

令和元年5月27日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10454

研究課題名(和文) 癌幹細胞に対する新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel strategies for cancer stem cells

研究代表者

角田 伸行 (TSUNODA, NOBUYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：40542684

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)：胆管癌細胞株より分離したc-Met陽性細胞はc-Met陰性細胞より増殖能が亢進していた。c-Met陽性かつCD49f陽性細胞ではviabilityの低下を認めた。大腸癌細胞株より分離したCD133陽性細胞は、CD133陰性細胞より増殖能が亢進していた。次世代シーケンサーによる融合遺伝子の探索により、938個の融合遺伝子の候補が同定された。p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2 pseudogeneであるLOC646214は、多くの遺伝子と融合遺伝子を形成していた。タンパクを合成していないこれらの融合遺伝子は核酸医薬のよい標的と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、次世代シーケンサーによる融合遺伝子の探索により、p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2 pseudogeneであるLOC646214が多くの遺伝子と融合遺伝子を形成していることを明らかにした。新たな融合遺伝子の候補の同定、核酸医薬による新規癌治療の可能性を明らかにしており、本研究成果の学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Proliferation was activated in c-Met-positive cholangiocarcinoma cells compared with that in c-Met-negative cholangiocarcinoma cells. Cell viability was suppressed in c-Met-positive and CD49f-positive cholangiocarcinoma cells. Cell growth was more highly activated in CD133-positive colorectal cancer cells than in CD133-negative colorectal cancer cells. Next-generation sequencing revealed 938 candidate fusion genes in cancer cells. LOC646214, which is a p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2 pseudogene, formed fusions with many genes. In addition, long intergenic/intervening noncoding RNA (LINC) formed fusions with many genes. Because these fusion genes do not synthesize proteins, antibody medicines were not effective against these genes. From this viewpoint, these fusion genes were thought to be the best targets for nucleic acid medicines.

研究分野：消化器外科学

キーワード：融合遺伝子 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は分化能と自己複製能を有する細胞である。乳癌ではCD44陽性、CD24陰性、lineage marker陰性、脳腫瘍ではCD133陽性の性質を持つ癌幹細胞が、それ以外の細胞と比較して効率に癌を作ることが報告されている。また癌幹細胞は癌の発生、進展機序、抗癌剤抵抗性にも関与すると報告されている。我々は科学研究費(基盤研究B)平成19~22年度「肝門部胆管癌からの胆管癌幹細胞の分離と網羅的遺伝子解析に基づく分子標的治療の開発」において癌幹細胞に関する研究を行ってきた。癌幹細胞についてはまだ多くのことがわかっていない。また、癌幹細胞を標的にした治療法もいまだ実用化されてない。

融合遺伝子は重要な発癌原因の1つと考えられている。慢性骨髄性白血病では、第9番染色体のABL遺伝子と第22番染色体のBCR遺伝子の相互転座によりBCR-ABL融合遺伝子が、悪性リンパ腫においてもALK遺伝子とNPM遺伝子からなるNPM-ALK(p80)融合遺伝子が同定されている。固形癌での融合遺伝子の存在が明らかになり、前立腺癌でのセリンプロテアーゼであるTMPRSS2と転写因子であるERGの転座によるTMPRSS2-ERG融合遺伝子が同定され、非小細胞肺癌(NSCLC)においてもEML4-ALK融合遺伝子の同定が報告されている。融合遺伝子は正常組織には存在せず、癌組織にのみ存在しており分子標的治療の標的因子として有用と考えられている。我々は胆管癌における融合遺伝子の探索により複数の融合遺伝子を同定している。癌幹細胞においても融合遺伝子の存在が示唆されているが、これまで報告されたものはない。

2. 研究の目的

本研究では癌幹細胞における融合遺伝子の探索を行い、同定した融合遺伝子の機能解析を行い、新たな治療法を開発を行う。最終目的として新規治療法の臨床応用による癌における治療成績を向上させることである。

3. 研究の方法

【癌幹細胞の分離と融合遺伝子の探索】

胆管癌細胞株 HuCCT1 7.25×10^6 個の細胞に対して FITC で標識した c-Met 抗体を 4℃ で 10min 反応させた後に、抗 FITC 磁気ビーズを接着させポジティブセレクション用 LS カラムを用いて c-Met 陽性細胞の分離を行った。また不要細胞のディプリーションが可能な LD カラムによる前処理を行った後、ポジティブセレクション用 LS カラムにて c-Met 陽性細胞の分離を行った。分離した c-Met 陽性細胞から CD49f 抗体に磁気ビーズを接着させポジティブセレクション用 LS カラムを用いて CD49f 陽性細胞の分離を行った。

大腸癌細胞株 DLD1 より CD133 抗体に磁気ビーズを接着させポジティブセレクション用 LS カラムを用いて CD133 陽性細胞の分離を行った。

c-Met 陽性細胞における c-Met タンパクの発現をウェスタンブロッティングにて検討した。

c-Met 陽性細胞と c-Met 陰性細胞に関して培養後 24、48 時間後の増殖能を MTT アッセイにて経時的に検討した。Muse™ Annexin V & Dead Cell kit を用いて viability を検討した。CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞に関して培養後 24、48 時間後の増殖能を MTT アッセイにて経時的に検討した。

