

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19406

研究課題名(和文) NUT midline carcinomaにおける新たな治療戦略の開発

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic targets in NUT midline carcinoma

研究代表者

奥村 俊介 (Okumura, Shunsuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10516339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治の悪性腫瘍であるNUT midline carcinoma (NMC) において新たな治療標的を探索する研究を行った。次世代シーケンサー(NGS)を用いてNMCの遺伝子異常を網羅的に解析し、薬剤パネルを用いて薬剤の有効性をスクリーニングした。さらに、NMCにおけるSmall RNAのプロファイルをNGSにて解析した。その結果、治療への応用に結びつくような特定の遺伝子異常と、治療標的となりうるmicroRNAを見つけることに成功した。また、NMCの診断法を確立するため、digital PCR法を用いたNMCの新たな診断法を開発し、微量な臨床検体からNMC症例を同定することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：To identify novel therapeutic targets in NUT midline carcinoma (NMC), we examined the gene mutations and comprehensive drug sensitivity screening of NMC, using next generation sequencing and drug panels. We then identified the gene mutation as potential therapeutic target and micro RNA related to cell growth in NMC. We used digital PCR (dPCR) and designed optimal dPCR probes to detect BRD-NUT fusion genes in clinical tumor samples. Consequently, we succeeded in diagnosis of NMC using the dPCR system.

研究分野：Medical Oncology

キーワード：NUT midline carcinoma

1. 研究開始当初の背景

我が国では、悪性腫瘍が死因の第1位を占めている。近年、がん組織から検出される遺伝子異常の種類別に、分子標的治療薬を中心とした個別化治療が進められている。一方、特定の遺伝子異常を有する悪性腫瘍のうち、未だに有効な治療法が確立されていないものが存在する。なかでも、NUT midline carcinoma (NMC)は比較的新しい概念の悪性腫瘍であり、縦隔や体幹の中心部に発生する特徴を持ち、NUTM1 遺伝子の異常(異常転座融合遺伝子)を持つ癌として知られている¹⁾。NMCの病理組織像は多彩であり、病理学的所見のみではNMCの診断は不可能とされ、その診断法は確立されていない。NMCの報告数は徐々に増えつつあるが、診断法が確立されていないために進行癌として発見されるケースが多く、正確な疫学については未だに把握されていない。また、NMCに関する研究報告も少なく、その病態が他の癌種と比較して十分に解明されていない。このため、有効な治療法が確立されておらず、その平均生存期間は7ヶ月程度と予後不良な現状である²⁾。

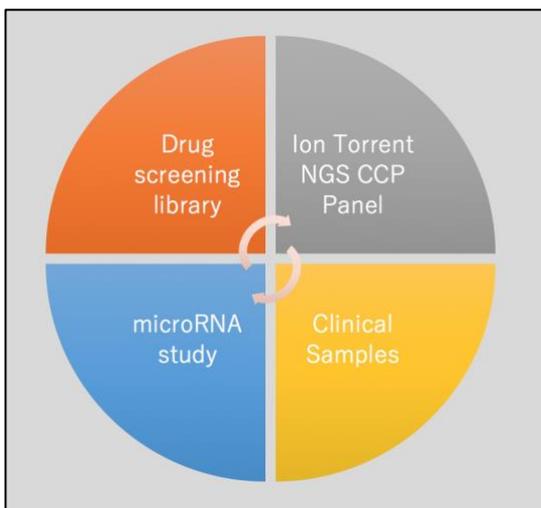
2. 研究の目的

NMCにおける新たな治療標的を見つける。NMCの診断法を確立させる。

3. 研究の方法

本研究では次の4つの主要な研究計画(図1)を設けた。これら研究で得られた結果を統合し、治療標的や診断法、バイオマーカーの候補を検証した。

図1. 主要な研究計画



以下にそれぞれの方法を示す。

(1) 抗がん剤パネルを用いた薬剤感受性のスクリーニング

我々は、希少な2つのNMC細胞株(HCC2429細胞/Texas University, Ty82細胞/RIKEN, いずれもBRD4-NUT融合遺伝子を

持つ)を保有しており、本研究ではこれら細胞株を用いた。薬剤感受性のスクリーニングを行うため、Drug screening library (化学療法基盤支援活動)を用いて、分子標的治療薬を主体とした約400の薬剤に対する感受性を評価した。感受性の評価にはMTS assayを使用した。各分子標的治療薬に対する感受性の結果をもとに、パスウェイ解析を加えて、細胞増殖に関与する細胞内シグナル伝達経路を評価した。我々はこのスクリーニング評価及びパスウェイ解析を終え、主要なシグナル経路を特定した。これら同定された経路が、以降に示す研究計画2~4で得られた結果とどのようにリンクするか、解析を進めた。

