

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430106

研究課題名(和文) ヒト悪性腫瘍におけるRACがん遺伝子の発がん機構の解明

研究課題名(英文) Oncogenic mutations of RAC small GTPases in human cancers

研究代表者

河津 正人 (Kawazu, Masahito)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任講師

研究者番号：20401078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳がんにおいて変異型低分子量GTP結合タンパク質(small GTPase)が見出された。これらのタンパク質を発現させた3T3細胞はnude mouseに腫瘍を形成した。クローン解析により、TP53変異やBRCA1不活性化が発がんの初期に生じる一方で、small GTPase変異は腫瘍の進展に伴い獲得されることが示唆された。したがって、small GTPase変異は、有望な治療標的であると考えられる一方で、変異を持たない腫瘍クローンによる耐性獲得の可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified mutations in small GTPases in the genomes of triple negative breast cancers (TNBCs). These proteins were found to be oncogenic in a nude mice tumorigenic assay. The clonal analysis suggested that TP53 mutations and silencing of BRCA1 were earlier events during TNBC carcinogenesis, while mutations in small GTPases were considered to develop at later stage of tumor progression. Taken together, while, given its potent oncogenic capacity, mutations in GTPases is a potential therapeutic target, resistance may be acquired as a result of expansion of tumor clones without such mutations.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん遺伝子 乳がん 低分子量GTP結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

がんに対する分子標的療法の有効性は、BCR-ABL 陽性白血病に対するイマチニブ、HER2 陽性乳癌に対するトラスツズマブなどが、これらの疾患の予後を劇的に改善したことにより明らかである。しかし、明確な治療標的が判明しているがんは限られており、様々ながんにおける標的分子、すなわち本質的ながんの原因遺伝子の同定と、その詳細な分子メカニズムの解明が必要とされている。

これまで困難とされていた低分子量 GTP 結合蛋白質に対する阻害剤の開発が再び注目を浴びており RAC がん遺伝子に関しても、有望な治療標的として今後の研究の発展が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では申請者らが発見した新規がん遺伝子である RAC 蛋白質の活性化型変異について、RAC 変異を伴うがんの分子標的療法開発のための基礎的知見を得ることを目的とする。

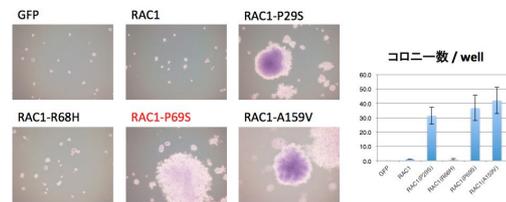
3. 研究の方法

当研究室で行ったトリプルネガティブ (エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体陰性、HER2 陰性) 乳がん 36 例の全エクソンシーケンスのデータ、TCGA の 110 例のトリプルネガティブ乳がんの全エクソンシーケンスデータなどの解析を行い、低分子量 GTP 結合タンパク質の活性化型変異の検出を試みた。

4. 研究成果

代表的ながん遺伝子である RAS (KRAS, HRAS, NRAS) 以外の低分子量 GTP 結合蛋白質の発がんにおける役割は長年明らかにされていなかった。しかし、ここ数年で RAC に加えて、他の低分子量 GTP 結合蛋白質の変異も報告されつつある。例えば RAS ファミリーの RIT1 の活性化型変異が肺腺癌の約 2%に見られる。またアクチン繊維の制御にかかわる RHOA の変異がスキルス胃癌と末梢性 T 細胞リンパ腫で高頻度 (10%-70%)に見られる。そこで、本研究課題において RAC1 以外の低分子量 GTP 結合タンパク質の変異についても検索、解析を行った。

その結果、トリプルネガティブ乳がんにおいて RIT1 (T83R)、RRAS2 (Q72L)、RAC1 (P69S)、RHOB (D13Y)変異型低分子量 GTP 結合タンパク質が見出された。いずれも 3T3 細胞をがん化させる活性があり、これらのタンパク質を発現させた 3T3 細胞はフォーカスフォーメーションアッセイにより接触阻害の喪失を示し、ソフトアガーアッセイにより足場非依存的に増殖し、さらにヌードマウスの皮下に腫瘍を形成した (図 1-4)。



RAC1 (P69S)はTCGAの乳がん、ER、HER2 statusは不明確な症例。
RAC1 (R68H)はTCGAの大腸がん。
RAC1 (A159V)はTCGAの肺腺癌、頭頸部がんなど複数症例。

