

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21470

研究課題名(和文) 胃癌形成に関わる遺伝子の同定と機能評価

研究課題名(英文) Identification and validation of gastric cancer genes

研究代表者

武田 はるな (Takeda, Haruna)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：80647975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SBトランスポゾン挿入変異誘発法を用いた網羅的なスクリーニングをマウス生体内で行い、1026個の胃癌ドライバー候補遺伝子を同定した。パスウェイ解析を行い、Wnt経路、TGF-beta経路など、ヒトの胃癌でも高頻度に変異が認められるシグナリング経路に挿入変異が観察されることを明らかにした。次に、TCGAやCOSMICなどの公共のデータベースを用い、ヒトの胃癌で変異のある遺伝子との比較を行った。比較の結果、ヒトとマウスで共通して変異のある遺伝子合計258個を抽出することができた。これらは、胃癌においてドライバー遺伝子として機能する可能性が非常に高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified 1026 gastric candidate driver genes by genome-wide SB transposon mutagenesis screening in mice. Genes in Wnt signaling and TGF-beta signaling were frequently mutated, showing that SB-induced gastric tumors model human gastric cancers. Comparative analysis for candidate gastric cancer genes between human and mice enriched 258 genes. These genes are very likely to be potent candidate cancer genes in the stomach. Our result will help developing new therapeutic targets to cure gastric cancers.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん マウスモデル 消化管 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

2013年の日本における胃がん死亡数は48,000人であり、がんにおける死亡率第二位となっている。胃がんゲノム解読の研究により、がん組織において変異の認められる遺伝子が数多く報告されている。しかしながら、腫瘍間で比較した場合に高頻度に変異が認められるドライバー遺伝子はTP53やARID1Aなど数少なく、残りの大部分の遺伝子は、低頻度しか変異が入らない遺伝子であることが報告されている(TCGA Nature 513: 202-209 (2014))。これら、低頻度しか変異が入らない遺伝子の中には、がん形成に寄与するドライバー遺伝子と、がん形成に寄与していないパッセンジャー遺伝子が含まれているが、ドライバー遺伝子とパッセンジャー遺伝子とを区別することは、未だ技術的に困難である。しかしながら、がん形成に真に寄与する遺伝子の全体像を明らかにしていくことは、がんに対する理解を深め、新たな創薬の標的を見つける上で重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)胃がん組織において低頻度に変異の認められる遺伝子の中から、ドライバー遺伝子を抽出すること、(2)胃がん形成に関与すると考えられる候補遺伝子について、がん化能を検証する実験系を確立し、候補遺伝子のがん化能を検証することである。

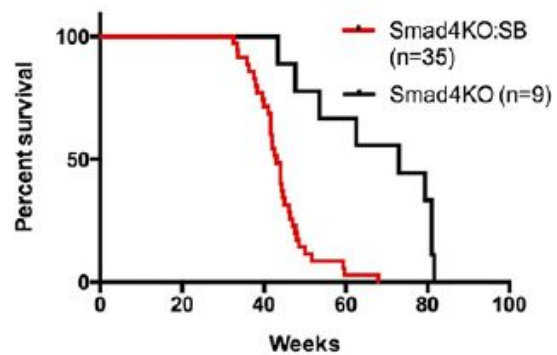
3. 研究の方法

(1) Sleeping Beauty (SB) トランスポゾン挿入変異誘発法(Dupuy *et al.*, Nature 69: 8150-8156 (2005))を用い、がん形成に関与する遺伝子の網羅的なスクリーニングをマウス生体内で行う。その後、比較ゲノム学の手法を用い、マウスで同定された候補遺伝子リストをヒトの胃がんで変異が認められる遺伝子のデータベースと比較し、共通して変異の入る遺伝子を抽出する。(2) これら候補遺伝子のがん化能における機能評価を、特にがん抑制遺伝子に着目して行う。具体的には、CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子をノックアウトし、増殖能に与える影響などの観点から、がん化における機能評価を実験系を確立する。