NMCに対するBET阻害剤による効果は限定的であるため、BET阻害剤の耐性株を作成して、耐性機序や耐性後に有効な治療薬を評価した。我々はBET阻害剤であるJQ-1に耐性の細胞株を作成した。この耐性株を用いて、同様に薬剤スクリーニング・パスウェイ解析を行い、耐性前の親株と比較することで耐性機序ならびに耐性後の治療標的を探索した。また、耐性株での獲得遺伝子変異を検索するため、後述の次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析も加えた。

(2) 次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析

次世代シーケンサーを用いてNMCが持つ遺伝子変異を解析した。次世代シーケンサーにはIon Torrent(Thermo Fischer)を用いた。解析パネルとしてIon AmpliSeq Comprehensive Cancer Panelを、解析ソフトにはIon ReporterやCLC Genomics Workbench (CLC bio Japan)を用い、主要な遺伝子変異を検索した。我々はこの解析により、NMCの表現型に関わることが予想される候補遺伝子と、その遺伝子異常を新たに見出した。その変異遺伝子の機能を解析するため、遺伝子導入実験を行った。まず、野生型及び変異型の候補遺伝子をNMC細胞株やコントロール細胞株に導入するべく、プラスミドベクターを作成した。発現プラスミドベクターにはpF12K RM Flexi Vector (Promega)を用い、Coumermycinによる候補遺伝子発現誘導株を作成した。

(3) Small RNA プロファイリング解析と機能解析

Small RNAの解析を行った。NMC細胞株よりsmall RNA分画を抽出し(PureLink miRNA isolation kit, Thermo Fisher)、Ion TorrentにてRNAシーケンシングを行った。CLC Genomics Workbench (CLC Bio)を用いてSmall RNAのプロファイリング解析を行った。

Small RNAプロファイルの変化を調べるため、NUTM1遺伝子のknockdown実験を行っ

た。Stealth RNAi siRNA (ThermoFisher)による Knockdown を行い、HCC2429 細胞、Ty82 細胞へ、Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher)を用いて導入実験を行った。コントロールと、siRNA 治療後の細胞の Small RNA のプロファイルを比較した。

(4) 臨床検体における NMC の解析

NMC の診断法を確立すべく、臨床検体の解析を行った。胸部悪性腫瘍と診断された症例の病理組織検体から RNA を抽出し、Digital PCR(QuantStudio 3D, Thermo Fischer)を用いて NMC の新たな診断法を確立させた。はじめに、BRD-NUT 融合遺伝子を検出できるような digital PCR 用のプローブを設計した。コントロールの合成 DNA にて、そのプローブが work することを確認し、次に陽性コントロールである HCC2429 細胞と Ty82 細胞、陰性コントロールである肺がん A549 細胞を用いて、NMC の診断に必要な NUTM1 融合遺伝子の検出を評価した。

さらに、縦隔腫瘍の臨床検体を用いて digital PCR による NMC の診断法を評価した。臨床検体の FFPE 組織検体より、RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (ThermoFisher)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から、SuperScript VILO cDNA synthesis kit (ThermoFisher)を用いて、cDNA フラグメントを合成した。合成された cDNA を用いて、前述の digital PCR 法を用いて NUTM1 融合遺伝子の検索を行った。縦隔腫瘍 30 検体につき、解析を行った。さらに、digital PCR 法による NUTM1 遺伝子の発現が確認された検体については、次世代シーケンサー(Hi-seq, illumina)による RNA シーケンスによる解析を追加し、合併する遺伝子異常を検索した。解析には CLC Genomics Workbench (CLC bio)を用いた。

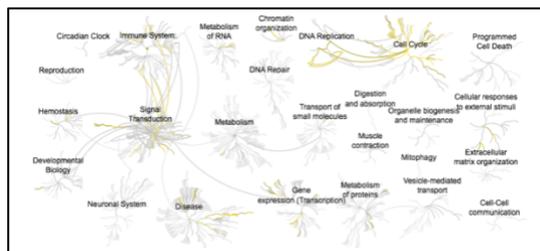
4. 研究成果

(1) 薬剤スクリーニング

2 つの NMC 細胞株(HCC2429 細胞/Texas University, Ty82 細胞/RIKEN)に関して、薬剤感受性のスクリーニングを行い、パスウェイ解析の結果、NMC の細胞増殖に関する主要なシグナル経路を特定した(図 2)。

また、我々は BET 阻害剤である JQ-1 に耐性の細胞株を作成することにも成功した。

図 2. パスウェイ解析



(2) 次世代シーケンサーによる遺伝子変異の解析

NMC 細胞における遺伝子変異を特定するため、次世代シーケンサーによる解析が必要であるが、2 つの希少株それぞれでの解析を終えた。そして、我々はこの解析により、NMC の表現型に関わることが予想される候補遺伝子と、その遺伝子異常を新たに見出した。その遺伝子異常の機能を解析すべく、野生型及び変異型の候補遺伝子をヒト正常細胞及び NMC 細胞株へ遺伝子導入する必要があり、我々は pF12K RM Flexi Vector (Promega) による野生型及び変異型候補遺伝子の発現プラスミドベクターの作成に成功した。