図 1、RAC1 変異体を発現した 3T3 細胞のソフトアガーアッセイ

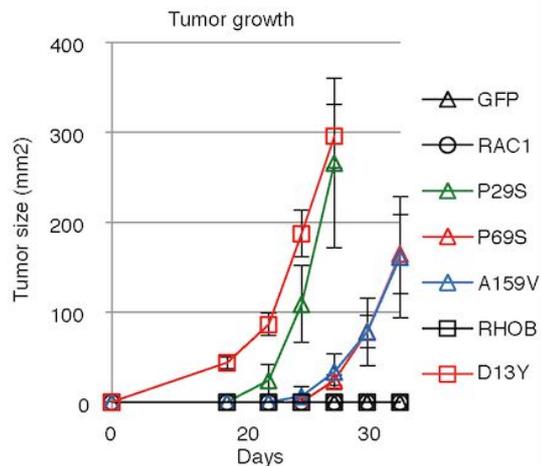


図 2、RHOB および RAC1 変異体を発現した 3T3 細胞を用いたヌードマウスでの腫瘍形成実験

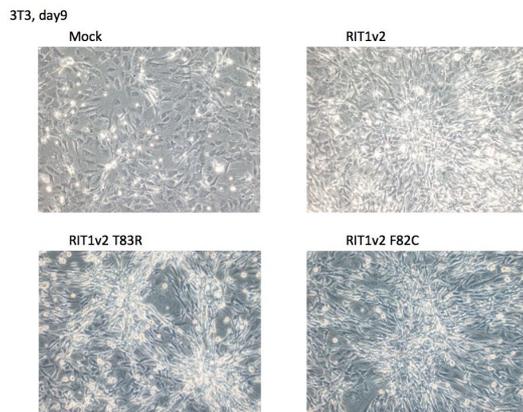


図 3、RIT1 変異体発現 3T3 細胞のフォーカスフォーメーションアッセイ

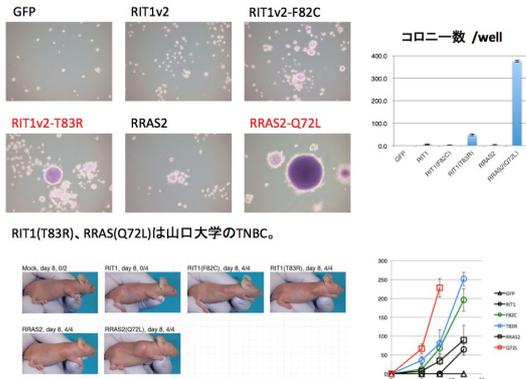


図4、RIT1 変異体のおよび RRAS2 変異体のソフトアガーアッセイとヌードマウスでの腫瘍形成実験

低分子量 GTP 結合タンパク質が腫瘍形成において果たす役割を評価するために、変異を有する腫瘍細胞のクローン解析を行ったところ、これらの変異は必ずしも発がん当初からあるものではないことが示唆された。一方で TP53 の変異や BRCA1 の不活性化は発がんの初期に生じている可能性が示唆された(図5、6)。

したがって、低分子量 GTP 結合タンパク質の変異は、その発がん活性の強さからは、有望な治療標的であると考えられるが、一方で、変異を持たない腫瘍クローンによる耐性獲得の可能性があり、今後のさらなる研究が必要であると考えられた。

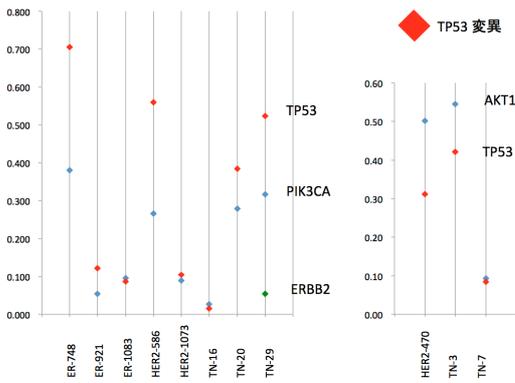


図5、乳がん検体の腫瘍細胞クローン解析。TP53 変異、PIK3CA 変異等を有する腫瘍細胞のサンプル中の割合を示す。

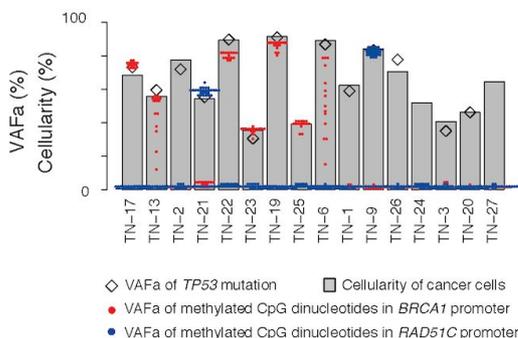


図6、乳がん検体の腫瘍細胞クローン解析。TP53 変異(ダイヤ型) BRCA1(赤点)または RAD51C (青点)メチル化を有する腫瘍細胞のサンプル中の割合を、示す。グレーの棒グラフはサンプル中の全腫瘍細胞の割合を示す。

