宮平滑筋細胞特異的に Pten 欠失・Kras 活性化を生じるマウスをベースに、同じく同細胞特異的にトランスポゾンによる遺伝子発現増減を起こすマウスモデル (Amhr2/SB/Pten/Kras マウス) を確立したところ、子宮平滑筋肉腫が発生した。それらの腫瘍から得た DNA を次世代シーケンサーで解析し、SB トランスポゾンが挿入変異を起こした遺伝子、すなわち腫瘍発生に関与した 19 候補遺伝子を同定した。これら候補遺伝子のうち、ドライバー遺伝子として高頻度の変異が認められたジンクフィンガー蛋白の一つ ZNF217 について、その遺伝子発現阻害がヒト子宮平滑筋肉腫細胞株の細胞増殖能、細胞遊走能、足場非依存性細胞増殖能を抑制しうることを示された。また、右図のような血行性転移モデルから同定された肺転移に関する候補遺伝子について、ナルディライジンをコードする遺伝子 NRDC の発現抑制が、ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株の細胞増殖能に影響しないものの、細胞遊走能及び接着能を有意に抑制することについて検証を進めていた。



2. 研究の目的

トランスポゾンスクリーニングによって同定された子宮平滑筋肉腫発症・血行性肺転移に関するドライバー遺伝候補である ZNF217 及び NRDC について、がん遺伝子としての機能を検証することを目的とした。

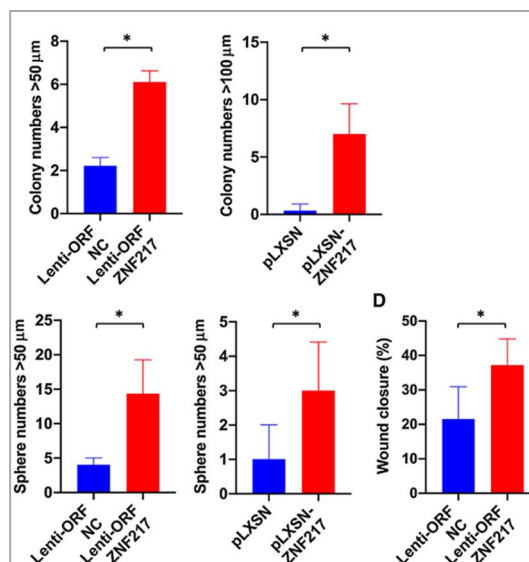
3. 研究の方法

ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株 SK-UT1, SK-LMS1, SKN を使用して、in vitro 実験を行った。平滑筋肉腫発生に関与すると考えられる候補遺伝子 ZNF217 の検証として、Lenti ORF コントロールウイルス及び、Lenti ORF ZNF217 mGFP-tagged ウィルスを用いて遺伝子導入して作成したコントロール株と ZNF217 高発現株、あるいは pLXSN ベクター及び pLXSN-ZNF217 を lipofectamine3000 を用いて一過性に導入したコントロール株と ZNF217 高発現株を用いて、MTS アッセイによる細胞増殖能、軟寒天コロニー形成アッセイによる足場非依存性増殖能、スクラッチアッセイによる細胞遊走能の検討を行った。また、NRDC の検証については、pCMV あるいは pCMV-NRDC を lipofectamine3000 を用いて 3 種類の細胞株にトランスフェクションし、MTS アッセイ

による細胞増殖能の変化、fibronectin に対する細胞接着能及び、boyden chamber を用いた細胞遊走能を評価した。

4. 研究成果

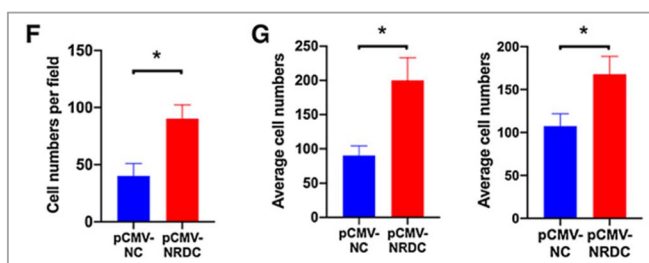
ZNF217 高発現株については、SK-UT1, LMS においてレンチウィルスによる遺伝子導入にて作成が可能であった。レンチウィルス感染条件設定を様々に設定して行うも、SKN については細胞株が死滅し遺伝子導入ができなかったが、pLXSN ベクターの lipofectamine 3000 を用いたトランスフェクションによる一過性導入による高発現株の作成は可能であったため、これらを用いて *in vitro* 実験を行った。いずれの細胞株においても、ウェスタンブロットによって ZNF217 高発現を蛋白レベルで確認可能であった。細胞増殖能については、全 3 細胞株において