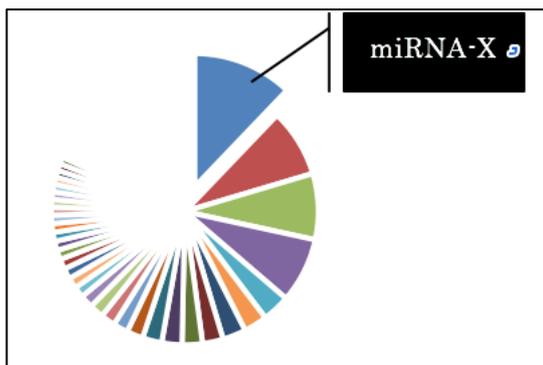
前述の細胞増殖アッセイを用い、野生型もしくは変異型の候補遺伝子が導入された NMC 細胞株の薬剤感受性を評価する計画を設けるに至った。また、これら遺伝子発現時の細胞増殖能や細胞内シグナル変化を、細胞増殖アッセイや Western blot を用いて解析する課題も設けた。さらに後述の MicroRNA (miRNA) のプロファイリング解析も加えて、候補遺伝子が及ぼす miRNA 発現パターンの変化も評価する予定となった。

(3) Small RNA の解析

Small RNA の解析には、次世代シーケンサーを用いた miRNA のプロファイリングの解析が必要であったため、我々はこの解析するシステムを構築し、NMC における Small RNA のプロファイリングを同定した。さらに NUTM1 遺伝子の発現調節実験を通じて、NMC の細胞増殖に関与する microRNA を見出すことに成功した(図 3)。また、同様の解析により、BET 阻害剤が関与しうる Small RNA も特定することができた。

我々はこれら Small RNA が治療ターゲットとして重要な候補であると予測し、今後、細胞内シグナル経路と候補 miRNA との関係性を評価していく計画を設けた。

図 3. Small RNA 発現解析の結果

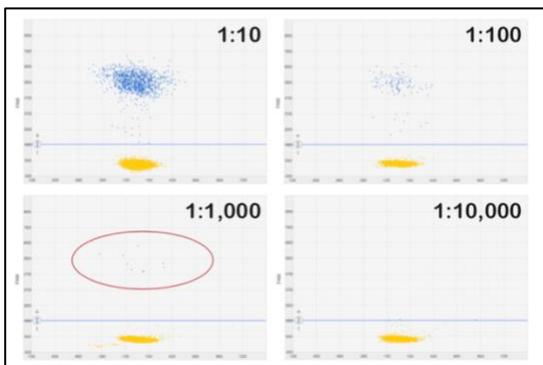


(4) 臨床検体における NMC 症例の解析

NMC 細胞株を用いた実験により、我々は、Digital PCR 法による高感度・効率のよい NMC 診断法の構築に成功した (図 4)。

臨床検体 30 検体を解析した結果、NMC の症例を同定することにも成功した。さらに、次世代シーケンサーによる、遺伝子変異の解析により、NMC 細胞株を用いた In vitro 実験にて検出された遺伝子異常が、同定された NMC 症例でも検出された。

図 4. Digital PCR による NUTM1 融合遺伝子の検索



(5) 各々の研究結果の統合

次世代シーケンサーによる NMC 細胞株の遺伝子異常の解析により、ある遺伝子の異常を合併していることを見出したが、その遺伝子の異常が、臨床検体でも同定されたため、再現性のある遺伝子異常 (Recurrent mutation) であることが判明した。

さらに薬剤スクリーニングやパスウェイ解析の結果、有効性を示した薬剤および NMC 細胞における主要な増殖シグナル経路が、同定された遺伝子異常にも関連している可能性があることを見出した。

<引用文献>

1. French CA, et al. Midline carcinoma of children and young adults with NUT rearrangement. JCO.2004;22:4135-9.
2. French CA, et al. Pathogenesis of NUT midline carcinoma. Annu Rev Pathol.2012;7:247-65.

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Shunsuke Okumura, et al. Digital PCR in genetic diagnosis of NUT midline carcinoma. AACR. 2018. Chicago, USA.
2. Shunsuke Okumura, et al. Prevalence, genetic features, and anti-cancer drug sensitivity of NUT midline carcinoma. JSMO. 2018. Tokyo, Japan.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.asahikawa-](http://www.asahikawa-med.ac.jp/hospital/respi/zyohokoukai_NMC.html)

[med.ac.jp/hospital/respi/zyohokoukai_NMC.html](http://www.asahikawa-med.ac.jp/hospital/respi/zyohokoukai_NMC.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥村 俊介 (OKUMURA, Shunsuke)

旭川医科大学病院・医学部・助教

研究者番号：10516339

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし