

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590715

研究課題名(和文)日本人悪性中皮腫に高頻度で見出された3p領域欠損の機能解析と診断への応用

研究課題名(英文) Deletion of the 3p region in malignant mesothelioma cells derived from Japanese patients

研究代表者

玉置 知子(橋本知子)(Hashimoto-Tamaoki, Tomoko)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10172868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の散发性悪性中皮腫(MM)のゲノム解析を行った。3p21.2領域のヒストン修飾に関わるBAP1遺伝子欠損を効率よく検出するMLPA法を確立した。8細胞を全エクソーム解析し欠損や機能喪失が予測されるゲノム多型を両アレルにもつ遺伝子を拾い上げた。その大半がクロマチンリモデリングに関わるmSWEI/SNF・転写因子とそのコファクタであった。MMはHDAC阻害剤にも抵抗性であり、これらの機能喪失が抵抗性の原因であるとともに、BAP1変異を含めMM成立に重要と考えられた。上記variantにはgermline由来のものもあり、germlineでのMM易罹患性の指標となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The BAP1 gene, one of the histone modifiers, on 3p21.1 is frequently deleted or mutated in the malignant mesothelioma (MM) cell lines established from sporadic Japanese cases. We established the MLPA method to detect its deletion. Using whole exome analysis of eight MM cell lines, we picked up 312 genes with biallelic deletions and/or variants with protein damaging. Gene annotation analysis revealed that 302 genes belong to the family genes of histone modifier, chromatin remodeling (especially mSWEI/SNF), transcription factors and their co-factors. We also detected several MM cells were resistant to HDAC-inhibitors. Since HDAC-inhibitors lead to growth arrest and differentiation through histone modifiers, they were not effective to MM cells without these factors. We also detected that several somatic variants detected by whole exome analysis were derived from germline, suggesting that these germline variants may be useful markers to detect MM susceptibility.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：悪性中皮腫 3p領域 BAP1遺伝子 クロマチンリモデリング 転写制御 HDAC阻害剤 ゲノム多型 易罹患性

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性中皮腫 (Malignant mesothelioma, MM) は、アスベストが発症に関わり、今後も増加が見込まれている。しかし治療に高度に抵抗性で、分子標的薬も未だ効果的なものがない。早期発見のための分子マーカーも明らかでない。

(2) 我々は、兵庫医科大学近隣の尼崎地区の MM 患者の腫瘍組織から細胞株を樹立し(引用文献 1)、遺伝子変異を検索した。その結果、染色体 9p にあるがん抑制遺伝子、CDKN2A が全例で欠損していることを見出した(2)。病理組織からは、マイクロダイセクションで MM 細胞のみを分取しリアルタイム PCR で分析すると欠損が確認できた。

(3) 一方で我々は、3p21.1 領域に欠損のホットスポットがあり、遺伝子発現ではセマフォリンファミリー遺伝子の発現増加があることを見出していた(2)。しかし特定の遺伝子の関与は不明であった。我々はさらに 3p21.1 領域を詳細に検索したところ、この部分にマッピングされる BAP1 遺伝子には欠損以外に点変異を含む様々な変異が集積することを見出した(3)。とくに MM の 2/3 以上の組織型を占める上皮型において、BAP1 変異(欠損を含む)は 80% 以上という高頻度に見出されたことから、診断のよいマーカーになると考えられた(3)。

しかし BAP1 変異の検出率は欧米では 20 - 30% にとどまっていたことから、我々の提示した変異率が高すぎるとした懐疑的なコメントも散見されていた。よって BAP1 遺伝子変異、特に 1 アレル欠損を確実に検出する方法の確立が必要であった。

(4) BAP1 遺伝子の変異と MM の関係については、遺伝性のぶどう膜メラノーマと MM 等を併発する家系で、生殖細胞系列変異 (germline mutation) が報告されたが、我々の症例を含め本邦ではこのような家系は見出されておらず、他に易罹患性に関わる分