ZNF217 高発現細胞はコントロール細胞よりも有意に増加することが MTS アッセイにて確認された。また、ZNF217 発現により、軟寒天コロニー形成アッセイにて足場非依存性増殖能が促進されることを、スクラッチアッセイにて細胞遊走能が促進されることを確認した。

一方、NRDC 高発現株については、SK-UT1 及び SKN においてトランスフェクションによる一過性の遺伝子導入が可能であったが、

LMS については試薬濃度調整、トランスフェクション時間、試薬変更等の条件設定を様々に行うも導入が困難であったため、SK-UT1 と SKN 細胞を使用して *in vitro* 実験を行った。これ



らの 2 細胞株について、ウェスタンブロットによって NRDC 高発現を蛋白レベルで確認した。NRDC 発現によって細胞増殖能について影響を受けないことを MTS アッセイアッセイで確認した。一方、NRDC 発現によってフィブロネクチンに対する細胞接着能及び、細胞遊走能が増強することを確認した。

トランスポゾンスクリーニングによって、マウスに子宮平滑筋肉腫が発生すること、それらの腫瘍から抽出した DNA の次世代シーケンス解析より得られたマウス子宮平滑筋肉腫発生・血行性転移に関与すると考えられる候補遺伝子リスト、その中から注目した ZNF217、NRDC について、遺伝子発現抑制によってヒト子宮平滑筋肉腫の治療効果が期待できる事を示した *in vitro* 及び *in vivo* データ、ヒトサンプルでの遺伝子発現解析、それら二遺伝子の発現増強によるがん遺伝子としての機能の確認、を合わせて英文誌に投稿し掲載受諾となった。

今回、取り組んだ子宮平滑筋肉腫のような希少疾患について、トランスポゾンスクリーニングによる網羅的なフォワードジェネティクス手法が有用であり、複数の治療標的候補を見出す事が可能であった。引き続き、他の候補遺伝子についての検証も進め、新たな治療戦略の確立に繋がっていきたい。

Sleeping Beauty Transposon Mutagenesis Identifies Genes Driving the Initiation and Metastasis of Uterine Leiomyosarcoma. Kodama M, Shimura H, Tien JC, Newberg JY, Kodama T, Wei Z, Rangel R, Yoshihara K, Kuruma A, Nakae A, Hashimoto K, Sawada K, Kimura T, Jenkins NA, Copeland NG. *Cancer Res.* 2021 Nov 1;81(21):5413-5424.

子宮平滑筋肉腫の発症・血行性転移の新規メカニズム解明、大阪大学「未来社会共創を目指す」研究シーズ集 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kodama Michiko, Shimura Hiroko, Tien Jean C., Newberg Justin Y., Kodama Takahiro, Wei Zhubo, Rangel Roberto, Yoshihara Kosuke, Kuruma Airi, Nakae Aya, Hashimoto Kae, Sawada Kenjiro, Kimura Tadashi, Jenkins Nancy A., Copeland Neal G.	4. 巻 81
2. 論文標題 Sleeping Beauty Transposon Mutagenesis Identifies Genes Driving the Initiation and Metastasis of Uterine Leiomyosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5413 ~ 5424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-21-0356	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 小玉美智子、木村正	4. 巻 -
2. 論文標題 子宮平滑筋肉腫の発症・血行性転移の新規メカニズム解明	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 大阪大学「未来社会共創を目指す」研究シーズ集2023	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） なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroko Shimura, Michiko Kodama, Kosuke Yoshihara, Aya Nakae, Kae Hashimoto, Kenjiro Sawada, Tadashi Kimura
2. 発表標題 Screening of cancer driver genes involved in sarcomagenesis and metastasis of uterine leiomyosarcoma using Sleeping Beauty transposon
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学術講演会
4. 発表年 2020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
研究分担者	澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro) (00452392)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	橋本 香映 (Hashimoto Kae) (90612078)	大阪大学・医学部附属病院・特任准教授(常勤) (14401)	

	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
研究協力者	吉原 弘祐 (Yoshihara Kosuke)		
研究協力者	中江 彩 (Nakae Aya)		
研究協力者	志村 寛子 (Shimura Hiroko)		

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