

令和元年6月12日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15262

研究課題名(和文) 発がんに関与する融合遺伝子形成における細胞融合の役割

研究課題名(英文) Cell fusion connects fusion gene generation with tumor evolution

研究代表者

田島 陽一 (TAJIMA, Youichi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：00300955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん増悪化における細胞融合の役割は、染色体およびDNAの不安定性によって腫瘍の表現型に多様性を生み出すことが考えられる。ただし、細胞融合が悪性腫瘍の引き金になるかは不明である。間葉系幹細胞(MSC)と膀胱癌細胞との細胞融合により融合遺伝子の形成、細胞の形質変化、および腫瘍形成に変化が見られた。また、細胞融合により多くの遺伝子が変動した。その中のX遺伝子は腫瘍の成長につれて発現が増加する傾向を示し、遺伝子破壊により腫瘍形成が抑制される知見を得た(論文作成中)。これらの結果からMSCとがん細胞との細胞融合は、がんの多様性に関与する可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの増悪化に細胞融合が関与する可能性は100年前から指摘されていたが、明確に証明した研究は殆どない。我々は細胞融合により新たに融合遺伝子が形成される可能性を検討した。がんの増悪化に細胞融合が一端を担っていれば、細胞融合に特化した創薬開発に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cell fusion likely drives tumor evolution by undermining chromosomal and DNA stability and by generating phenotypic diversity. However, whether a cell fusion event can initiate malignancy tumor evolution is unknown. We report that a fusion event between mesenchymal stem cells (MSCs) and bladder cancer cell line (UMUC-3) can initiate generation of fusion genes, cell transformation, and malignancy. We also reported that cell fusion induced the expression of genes including the X-gene associated with an aggressive phenotype. Hybrids depleted the X-gene suppressed tumor formations. These results suggested cell fusion event between MSCs and cancer cells is involve in tumor evolution by generation phenotypic diversity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞融合 融合遺伝子 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がんはゲノム遺伝子が傷つくことで発症し、長い時間をかけて腫瘍へと成長する。腫瘍が形成されると、末梢組織から免疫細胞が腫瘍組織に浸潤し、がん細胞を攻撃すると同時に正常組織も破壊する。損傷された組織は骨髄から動員された間葉系幹細胞（MSC）とマクロファージにより修復される。近年、腫瘍組織において間葉系幹細胞とがん細胞との間で細胞融合が起こり、がんを増悪化する知見が報告されている。骨髄移植を受けた患者は、平均よりも高く二次発がんを起こしやすく、そのがん組織中にはドナー由来の骨髄間葉系幹細胞（BM-MSC）とレシピエントの体細胞とが細胞融合したハイブリッド細胞がしばしば観察される。細胞融合によりゲノム DNA の倍加や細胞分裂時の異常が頻発し、殆どのハイブリッド細胞は死滅するが、稀に適応して生存する細胞が現れる。これらのハイブリッド細胞はゲノム不安定性を示し、染色体レベルでの重複、欠損、転座が起きており、ALK 融合遺伝子を含む発がんドライバー変異となる融合遺伝子形成を通常よりも多く持つ可能性が考えられる。本研究では、BM-MSC とがん細胞を細胞融合し、生存可能なハイブリッドを作製する。細胞融合時に発現誘導する遺伝子の解析、元々のがん細胞が持っていなかった形質変化に関わる遺伝子、新たな融合遺伝子の形成、ハイブリッド由来腫瘍の増悪化因子を探索し解析することが目的である。

2. 研究の目的

- (1) BM-MSC と各種がん細胞の細胞融合を行い、ハイブリッド細胞を作製する。細胞融合により発現誘導される遺伝子を探索する。また、ハイブリッド細胞の染色体数、細胞増殖、抗癌剤耐性について融合前の細胞と比較する。
- (2) 作製したハイブリッド細胞の融合遺伝子を解析する。
- (3) ハイブリッド細胞由来の腫瘍を作製し、がん微小環境中で起きる現象を解析する。