子がないかの検討が必要と考えた。

(5) MM が抵抗性を示す通常の化学療法剤は、細胞周期停止や細胞死誘導に働くものが多い。一方で、クロマチン構造はヒストンのアセチル化で変化する。放射線で処理した細胞のクロマチン構造の修復には BAP1 が関わることは、我々がすでに見出していた(3)。ヒストン脱アセチル酵素阻害剤 (Histone deacetylase inhibitor, HDAC-I) は、ヒストンのアセチル化状態を保ち、遺伝子転写を促進する。転写が促進されるのは細胞増殖の抑制・細胞分化誘導に関わる遺伝子が主であり、p53 や RAS 遺伝子に変異を持つ進行・難治性の癌にも効果があることを我々も肝がんで報告していた(4)。また我々は予備実験で、MM には HDAC-I の効果が少ないことを見出していた。

2. 研究の目的

(1) MM の somatic mutation を網羅的に調べ、MM 細胞同士の共通の特徴となる遺伝子変異を検索する

これまでのデータ(2,3)をもとに全エクソーム解析を追加し、幅広く somatic mutation を見つける。見出された somatic mutation に共通したパスウェイを探索する。共通性があればこれらの遺伝子の上流の遺伝子を検索し、MM の発生機構を解明する。特に 3p21.1 領域のゲノム不安定性に注目する。

(2) 上記で見出された Somatic mutation が germline 由来かどうかを検討する

Somatic mutation の由来が germline にあれば、易罹患性のマーカーおよび予防的治療のターゲットとして期待できる。

(3) BAP1 領域の遺伝子変異、特に 1 アレル欠損を確実に簡易に見つける方法を確立する

BAP1 遺伝子欠損の検出を確実にするため、定量に優れる MLPA 法を導入する。

(4) 3p21 領域の不安定性と MM 発症の関

係を検討する

本研究を開始直後に、BAP1 近傍に位置する PBRM1 欠損が腎がんで高頻度に見られることが報告された。MM 例でも PBRM1 欠損例があったことより、BAP1 と PBRM1 の発現抑制効果を培養細胞で検証する。

(5) HDAC-I を用いて、MM への効果を検討する

HDAC-I 効果を培養 MM 細胞で検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞:MM 細胞は本学で樹立された細胞株を用いた(1)。正常中皮細胞は ATCC より入手した Met5a 細胞、反応性中皮細胞は本学樹立細胞を用いた(2)。

(2) HDAC-I の効果:MM 細胞培養液中に Panabinstat や Sodium butyrate を添加、細胞増殖、IC50、ヒストンのアセチル化を検討した。Met5a 細胞への効果と比較した。

(3) ゲノム解析:Somatic mutation 解析には MM ゲノム DNA で次世代シーケンサーを用いて全 exome 解析を施行、SNP array CGH、microsatellite 多型分析で Loss of Heterozygosity (LOH) を検索した。Germline 解析には末梢血 DNA を使用した。得られた variant (多型、変異)については 1000 人ゲノムデータと比較し多型として登録されているかを調べるとともに、複数のタンパク機能予測ソフトを利用し変異により機能ダメージが予測されるかどうかを調べた。

(4) BAP1 の MLPA 解析方法の検討: MLPA system of MRC-Holland を用いた。

(5) BAP1・PBRM1 の発現抑制:それぞれの siRNA を正常中皮由来 Met5a 細胞に導入し効果を検討した。

4. 研究成果

(1) HDAC-I の効果

2 種類の HDAC-I への感受性を MM 細胞

6 株で調べた。2 細胞は Met5a 細胞と同程度の感受性であったが、4 細胞は 2 倍以上の抵抗性を示した。

(2) MM 細胞における Somatic mutation

上記の MM 細胞 6 株を含めた 8 株で全エクソーム解析を完了した。8 株は我々が高頻度に MM で変異があることを報告した BAP1 との関連を見る目的で、上皮型 5 細胞 (BAP1 両アレル欠損 2 株、1 アレル欠損/1 アレル変異 1 株、変異なし 2 株)、非上皮型 3 細胞 (変異なし) を選択した。

