

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08745

研究課題名（和文）エピゲノム修飾因子の機能解析による小児固形腫瘍の発症機構解明

研究課題名（英文）Research on the tumorigenic mechanism of pediatric solid tumors by analyzing an epigenetics related gene

研究代表者

大喜多 肇 (Okita, Hajime)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：50317260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：小児の腎腫瘍である腎明細胞肉腫では、non-canonical PRCの構成要素であるBCORの遺伝子内重複変異が特徴的である。他の肉腫等においても同遺伝子の変異や融合遺伝子が報告されている。本研究では、BCORの遺伝子内重複配列は、複数の細胞で明らかな形質転換能を示さず、腫瘍発生は、細胞環境に依存する可能性が高いと考えられた。一方、293細胞に過剰発現させると、エピジェネティクス関連分子を含む多数の遺伝子の発現が変化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BCOR遺伝子内重複変異による腫瘍発生の機序は今までほとんど明らかにされていない。発生機序の解析の積み重ねにより、診断法・治療法開発や、BCORの機能の解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Clear cell sarcoma of the kidney is a pediatric renal tumor and characterized by an intragenic duplication mutation of BCOR. The intragenic duplicated sequence of this gene showed no definite transformation ability in multiple cell lines, and transformation with this gene is likely to be dependent on the cellular context. However its overexpression in 293 cells changed gene expression, including several epigenetics related genes, and it was suggested that this gene might be involved in tumorigenesis.

研究分野：人体病理学

キーワード：がん

1. 研究開始当初の背景

小児腎腫瘍では、腎芽腫(ウイルムス腫瘍)が最も頻度が高いが、腎明細胞肉腫(CCSK)、腎ラブドイド腫瘍(RTK)、間葉芽腎腫(CMN)、ユーイング肉腫 Xp11.2 転座/TFE3 遺伝子融合を伴う腎癌(転座型腎癌)等もしばしば発生する。腎芽腫、RTK、と CMN(富細胞型)、ユーイング肉腫、転座型腎癌では、腫瘍発生に重要と考えられる遺伝子異常が報告されたとともに、鑑別診断に応用され、腫瘍発生機構の解析が行なわれている。しかしながら、CCSK は、共通した遺伝子変異の報告がほとんどなく、僅かに CCSK の 12%に転座による YWHAE-NUTM2 の融合遺伝子が報告されたが、19 例の自験例では、融合遺伝子は検出されていない。また、欧州からの RNA シークエンスの結果や米国の全ゲノムシークエンスの結果でも、腫瘍に共通する融合遺伝子や遺伝子変異は発見されなかった。研究代表者らが CCSK のほぼ全例に存在する遺伝子異常として、BCL6 corepressor (BCOR) 遺伝子異常を報告した。BCOR は BCL6 corepressor として単離された転写抑制因子であるが、近年はポリコム複合体の要素としても機能することが示されている。同異常は、BCOR の C 末端近傍の約 100 塩基の遺伝子内重複(internal tandem duplication; BCOR-ITD)であり、特にポリコム複合体の 1 つである、BCOR 複合体(異性型 PRC1)の形成に必要な PCGF Ub-like fold discriminator (PUFD) ドメインを含む領域に存在することから、BCOR-ITD が CCSK のドライバー遺伝子変異である可能性が極めて高いと考えられる。

一方、近年、ユーイング肉腫に類似した小円形細胞肉腫の多くに、BCOR と CCNB3 の融合遺伝子が存在することが報告された。病理学的には小円形細胞腫瘍という点で、CCSK と共通点があるものの、臨床的にはより悪性度が高く、別のタイプの腫瘍である。BCOR-CCNB3 は BCOR のほぼ末端部分に CCNB3 が結合しており、BCOR C 末端に結合するという点で CCSK にみられる BCOR 変異と類似している。しかしながら精巢特異的サイクリンである CCNB3 が融合していることから、CCNB3 が本来発現しない間葉系細胞で発現することが腫瘍発生に関わっているという可能性もあり、BCOR と CCNB3 の両者の機能が発がんに関わっている可能性もある。また、横紋筋肉腫、網膜芽腫、髄芽腫、骨髄性白血病等、小児がんや血液系腫瘍で BCOR 遺伝子の異常が、報告されているが、ナンセンス変異が多く、また、多くはおそらく付加的な異常と考えられている。