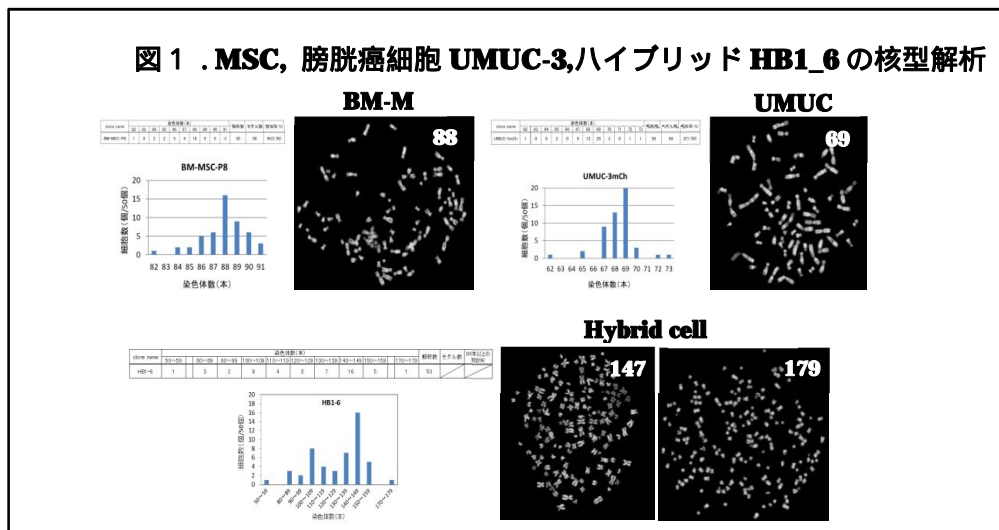
3. 研究の方法

- (1) 30 種類以上がん細胞株について BM-MSC との細胞融合が可能な細胞を予備的に検討したところ、膀胱癌 UMUC-3, T-24, および膵癌細胞 PANC-1 だけであった。そこで細胞融合によるハイブリッドを形成するかを調べるために、mCherry (赤色蛍光蛋白質) - Neo を発現させた膀胱がん細胞株 (UMUC-3) と GFP (緑色蛍光蛋白質) - Puro を発現させた不死化 BM-MSC をウイルス由来の融合蛋白質である VSV-G 遺伝子の一過性発現やポリエチレングリコール (PEG) により細胞融合を行った。
- (2) 作製したハイブリッド細胞より RNA を抽出し、次世代シーケンスによる RNA-seq 解析、および SOAPfuse による融合遺伝子の解析を行った。
- (3) ハイブリッド細胞を免疫不全マウスのヌードマウス (Balb/c-nu/nu) の皮下に移植し、皮下腫瘍を作製する。腫瘍の成長を腫瘍体積 (mm^3) で経時的に測定する。エンドポイントに達する前に腫瘍をサンプリングし、RNA、蛋白質、病理標本を作製する。

4. 研究成果

- (1) BM-MSC と UMUC-3 癌細胞との細胞融合によるハイブリッドの作製および解析

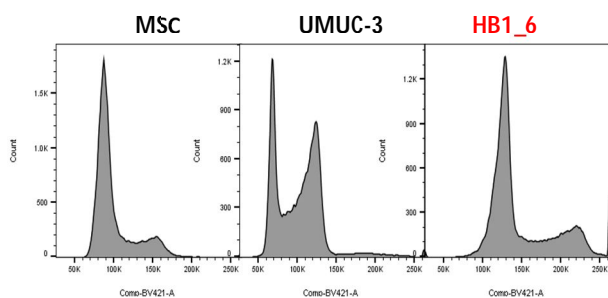
BM-MSC と UMUC-3 を各々異なる蛍光蛋白質遺伝子および薬剤耐性遺伝子を発現させ、ハイブリッド細胞を選択できるシステムを構築した。細胞融合は VSV-G 遺伝子の一過性発現やポリ



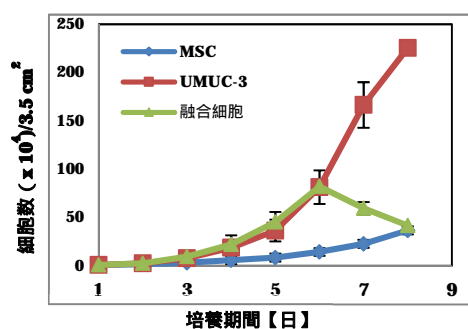
エチレングリコール (PEG) により細胞融合を行った。人工的細胞融合では、1対1で BM-MSC と UMUC-3 を融合させることは難しく、少数の細胞同士の融合から多数の細胞が塊を作った状態で細胞融合したものまで多様であった。しかし、薬剤選択により、BM-MSC と UMUC-3 が細胞融合して mCherry + GFP ダブルポジティブの 11 種類のハイブリッド細胞を樹立した。最初に BM-MSC と UMUC-3 および代表的なハイブリッド細胞 HB1-6 の核型解析を行った(図1)。その結果、BM-MSC の染色体数は 88 本で 4N に近く、UMUC-3 は 69 本で 3N、ハイブリッド細胞 HB1-6 は、細胞ごとにばらつきがあり、多いものでは 150 本を超えた細胞も多く、BM-MSC と UMUC-3 の染色体をたした 157 本に近いものが多かった。次に、in vitro 培養条件下での BM-MSC と UMUC-3 およびハイブリッド細胞 HB1-6 の DNA 含量、細胞増殖、抗癌剤の感受性、軟寒天培地でのコロニー形成について検討を行った(図2)。