結果として、全エクソーム解析を導入したにも関わらず、我々が見出した CDKN2A、BAP1 と他施設で注目された NF2 のように、半数以上の MM 細胞で共通する変異 (欠損・variant) をもつ遺伝子は新たに見つからなかった。そこで、8 細胞中の少なくとも 1 細胞で、両アレルに欠損か variant がある遺伝子を拾い上げた。Variant の場合には、遺伝子産物にダメージを与えると推測されるものを選択した。その結果、318 遺伝子が挙がり、annotation 分析を行うと、そのうちの 302 遺伝子が SWI/SNF (mSWI/SNF) クロマチンリモデリングや転写制御に関わる因子であることが判明した。Sanger 法で、SMARCA4、PBRM1、ARID2 のホモ接合変異を確認した。しかし 8 株すべてに共通する変異は見出されず、それぞれに上記因子群のうちの複数の遺伝子に変異が見られたが、それぞれの変異のプロファイルは異なっていた。

クロマチンリモデリング、特に SWI/SNF 遺伝子群の 4 遺伝子 (PBRM1、ARID2、SMARCA1、SMARCC1) に注目すると、8 細胞すべてがこのうちの少なくとも 1 つの遺伝子に変異を持っていた。さらに BAP1 変異をもつ 3 株は、BAP1 と同様、ヒストン修飾に関する遺伝子である SETD2、USP49、PRMT6 のいずれかに変異を持っていた。BAP1 変異を持たない他の 5 株は、転写因子とそのコファクター遺伝子の 2 遺伝子以上に変異

を持っていた。よって、MM 株は、変異がある遺伝子群の違いから、2 群に分けられると考えられた。その他、5 細胞が、シグナル伝達に関する 8 遺伝子にも変異を持っていた。変異の内容としては、欠損以外の variant の大半は稀なゲノム多型であり、タンパク機能にダメージが予測された。なお、SMARCC1、SETD2 は 3p21.31 にマッピングされ、3p21.1 にある BAP1、PBRM1 の近傍にある。

(3) Somatic mutation の由来

さらに我々は、MM 株で認められた上記の variant が germline に由来するかどうかを検討した。その結果、クロマチンリモデリング遺伝子群の ARID2、ARID3C、BRD1、ヒストン修飾遺伝子の USP49、転写因子関連遺伝子の GTF2H5、E2F7、EP300、PAX4、PAX7、TSC22D4、SUPT6H、NLLT1、NROB2、CDCA4、CDK19、DCC、NOTCH3、USP6、シグナル伝達系遺伝子の PLD2、NF1、ARHGAP11A、TBC1D2 は、germline ですでにヘテロ接合であることが判明した。

MM19 症例の germline には、SMARCC1、SETD2 に機能ダメージが予測される稀な variant があったが、3p 領域の LOH もあり、反応性中皮でも同様であった。しかし MM ではこの 1 アレルが欠損していた(図1)。