4. 研究成果

(1) SB トランスポゾンを用いた網羅的な挿入変異をマウス生体内で誘発するために、SB トランスポゼースを恒常的に発現するノックインマウス(Starr *et al.*, Science 323: 1747-1750 (2009))と、SB トランスポゾントランスジェニックマウス(Dupuy *et al.*, Cancer Res 69: 8150-8156 (2009))を用いて複合変異マウスを作成した。SB トランスポゾンノックインマウスはSB11のcDNA配列の上流にlox-STOP-lox配列をも

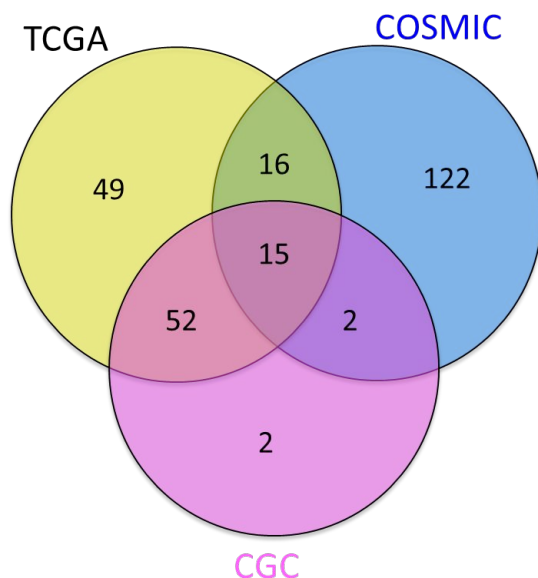
図1 マウスの生存曲線



つため、actin-Cre マウスを掛け合わせ、全身でSB挿入変異を誘発させた。さらに、胃での腫瘍形成を促進するために、Smad4ノックアウトマウスをさらに掛け合わせ、四種複合変異マウスを作成した。Smad4ノックアウトマウスは、生後一年で胃の腫瘍形成が始まり、一年半で死に至る(Takaku *et al.*, Cancer Res 59: 6113-6117 (1999))。このSmad4ノックアウトマウスにおいてSB挿入変異を誘発させると、胃に形成される腫瘍の数が2倍以上に増加し、マウスの寿命も平均43週齢と有為に短くなった(図1)。また、病理組織学解析により、形成された腫瘍は大部分が良性であり、ヒトの胃に形成される腺腫に似ていることが示された。次に、腫瘍形成に寄与する遺伝子を同定するために、腫瘍ゲノムの解析を以前の報告(March *et al.*, Nat Genet 43: 1202-1209 (2011))に従って行った。具体的には、まずゲノムを制限酵素で断片化し、両端にリンカーを付加する。次に、リンカー配列とトランスポゾン配列をそれぞれ認識するプライマーを用いてPCR増幅し、トランスポゾンが挿入されたゲノム部位のみを特異的に増やした。得られたPCR産物を次世代シーケンサーにて解読し、SBトランスポゾン挿入部位を決定した。これらをマウスゲノム上にマッピングし、統計学的手法を用いてトランスポゾンが高頻度に挿入されているゲノム部位を同定した。本研究で用いた統計法は、Gaussian kernel convolution (GKC)法(Uren *et al.*, Cell 133: 727-741 (2008))と呼ばれる方法と、Gene-centric CIS(gCIS)法(Brett *et al.*, PloS one 6: e24668)の2種類を用いた。GKC法は、遺伝子領域であるかどうかに関わらず、全ゲノム中を対象として計算を行っていく方法である。gCIS法は、ゲノム上の機能的な部位である遺伝子領域のみに着目し、計算を行っていく方法である。GKC法は、遺伝子領域以外の責任部位を決定できるという利点があり、gCIS法はGKC法に比べて、サイズの小さい遺伝子の同定に優れている。これら2つの統計学を組み合わせて用いることで、最終的に胃がんのドライバー候補遺伝子1026個を同定することができた。

まず、これら遺伝子に関してパスウェイ解析を行い、どのようなシグナリング経路や生物学的機能が脱制御を受けているかを解析したところ、Wnt 経路、TGF-beta 経路、EGF 経路などヒトの胃がんでも高頻度に変異が認められるシグナリング経路に、挿入変異が高頻度に観察された。さらに、ヒトの胃がんと同様、細胞間接着に関わる遺伝子やクロマチンリモデリングに關与する SNF/SWI 複合体の構成分子にも高頻度に挿入変異が認められることが明らかになり、ヒトの胃がんをよくモデルしていることが示された。次に、1026 個の候補遺伝子のうちヒトの相同遺伝子がある 941 個の遺伝子