BCOR の機能は未だに不明な点が多いが、BCL6 との結合ドメインを有し、その複合体がヒストン修飾を介して遺伝子発現制御を行う事、異性型 PRC1 を構成することが報告されている。異性型 PRC1 の機能は、不明な点が多いが、H2A のユビキチン化を介して PRC1 や PRC2 によるヒストン修飾の上流で機能するとも考えられている。一方で、BCOR の遺伝子重複、変異や融合遺伝子の腫瘍発生における機能は、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、BCOR 変異を有する腎明細胞肉腫(CCSK)、BCOR-CCNB3 融合遺伝子を有する肉腫における異常な BCOR の解析を行うことによって、これらの腫瘍の発生機構解析を行うとともに、BCOR の機能ならびに腫瘍発生への関与を明らかにすることを目的とした。特に BCOR は BCL6 あるいは PCGF1 との結合を介してクロマチン修飾に関わると考えられており、上記遺伝子異常もクロマチン修飾を介して腫瘍発生に関わっていると想定している。成人がんでは、一つの腫瘍内において極めて多数の遺伝子異常が存在するが、ドライバー変異はその一部に過ぎないと思われる。一方で、CCSK を含む小児に好発する腫瘍は、全ゲノムシークエンスやエクソーム解析を行っても遺伝子異常がわずかしか見いだされない腫瘍も多く、単一あるいは少数の遺伝子の異常によって発がんに至ると考えられる。そのため遺伝子異常による腫瘍発生機構解析がより容易であることが期待される。

3. 研究の方法

HEK293 細胞に野生型 BCOR、BCOR 遺伝子内重複、BCOR ナンセンス変異、BCOR-CCNB3 融合遺伝子を CMV プロモーター下に発現するプラスミド・ベクターを Lipofectamine 等を用いて一過性に導入し、形質転換能を Colony formation assay、focus formation assay 等で解析した。また、細胞増殖能を WST assay にて検討した。また、NIH3T3 細胞にも同様に、野生型 BCOR、BCOR 遺伝子内重複、BCOR ナンセンス変異、BCOR-CCNB3 融合遺伝子を遺伝子導入し、形質転換能を Colony formation assay にて解析した。A673(Ewing 肉腫細胞)細胞に野生型 BCOR、BCOR 遺伝子内重複、BCOR ナンセンス変異、BCOR-CCNB3 融合遺伝子を同様に遺伝子導入した。

上記、遺伝子導入細胞より、total RNA を抽出し、逆転写酵素にて cDNA を合成し、Realtime PCR 法(TaKaRa, DICE)にて、BCOR、CCND1、NGFR、GLI1 の発現量を解析し、GAPDH、 β -actin 等により発現量を補正した。

HEK293 細胞に野生型 BCOR、BCOR 遺伝子内重複、MOCK を導入した安定細胞株の RNA を用い、SurePrint G3 Human GE 8x60K (Agilent)により網羅的に遺伝子発現解析を実施し、GeneSpring (Agilent)を用いて野生型 BCOR および BCOR 遺伝子内重複により発現の変化する遺伝子について検討した。

4 . 研究成果

HEK293 細胞に野生型 BCOR、BCOR 遺伝子内重複、BCOR 変異、BCOR-CCNB3 融合遺伝子の発現ベクターを遺伝子導入し、形質転換能を Colony formation assay、focus formation assay 等で解析し、細胞増殖能を WST assay にて検討したところ、BCOR 変異及び BCOR-CCNB3 融合遺伝子の一過性導入細胞では明らかな Colony formation 能が確認されず、細胞増殖能が低下していた。導入した野生型および変異型の BCOR の高発現は確認されたものの、CCSK で特徴的に高発現である遺伝子である CCND1、NGFR、GLI1 は、野生型 BCOR あるいは BCOR 変異体高発現細胞では有意な変化が認められなかった。

NIH3T3 細胞に、野生型 BCOR、BCOR 遺伝子内重複、BCOR 変異、BCOR-CCNB3 融合遺伝子を遺伝子導入し、形質転換能を colony formation assay にて解析したが、いずれの遺伝子においても colony formation の明らかな促進はみられなかった。また、導入した野生型および変異型の BCOR の高発現は確認されたものの、内在性の CCND1、NGFR、GLI1 発現量に有意な変化が認められなかった。更に、A673(Ewing 肉腫)細胞に野生型 BCOR、BCOR 遺伝子内重複、BCOR 変異、BCOR-CCNB3 融合遺伝子を遺伝子導入し、CCND1、NGFR、GLI1 の発現解析を実施したが、有意な遺伝子発現変化は認められなかった。