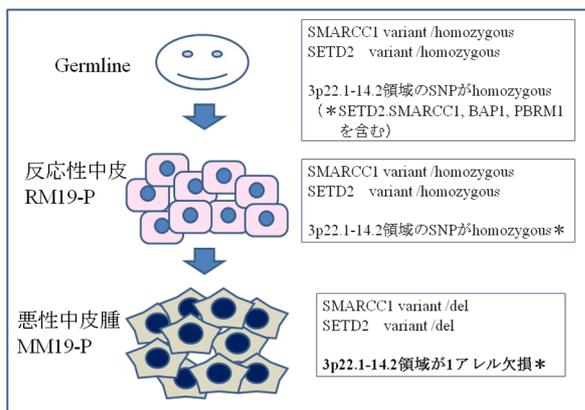


図 1. MM19 症例での疾患の進展と 3p 領域の不安定性

正常細胞、反応性中皮、MM への進展による 3p 領域のゲノム変異を示す。ホモ接合かどうかは、microsatellite 多型解析で調べた。

このように、MM 患者では、germline の段階でクロマチン構造を維持し転写を制御する遺伝子群にタンパクの機能ダメージをもたらす稀な variant が見られたことは、アスベスト曝露による疾患発症のリスクが germline 多型から推定できる可能性を示唆する。また MM への進展には、ゲノム不安定性が関わる可能性も示唆された。

(4) BAP1 もしくは PBRM1 欠損効果

今回の解析でも、BAP1、PBRM1 の germline 変異は見つからなかった。しかし MM では、BAP1 と PBRM1 の変異はいずれもタンパク機能喪失性であるため、それぞれの siRNA を Met5a に導入して遺伝子抑制効果を検討した。BAP1 の siRNA では、予想に反して細胞の apoptosis が引き起こされた。PBRM1 の siRNA では apoptosis 誘導も細胞増殖誘導も認めなかった。しかしそれぞれの siRNA の短時間処理では DNA 障害の修復に影響がみられたことから、これらの遺伝子のノックダウンは細胞死よりもむしろゲノムの不安定性に寄与すると考えられた。

(5) BAP1 遺伝子欠損の MLPA 検索法

すでに BAP1 変異が判明している兵庫医大 MM ゲノムを用いて、MLPA 法を検討したところ、BAP1 の 17 個のエクソンのうち、複数の細胞株で部分的な欠損、全体の欠損 (1 アレルもしくは 2 アレル) を確実に検出することができた。

結果のサマリーと考察

(1) MM ではヒストン修飾・クロマチン構造の維持に関わる遺伝子群・転写制御に関わる遺伝子群のうちで、複数の遺伝子に変異が認められたが、細胞ごとに変異のプロファイルが異なっており、研究当初に想定したように、少数のマスター遺伝子に変異があるとの結果は得られなかった。

(2) MM では HDAC-I 抵抗性株が多いこと

が確認された。MM 細胞のゲノム解析の結果から、MM では HDAC-I が有効に働くための因子が欠損していることが明らかになった。よってこれが MM では HDAC-I の効果が無い/少ない原因と考えられた。なお 2015 年 4 月に、臨床研究において HDAC-I が無効とれ(5)、我々の推論が裏付けられた。

(3) MM 患者の Germline で、タンパク機能のダメージが予測される稀な variant が見つかったことは、MM の易罹患性を考える上で、重要なデータである。

(4) BAP1 遺伝子変異の頻度は、我々のデータが世界で最も高かった(2,3)ため、米国の研究室と連携して状況を調べた。すると、手術・病理標本に大量の正常組織が混入した状態で DNA が抽出されていることが判明した。この状況がわかって以来、他施設でも BAP1 変異の検出率が上昇してきている。今回の MLPA 法を確立したため、今後は欠損の検出が容易かつ迅速になると期待される。

(5) BAP1 変異は上皮型 MM で頻度が高い(2,3)が、上皮型は他の組織型よりもやや予後が良い傾向にあることが知られており、家族性 BAP1 変異をもつ症例の MM は相対的に軽症とされる。我々の BAP1 抑制実験では apoptosis が誘導された結果とも関連する可能性がある。MM 発生と BAP1 欠損の役割については再考すべき余地があると考えられた。

引用文献

1. Establishment of a cell line from a Japanese patient useful for generating an in vivo model of malignant pleural mesothelioma. Sato A, Torii I, Tao LH, Song M, Kondo N, Yoshikawa Y, Hashimoto-Tamaoki T, Hasegawa S, Nakano T, Tsujimura T. Cancer Sci. 2011 Mar;102(3): 648-55.

