

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09383

研究課題名（和文）日本人前立腺癌における新規融合遺伝子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Exploration of novel fusion gene of prostate cancer in Japan

研究代表者

木村 高弘（Kimura, Takahiro）

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：00307430

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）：前立腺癌患者より樹立した前立腺癌マウス皮下移植モデルの次世代シーケンス解析により同定された遺伝子融合遺伝子ELOVL5:LRRC1の発現を、前立腺癌細胞および臨床検体を用いて検討した。ヒト前立腺癌皮下移植モデル(JDCaPおよびJDCaP-CR)およびヒト前立腺癌細胞株LNCaPではELOVL5:LRRC1遺伝子融合の発現が確認されたが、ヒト前立腺癌細胞株PC3細胞では確認が出来なかった。また臨床検体におけるELOVL5:LRRC1遺伝子融合をFISH法で解析を行い、転移性前立腺癌の生検組織3例において確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当科で前立腺癌患者の転移組織より樹立した内分泌感受性前立腺癌マウス皮下移植モデルJDCaPおよびその去勢抵抗性モデルであるJDCaP-CRの次世代シーケンス解析により同定された遺伝子融合遺伝子ELOVL5:LRRC1を前立腺癌細胞株だけではなく臨床検体においても確認することができた。本研究では、ELOVL5:LRRC1遺伝子融合の前立腺癌における発癌および癌進展への作用の解明には至らなかったが、日本人症例で確認できたことにより、今後の新たなバイオマーカーや治療標的としての可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：The expression of the ELOVL5:LRRC1 gene fusion, identified through next-generation sequencing analysis of a prostate cancer mouse subcutaneous transplantation model established from prostate cancer patients, was investigated using prostate cancer cells and clinical specimens. The expression of the ELOVL5:LRRC1 gene fusion was confirmed in the human prostate cancer subcutaneous transplantation models (JDCaP and JDCaP-CR) and the human prostate cancer cell line LNCaP, but it was not detected in the human prostate cancer cell line PC3. Furthermore, analysis of the ELOVL5:LRRC1 gene fusion in clinical specimens using the FISH method confirmed its presence in three biopsy samples of metastatic prostate cancer.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 融合遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は本邦の男性において最も増加している癌であるが、頻度や治療効果に人種差があることも知られている。前立腺癌は比較的緩徐な進行を示すが、転移癌は多くの薬物が開発されている現状においても根治することは出来ない。日本で急増する前立腺癌の発癌メカニズムを解明することは重要な研究課題である。

一方で日本人における TMPRSS2:ERG 遺伝子融合の頻度は低く、申請者の研究では局所癌で 16.3% (Kimura T, et al. Pathol Int. 2012;62:742-8)、転移癌でも 14.3% であった (Koide H, et al. Prostate. 2019;79:3-8)。この事は TMPRSS2:ERG 遺伝子融合を標的とした治療は日本人では効果が乏しい可能性を示唆しているが、遺伝学的人種差が存在する前立腺癌には、日本人独自の遺伝子融合の存在が示唆される。その融合遺伝子を発見することは、日本人前立腺癌における発癌メカニズムの解明と治療法の開発につながる、日本人前立腺癌研究の核心をなす重要な学術的な「問い」であると考え、研究を行ってきた。

申請者は日本人前立腺癌患者の転移組織より樹立した内分泌感受性前立腺癌モデル JDCaP (Kimura T, et al. Prostate. 2009;69:1660-7) およびその去勢抵抗性モデルである JDCaP-CR (Honda M, et al. Prostate. 2019;79:1043-1052) の次世代シーケンス解析により、遺伝子融合遺伝子候補を同定した。両モデルより計 6 つの遺伝子融合が同定され、特に両モデルで変異が同定された ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合に注目した。両遺伝子ともに 6 番染色体上に位置し、ELOVL5 は前立腺癌細胞株 LNCaP においてアンドロゲン投与下に発現が増加することが報告されており、LRRC1 は肝細胞癌で発現が亢進していることが報告されている分子である。この遺伝子融合は日本人における前立腺癌の発癌や進展に関連する重要な遺伝子変異である可能性があると考えている