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6件)

1. Yamato A, Soda M, Ueno T, Kojima S, Sonehara K, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Nagase T, Mano H. Oncogenic activity of BIRC2 a doi: 10.1111/cas.12726nd BIRC3 mutants independent of nuclear factor-κB-activating potential. *Cancer Science*, 106, 1137-42, 2015.
2. Yamaguchi H, Kawazu M, Yasuda T, Soda M, Ueno T, Kojima S, Yashiro M, Yoshino I, Ishikawa Y, Sai E, Mano H. Transforming somatic mutations of mammalian target of rapamycin kinase in human cancer. *Cancer Science*, 106, 1687-92, 2015. doi: 10.1111/cas.12828.
3. Fukumura K, Kawazu M, Kojima S, Ueno T, Sai E, Soda M, Ueda H, Yasuda T, Yamaguchi H, Lee J, Shishido-Hara Y, Sasaki A, Shirahata M, Mishima K, Ichimura K, Mukasa A, Narita Y, Saito N, Aburatani H, Nishikawa R, Nagane M, Mano H. Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathologica*, 131, 865-75, 2016. doi: 10.1007/s00401-016-1536-2.
4. Ando M, Kawazu M, Ueno T, Koinuma D, Ando K, Koya J, Kataoka K, Yasuda T, Yamaguchi H, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Sai E, Yamashita Y, Asakage T, Miyazaki Y, Kurokawa M, Miyazono K, Nimer SD, Yamasoba T, Mano H. Mutational landscape and antiproliferative functions of ELF transcription factors in human cancer. *Cancer Research*, 76, 1814-24, 2016. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3816.
5. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, Imoto

N, Kohsaka S, Kunita A, Doi K, Sakura T, Yujiri T, Kondo E, Fujimaki K, Ueda Y, Aoyama Y, Ohtake S, Takita J, Sai E, Taniwaki M, Kurokawa M, Morishita S, Fukayama M, Kiyoi H, Miyazaki Y, Naoe T, Mano H. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. Nature Genetics, 48, 569-74, 2016. doi: 10.1038/ng.3535.

6. 河津正人、急性骨髄性白血病における最近のゲノム研究の進展、「日本臨床」(日本臨床社) 74 (増刊号 10), 441-445, 2016.

〔学会発表〕(計7件)

1. ヒト悪性腫瘍における低分子量 GTP 結合蛋白質 RAC の活性化型変異(口演) 河津正人、平成 25 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」 公開シンポジウム、2014 年 1 月
2. 同種造血幹細胞移植後ドナー由来白血病の発症機構(ポスター) 安田貴彦、上野敏秀、河津正人、崔永琳、村田誠、清井仁、直江知樹、間野博行、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月
3. ヒトがんにおける mTOR の体細胞変異が形質転換を起こす(ポスター) 山口博之、河津正人、曾田学、上野敏秀、小島進也、八代正和、吉野一郎、石川雄一、崔永林、河野茂、間野博行、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月
4. 家族性骨髄異形成症候群とその原因候補遺伝子(口演) 高岡賢輔、河津正人、吉見昭秀、遠矢嵩、小林隆、南谷泰仁、上野博則、原田浩徳、林泰秀、間野博行、黒川峰夫、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月
5. ヒストン脱メチル化酵素、KDM4B/JMJD2B、のがん化過程での役割(口演) 岡田斉、河津正人、Kit, Tong, 佐相薫葉子、太田一成、古室暁義、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月
6. ヒストン脱メチル化酵素による乳腺発達の制御(口演) 岡田斉、佐相薫葉子、河津正人、古室暁義、太田一成、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月
7. AYA 世代急性リンパ性白血病における網羅的融合遺伝子解析(口演) 安田貴彦、都築忍、河津正人、早川文彦、小島進也、上野敏秀、清井仁、直江知樹、間野博行、第 75 回日本癌学会学術総会、

2016 年 10 月、横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Compositions Comprising RAC Mutants, and Methods of Use Thereof
発明者: 河津正人、上野敏秀、竹内賢吾、三木義男、間野博行
権利者: 東京大学、自治医科大学、公益財団法人がん研究会
種類:
番号: 米国出願番号: 61/676,117
出願年月日: 2012.7.26
国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
河津 正人(KAWAZU, Masahito)
東京大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号: 20401078

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()