2. Frequent deletion of 3p21.1 region carrying semaphorin 3G and aberrant expression of the genes participating in semaphorin signaling in the epithelioid type of malignant mesothelioma cells. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Morinaga T, Fukuoka K, Yamada S, Murakami A, Kondo N, Matsumoto S, Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S, Hashimoto-Tamaoki T, Nakano T. Int J Oncol. 2011 Dec;39(6):1365-74.

3. Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Emi M, Morinaga T, Fukuoka K, Yamada S, Murakami A, Kondo N, Matsumoto S, Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. Cancer Sci. 2012 May;103(5):868-74.

4. Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate in vitro and in vivo. Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Furuyama J, Tamaoki T, Hashimoto-Tamaoki T. Int J Cancer. 1998 Jun 10;76(6):897-902.

5. Vorinostat in patients with advanced malignant pleural mesothelioma who have progressed on previous chemotherapy (VANTAGE-014): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. Krug LM, et al. 2015 Apr;16(4):447-56.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 2 件)

1. Biallelic germline and somatic mutations in malignant mesothelioma: multiple mutations in transcription regulators including mSWI/SNF genes. Yoshikawa Y,

Sato A, Tsujimura T, Otsuki T, Fukuoka K, Hasegawa S, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. Int J Cancer. 2015 Feb 1;136(3): 560-71. (査読有)

2. Frequent genomic rearrangements of BRCA1-Associated Protein1 (BAP1) gene in Japanese malignant mesothelioma -characterization of deletions at exon level -. Emi M, Yoshikawa Y, Sato C, Sato A, Sato H, Kato T, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, and Hashimoto-Tamaoki T. J. Hum Genet (in press) (査読有)

(学会発表)(計 5 件)

1. 悪性中皮腫細胞では複数の転写制御遺伝子に、生殖細胞系列変異に体細胞変異が加味されたパイアレリックな変異が検出される。 吉川 良恵、大搦 泰一郎、久保 秀司、佐藤 鮎子、辻村 亨、江見 充、中野 孝司、玉置(橋本)知子. 第 73 回日本癌学会. 2014.9.25-27. パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
2. 悪性中皮腫における BAP1 と PBRM1 遺伝子の複合欠失と癌化における役割. 吉川良恵、佐藤鮎子、辻村亨、久保秀司、江見充、長谷川誠紀、中野孝司、玉置(橋本)知子. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013.10.3-5. パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
3. 悪性中皮腫に高頻度に見られたゲノム変異. 玉置(橋本)知子、吉川良恵、佐藤鮎子、辻村亨、森永伴法、長谷川誠紀、中野孝司. 日本人類遺伝学会第 57 回大会. 2012. 10.25-27. 京王プラザホテル(東京都)
4. BAP1 遺伝子の上皮型悪性中皮腫での高頻度欠失. 吉川良恵、江見充、森永伴法、久保秀司、佐藤鮎子、辻村亨、長谷川誠紀、中野孝司、玉置(橋本)知子. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012.9.19-21. ホテルロ

イトン札幌(北海道・札幌市)

5. 悪性中皮腫における BAP1 遺伝子欠失の MLPA 法での詳細解析. 江見充、佐藤秀則、吉川良恵、森永伴法、佐藤鮎子、久保秀司、辻村亨、長谷川誠紀、中野孝司、玉置(橋本)知子. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012.9.19-21. ホテルロイトン札幌(北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉置 知子(橋本 知子)
(HASHIMOTO-TAMAOKI, Tomoko)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号:10172868

(2)研究分担者

吉川 良恵 (YOSHIKAWA, Yoshie)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号:10566673

森永 伴法(MORINAGA Tomonori)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号:10351818

久保 秀司(KUBO Shuji)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号:10441320

(3)連携研究者

江見 充(EMI Mitsuru)
兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授
研究者番号:90221118

島 博基(SHIMA Hiroki)
兵庫医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号:90104257