2. 研究の目的

前立腺癌における融合遺伝子は TMPRSS2:ERG 以外にも数多く報告されているが、アジア人種に関する研究は少なく、TMPRSS2:ERG 以外の遺伝子融合に関しては知見が得られていない。日本人特有の融合遺伝子の探索は高い独自性があると考えた。本研究は日本人の前立腺癌における新たな融合遺伝子を同定し、その機能を解析することを目的とする。新たな融合遺伝子の発見は日本人前立腺癌の新たな発癌メカニズムの解明と治療法の開発につながると考えている。

3. 研究の方法

(1) ヒト前立腺癌モデルおよび前立腺癌細胞株における検討

ヒト前立腺癌モデル (JDCaP) およびヒト前立腺癌細胞株が ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合を有する事を RT-PCR 法および FISH 法で確認する。また、ELOVL5 および LRRC1 蛋白の発現をウエスタンブロット法で確認する。

(2) 臨床検体における解析

限局性前立腺癌の前立腺全摘組織、転移性前立腺癌の生検組織、去勢抵抗性前立腺癌の転移組織 (ホルマリン固定パラフィン包埋組織) を対象として FISH 法解析および免疫組織染色を施行する。ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合の頻度、それに伴う蛋白発現の変化、さらに癌の悪性度および進行との関連性について検討する。

(3) ELOVL5:LRRC1 融合遺伝子発現前立腺細胞株の作製と機能解析

JDCaP より抽出した RNA より RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を用いて ELOVL5:LRRC1 融合遺伝子の cDNA 全長を合成する。合成した cDNA をレンチウイルスベクターに組み込み、ELOVL5:LRRC1 発現ベクターを作成する。ELOVL5:LRRC1 融合遺伝子を発現していない前立腺癌細胞株に対し、Gene Editing CRISPR Cas9 法により ELOVL5 および LRRC1 遺伝子を欠損させる。さらに作成した発現ベクターを用いて、ELOVL5:LRRC1 融合遺伝子発現前立腺細胞株を作成する。ELOVL5:LRRC1 融合遺伝子発現細胞株および親株を用いて以下の実験を行う。

MTS アッセイにより細胞増殖能に与える影響を検討する

細胞浸潤アッセイにより細胞浸潤能の変化を検討する

ピカルタミドによる治療実験により内分泌感受性に与える影響を検討する

(4) 臨床検体をもちいた新規融合遺伝子の探索

自由意思による同意の得られた転移性前立腺癌患者の末梢血から CTC を採取し、RNA を抽出する。ナノポアシーケンス解析は従来の次世代シーケンス解析に比べ、解析できるリード長が長いことから融合遺伝子の探索に有効性が高い。本研究では、この解析法を用いて、患者より採取した CTC から抽出した RNA における融合遺伝子を探索する。同定された融合遺伝子はサンガーシーケンス法で塩基配列を検証する。

4. 研究成果

(1) ヒト前立腺癌モデルおよび前立腺癌細胞株における検討

当科で前立腺癌患者の転移組織より樹立した内分泌感受性前立腺癌マウス皮下移植モデル JDCaP およびその去勢抵抗性モデルである JDCaP-CR の次世代シーケンス解析により同定された遺伝子融合遺伝子 ELOVL5:LRRC1 の発現を、前立腺癌細胞および臨床検体を用いて検討した。ヒト前立腺癌皮下移植モデル(JDCaP および JDCaP-CR)およびヒト前立腺癌細胞株 PC3 および LNCaP が ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合を有する事を RT-PCR 法で検討し、JDCaP、JDCaP-CR および LNCaP では ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合の発現が確認されたが、PC3 細胞では確認が出来なかった。さらに FISH 法においても、LNCaP で ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合を確認する事が出来た。さらに JDCaP、JDCaP-CR においても、ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合を確認した。図 1 に JDCaP 細胞における ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合を示す FISH の結果を示す。図 2 は実際のシーケンスの結果。