HEK293 細胞に野生型 BCOR、BCOR 遺伝子内重複、MOCK を導入した安定発現細胞に対して、マイクロアレイ解析を行って発現解析を行った。BCOR 遺伝子内重複にて発現が 2 倍以上上昇するプローブ 999 個、野生型 BCOR にて発現が 2 倍以上上昇するプローブ 1940 個のうち、両者に共通するものは、433 個であった。BCOR 遺伝子内重複にて発現が 1/2 未満に減少するプローブ 1766 個、野生型 BCOR にて発現が 1/2 未満に減少するプローブ 2011 個のうち、共通して発現が 1/2 未満に低下するプローブ 1014 個が同定された。一方で、BCOR 遺伝子内重複で特異的に発現が上昇するプローブは 666 個、低下するプローブは 752 個であり、後者には細胞膜に関連する遺伝子が多く含まれていた。BCOR 遺伝子内重複は野生型 BCOR とは異なる遺伝子の発現を制御する可能性が示唆された。特に、BCOR 遺伝子内重複で特徴的に発現が低下するプローブにはヒストンのマイナーなバリエーションが 2 個含まれており、それらの腫瘍発生における意義を検討中である。一方で CCND1、NGFR、GLI1 の発現量には有意な変化はみられず、これらの解析には、正常の BCOR の影響を排除するなど、さらなる検討が必要と考えられた。

BCOR 遺伝子内重複、BCOR-CCNB3 を単に過剰発現させるのみでは、細胞株に強力な腫瘍発生効果はなく、腫瘍発生を再現するためには、転写関連因子発現を含む細胞内環境の影響や、正常 BCOR が変異 BCOR の機能を阻害する等の可能性も考慮すべきと考えられ、細胞株や動物モデルにおいてゲノム編集などの手法を用いたより精緻な手法も必要と考えられた。一方で、これらの過剰発現により遺伝子発現プロファイルに変化があり、変異 BCOR による遺伝子発現への影響がみられた。最近では、BCOR の欠失や変異が、動物実験レベルでリンパ腫・白血病・骨髄異形成症候群などの血液系悪性腫瘍を発生させるという結果が報告されつつあり、BCOR 遺伝子内重複や BCOR-CCNB3 融合遺伝子についても同様のアプローチによる解析を考慮している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Haruta M, Arai Y, Okita H, Tanaka Y, Takimoto T, Sugino RP, Yamada Y, Kamijo T, Oue T, Fukuzawa M, Koshinaga T, Kaneko Y. Combined Genetic and Chromosomal Characterization of Wilms Tumors Identifies Chromosome 12 Gain as a Potential New Marker Predicting a Favorable Outcome. *Neoplasia*. 査読有, 2019;21(1):117-131. doi: 10.1016/j.neo.2018.10.007.

〔学会発表〕(計 4 件)

Ueno-Yokohata H, Okita H, Nakasato K, Hishiki T, Tsujimoto S, Shirai R, Osumi T, Yoshimura S, Yamada Y, Shioda Y, Kiyotani C, Terashima K, Miyazaki O, Matsumoto K, Kiyokawa N, Takako Yoshioka and Motohiro Kato. Identification of BCOR internal tandem duplication in circulating tumor DNA from children with renal tumors. *International Society of Paediatric Oncology*. 2018 年

大喜多 肇 . 小児横紋筋肉腫の分子病理 . 第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会 . 2018 年

春田 雅之, 新井 康仁, 大喜多 肇, 上條 岳彦, 野崎 美和子, 大植 孝治, 福澤 正洋, 越永 従道 . 腎芽腫において予後と相関する遺伝子・染色体異常(Genetic and chromosomal characterization defines favorable or unfavorable outcomes in Wilms tumor patients) . 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年

Ueno H, Okita H, Kiyokawa N. 小児腎腫瘍におけるポリコム複合体構成因子の発現解析 . *Gene expression analysis of polycomb repressive complex in pediatric renal tumors*.

第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会，2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：清河 信敬

ローマ字氏名：KIYOKAWA, Nobutaka

所属研究機関名：国立成育医療研究センター

部局名：小児血液・腫瘍研究部

職名：部長

研究者番号(8桁)：60195401

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。