図2 ヒトのデータベースとの比較



に関して、ヒトの胃がんに変異のある遺伝子のリストと比較を行った。比較には、大規模な胃がんゲノム解読の研究成果等が蓄積されている TCGA や COSMIC などの公共のデータベースを用いた。共通して変異のある遺伝子は合計 258 個抽出された(図 2)。SB スクリーニングにより同定された遺伝子の中には、胃がん形成に関わる既知の遺伝子が多数含まれていたが、胃がん形成への関与が報告されていない新規遺伝子も多数含まれていた。このうちの一つである *LRP1B* は、61%のヒトの胃がんにおいて高メチル化されており、mRNA の発現も低い (Lu *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer* 49:412-424 (2010))という報告があること、ヒトのがんにおいて高頻度に遺伝子欠損が観察される 10 の遺伝子の中に *LRP1B* 遺伝子が含まれている (Beroukhi *et al.*, *Nature* 463:899-905 (2010))という報告があることからがん抑制遺伝子であると考えられる。以上の解析結果により、胃がん形成に關与する多数の候補遺伝子を同定することができた。

(2)ヒトとマウスで共通して変異の入る候

補遺伝子のうち、がん抑制遺伝子と推察されるものを抽出し、がん化能検証実験を行った。検証実験には、胃がん細胞株である AGS 細胞株を用いた。候補遺伝子を標的とする gRNA と Cas9、GFP の発現カセットをもつプラスミドを細胞にトランスフェクションし、GFP 陽性細胞をソートすることでホモノックアウト細胞を樹立した。ノックアウトされたかの確認は、標的となるゲノム部位を増幅しシーケンスすることで確認した。さらにウエスタンブロッティングを行い、目的タンパク質の発現が消失していることも確認した。この細胞を用い、増殖能が亢進しているかを観察したところ、ノックアウトしていない細胞と比べて有為差はなかった。

がん細胞株を用いる実験系の問題点は、細胞内に既に数多くの遺伝子変異が蓄積しているため増殖能が高く、遺伝子の増殖に与える影響を信頼度高く検証できない点である。現在は、正常消化管上皮細胞のオルガノイド培養系を用いて、がん化能検証を行える実験系の確立を行っている。

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. Haruna Takeda, Alistair G. Rust, Jerrold M. Ward, Christopher Chin Kuan Yew, Nancy A. Jenkins, and Neal G. Copeland
Sleeping Beauty transposon mutagenesis identifies genes that cooperate with mutant *Smad4* in gastric cancer development PNAS、査読有、113 (14) :E2057-2065, 2016

2. 武田はるな

「トランスポゾン挿入変異を用いたがん形成に關与する遺伝子の同定」金沢医科大学雑誌、査読有、2015 年第 40 巻 第 2・3 合併号

[学会発表](計 5 件)

1. 武田はるな, ALBERTA-JAPAN Agency For Medical Research And Development (AMED) Workshop For Medical Innovation,「Sleeping Beauty transposon mutagenesis identifies

genes involved in colon cancer development」 2017年2月24-25日
カルガリー, カナダ・ハイアットホテル

2. 武田はるな, 第2回AMEDがん若手研究者ワークショップ「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾンによる大腸がん形成に關与する遺伝子の同定」 2016年11月29-30日 東京・晴海グランドホテル
3. 武田はるな, 第75回日本癌学会学術総会「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾンによる大腸がん形成に關与する遺伝子の同定」2016年10月6-8日 横浜・パシフィコ横浜
4. 武田はるな, Breakthroughs in cancer research: from biology to therapeutics 「Sleeping Beauty transposon mutagenesis identifies genes that cooperate with Smad4 loss in gastric cancer development」 2016年2月16-20日 ハワイ・ハイアットリージェンシーホテル
5. 武田はるな, 第74回日本癌学会学術総会「Transposon mutagenesis identifies genes and evolutionary forces driving gastrointestinal tract tumor progression」2015年10月8-10日 愛知県名古屋市・名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田はるな (TAKEDA, Haruna)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 80647975