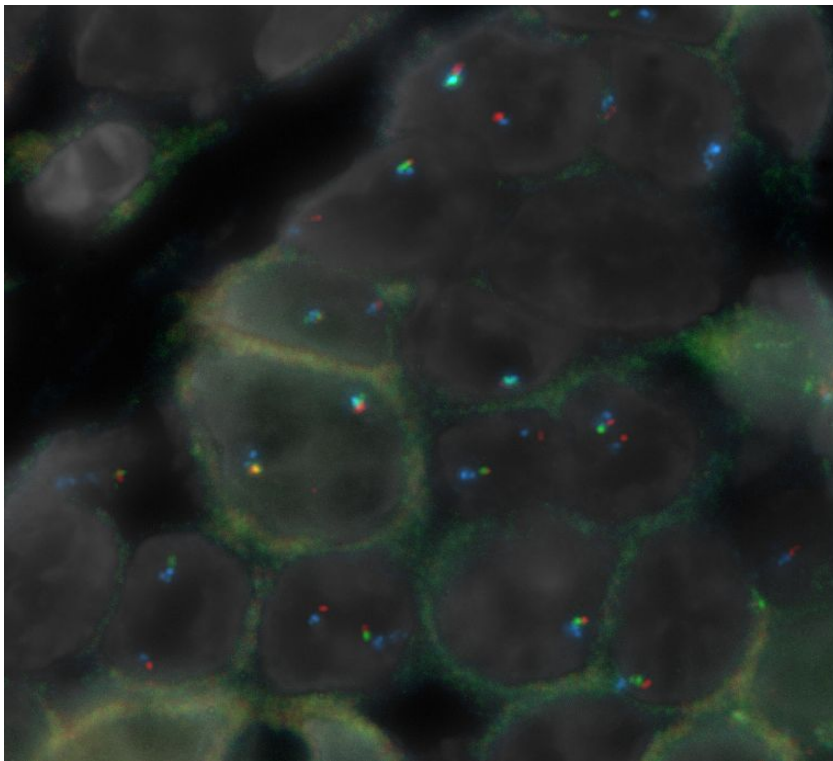


図 1 JDCaP 細胞における ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合 (FISH 法)
矢印の細胞で、染色体の一部の領域 (緑の部分) が欠失し、遺伝子融合が起こっている。

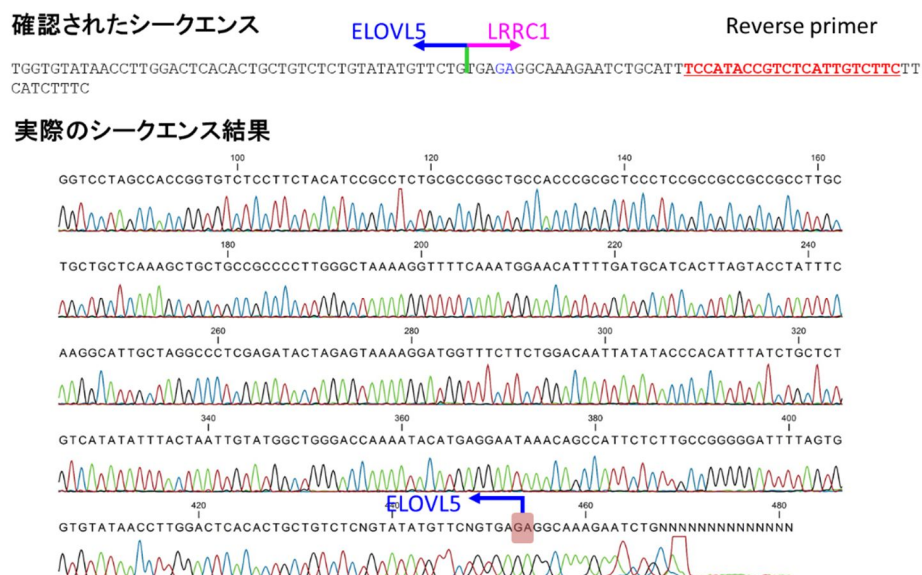


図 2 実際に確認された ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合のシーケンス

(2) 臨床検体における解析

臨床検体における ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合の発現を解析するため、限局性前立腺癌の前立腺全摘組織 10 例、転移性前立腺癌の生検組織 10 例、去勢抵抗性前立腺癌の転移組織(ホルマリン固定パラフィン包埋組織) 5 例を対象として FISH 法解析および免疫組織染色の検討を行った。免疫染色法では現時点までに ELOVL5 および LRRC1 蛋白を検出する系を確立することができなかつたが、FISH 法において転移性前立腺癌の生検組織 3 例において、ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合を確認することができた。表に臨床検体の臨床像と ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合の発現を示す。