【次世代シーケンサーによる融合遺伝子の探索】

名古屋大学医学部腫瘍外科にて切除術施行された胆管癌症例 3 例の凍結標本から RNA を抽出し

た。抽出した RNA 濃度および QCratio による DNA の断片化を検討した後、次世代シーケンサーによる融合遺伝子の探索を行った。

【異時性重複癌に対する次世代シーケンサーによる包括的遺伝子配列解析】

異時性胆管癌 2 例の切除標本よりパラフィン包埋サンプルを作成し、HE 染色にて癌組織のマーキング後に未染プレパラートよりレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションにて回収した癌組織の DNA 抽出を行った。抽出した DNA の DIN、断片化ライブラリーの評価を行った。癌のイニシエーション、プログレッション、薬剤感受性などとの関連が報告されている 421 遺伝子の変異を解析対象とする次世代シーケンサーによる解析を行った。同定した融合遺伝子候補の融合部の 5' 側と 3' 側のプライマーの設計を行った。

4. 研究成果

【癌幹細胞の分離と融合遺伝子の探索】

胆管癌細胞株 HuCCT1 7.25×10^6 個の細胞に対して FITC で標識した c-Met 抗体を 4 で 10min 反応させた後に、抗 FITC 磁気ビーズを接着させポジティブセレクション用 LS カラム (μ MACS アイソレーションキット)を用いて c-Met 陽性細胞の分離を行った。しかし分離ができず c-Met 抗体陽性細胞の数が不十分であった。そのため弱く標識された細胞を効率よく分離するために、不要細胞のディプリーションが可能な LD カラムによる前処理を行った後、ポジティブセレクション用 LS カラムにて分離を行った。その結果、 7.9×10^5 の c-Met 陽性細胞の回収が可能であった。カラムにより分離した c-Met 陽性細胞と陰性細胞の c-Met の発現をウェスタンブロッティングにて検討した。c-Met 陰性細胞と比較して c-Met 陽性細胞において c-Met の発現の亢進を認めた。c-Met 陽性細胞と c-Met 陰性細胞に関して MTT による増殖能の検討を行った。c-Met 陽性細胞において増殖能が亢進していた。

c-Met 陽性細胞から CD49 f 陽性細胞の分離を行った。細胞の分離は可能であったが viability が低下していた。

大腸癌細胞株 DLD1 より CD133 陽性細胞の分離を LS カラムにて行った。CD133 陽性細胞と CD133 陰性細胞に関して MTT による増殖能の検討を行った。CD133 陽性細胞において増殖能が亢進していた。

【次世代シーケンサーによる融合遺伝子の探索】

次世代シーケンサーによる融合遺伝子の探索により、938 個の融合遺伝子の候補が同定された。このうち Unique Spanning-Pairs が 100 以上のものが 10 個 (120-911)、Split-Reads が 100 以上のものが 17 個 (100-1317) であった。2 つの基準を満たす融合遺伝子候補を 3 つ認め、それぞれの Unique Spanning-Pair と Split-Reads が 302 と 1317、600 と 132、140 と 134 であった。Description として kinase に関連するものを 54 個認め、testis-specific kinase 2 や casein kinase 2, beta polypeptide が含まれていた。また p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2 pseudogene である LOC646214 は、多くの遺伝子と融合し複数の融合遺伝子を形成していた (表 1)。

表 1

Gene1	Strand1	Gene2	Strand2
LOC646214	-	TPO	+

LOC646214	-	CYP1B1-AS1	+
LOC646214	-	PHLDB2	+
LOC646214	-	LPXN	-
LOC646214	-	TMEM126B	+
LOC646214	-	LOC1019281 37	+
LOC646214	-	ZNF700	+
LOC646214	-	HPS4	-

LOC646214 のように gene name がなく、位置情報のみのものも多く見られ、他の遺伝子や LINC (long intergenic/intervening non-coding RNA) と融合遺伝子を形成していた。さらにいくつかの LINC は、他の遺伝子と融合し複数の融合遺伝子を形成していた。これらはタンパクを合成していないため、従来の抗体医薬では対応できず、核酸医薬の最もよい標的と考えられた。また同定した 938 個の融合遺伝子の候補のうち Unique Spanning-Pairs が 100 以上 (120-911) かつ Split-Reads が 100 以上 (100-1317) の基準を満たす 3 つの融合遺伝子候補、Description として kinase に関連するもの 54 個、LOC646214 のように gene name がなく、位置情報のみのもの、他の遺伝子や LINC (long intergenic/intervening non-coding RNA) との融合遺伝子など上位スコア 100 個について融合遺伝子候補の融合部の 5' 側と 3' 側のプライマーの設計を行った。

【異時性重複癌に対する次世代シーケンサーによる包括的遺伝子配列解析】

異時性重複癌に対して次世代シーケンサーによる包括的遺伝子配列解析を行った。

初発病変および次発病変で症例に関係なく共通していた遺伝子変異として APC、SMAD4、CDKN2A、CDKN2B を認めた。同一患者の病変であっても、初発病変と次発病変では遺伝子変異が異なっていた。初発病変に認められた遺伝子変異は次発病変にも認められており、次発病変において新たな遺伝子変異が付加されていた。しかし次発病変で付加された遺伝子変異は症例で異なっており、PTPRD、SMAD4、KEAP1、ARID1A、FBXW7、PIK3R1 に遺伝子変異を認める症例や KRAS、CDKN2A、CDKN2B に遺伝子変異を認める症例があった。次発病変における腫瘍 DNA 量の高いことが影響を与えた可能性も示唆されたが、次発病変で付加されていた遺伝子変異が転移や再発および発癌メカニズムに関与していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：榑野 正人

ローマ字氏名：(NAGINO,masato)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 20237564

研究分担者氏名：横山 幸浩

ローマ字氏名：(YOKOYAMA,yukihiro)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：寄附講座教授

研究者番号(8桁): 80378091

研究分担者氏名：國料 俊男

ローマ字氏名：(KOKURYO,toshio)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 60378023

研究分担者氏名：山口 淳平

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI,junpei)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 00566987

(2)研究協力者

なし