表 臨床検体における ELOVL5:LRRC1 遺伝子融合の発現

| 症例 | Status | 年齢 | PSA (ng/ml) | Grade Group | T stage | N stage | M stage | ELOVL5:LRRC1遺伝子融合 |
|----|--------|----|-------------|-------------|---------|---------|---------|-------------------|
| 1 | 限局癌 | 64 | 6.3 | 2 | 1 | 0 | 0 | なし |
| 2 | 限局癌 | 72 | 12.6 | 4 | 2 | 0 | 0 | なし |
| 3 | 限局癌 | 70 | 5.3 | 3 | 1 | 0 | 0 | なし |
| 4 | 限局癌 | 58 | 9.8 | 3 | 3 | 0 | 0 | なし |
| 5 | 限局癌 | 63 | 15.6 | 5 | 2 | 0 | 0 | なし |
| 6 | 限局癌 | 68 | 8.3 | 4 | 2 | 0 | 0 | なし |
| 7 | 限局癌 | 64 | 4.3 | 2 | 1 | 0 | 0 | なし |
| 8 | 限局癌 | 75 | 22 | 5 | 3 | 0 | 0 | なし |
| 9 | 限局癌 | 60 | 10.6 | 2 | 2 | 0 | 0 | なし |
| 10 | 限局癌 | 67 | 9.8 | 3 | 2 | 0 | 0 | なし |
| 11 | 転移癌 | 68 | 568.3 | 5 | 4 | 0 | 1b | なし |
| 12 | 転移癌 | 72 | 1002.3 | 5 | 4 | 0 | 1b | 有 |
| 13 | 転移癌 | 78 | 463.5 | 4 | 3 | 1 | 1b | なし |
| 14 | 転移癌 | 69 | 1985.3 | 5 | 4 | 0 | 1b | なし |
| 15 | 転移癌 | 82 | 752.1 | 5 | 4 | 0 | 1b | 有 |
| 16 | 転移癌 | 69 | 58 | 5 | 4 | 0 | 1b | なし |
| 17 | 転移癌 | 76 | 105.8 | 3 | 3 | 0 | 1b | なし |
| 18 | 転移癌 | 73 | 614.9 | 5 | 4 | 1 | 1b | なし |
| 19 | 転移癌 | 62 | 2698.7 | 5 | 4 | 1 | 1c | 有 |
| 20 | 転移癌 | 76 | 963.2 | 5 | 2 | 0 | 1b | なし |
| 21 | 去勢抵抗性癌 | 77 | 16.3 | 4 | 4 | 0 | 1b | なし |
| 22 | 去勢抵抗性癌 | 68 | 2.6 | 5 | 3 | 1 | 1b | なし |
| 23 | 去勢抵抗性癌 | 64 | 76.2 | 5 | 4 | 0 | 1c | なし |
| 24 | 去勢抵抗性癌 | 73 | 14.2 | 5 | 4 | 1 | 1b | なし |
| 25 | 去勢抵抗性癌 | 76 | 5.9 | 5 | 3 | 0 | 1b | なし |

(3) ELOVL5:LRRC1 融合遺伝子発現前立腺細胞株の作製と機能解析

ELOVL5:LRRC1 の機能を解析するために ELOVL5:LRRC1 遺伝子発現前立腺株の作成

を行った。ELOVL5:LRRC1 遺伝子発現レンチウイルスベクターを作成し、PC 3 に遺伝子導入を行っている。現時点で ELOVL5:LRRC1 遺伝子発現株を樹立することができず、今後の課題となった。

(4) 臨床検体をもちいた新規融合遺伝子の探索

自由意思による同意の得られた転移性前立腺癌患者の末梢血から CTC の採取を行ったが、期間内に十分な検体を得ることができず、今後の課題となった。現在も収集を進めている。

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|