図2 . in vitro culture でのハイブリッド細胞 (HB1_6)の特徴

1. 細胞内の DNA 量

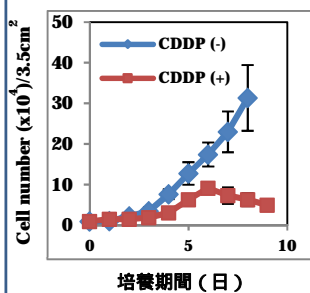


2. 細胞増殖

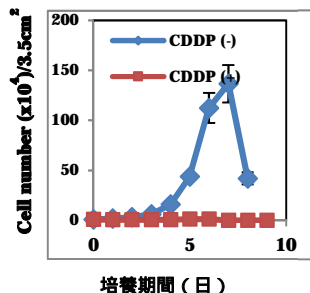


3. 細胞増殖における CDDP (Cisplatin) の感受性

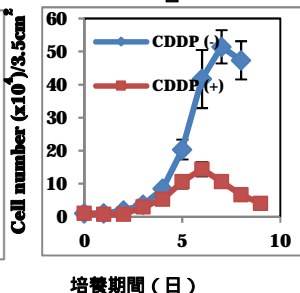
BM-MSC



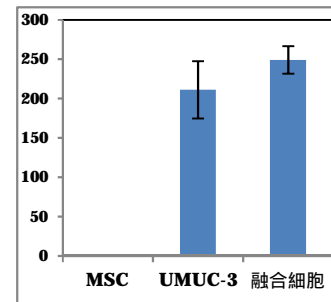
UMUC-3



HB1_6



4. 軟寒天培地によるコロニー形成



細胞内の DNA 含量は染色体数と同様に UMUC-3 < BM-MSC < ハイブリッド細胞の順であった。細胞増殖に関しては、BM-MSC は細胞増殖が遅く、UMUC-3 とハイブリッド細胞は同等のスピードで増殖することが分かった。抗がん剤シスプラチン(CDDP)に対する影響を検討したところ、UMUC-3 は感受性であり、BM-MSC とハイブリッド細胞は同程度の弱い耐性を示した。最後に、軟寒天培地でのコロニー形成（腫瘍形成）について調べた結果、BM-MSC はコロニーを形成しないため、腫瘍形成能を持たず、一方、UMUC-3 とハイブリッド細胞はほぼ同じ数のコロニーを形成したため、同程度の腫瘍形成能を持つことが推測された。

細胞融合により発現が増加する遺伝子をいくつか検出した。そのうちの X 遺伝子は BM-MSC で弱く発現し、UMUC-3 では発現が全くない。さらに、ハイブリッド細胞ではその発現が増加することが判明した（論文作成中）。

（２） 融合遺伝子解析

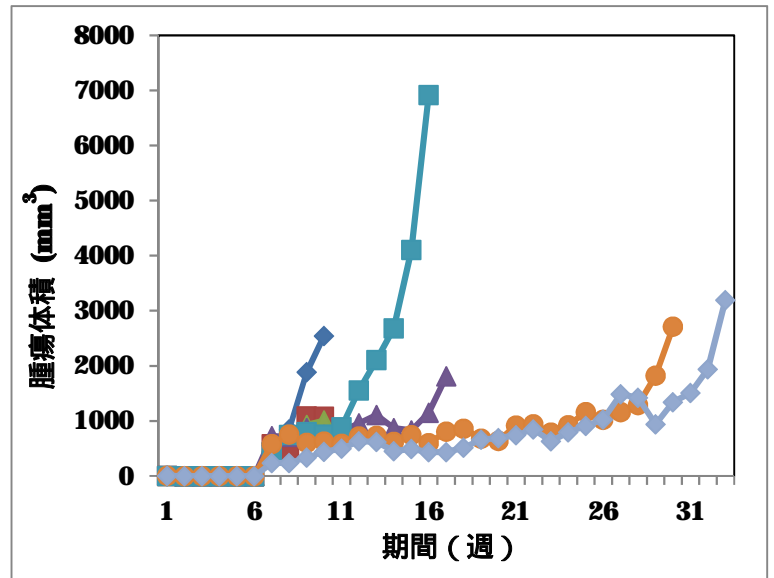
BM-MSC と UMUC-3 およびハイブリッド細胞から RNA を調整し、次世代シーケンスによる融合遺伝子解析を行った。（表 1）

表 1 . **SOAPfuse** により検出された融合遺伝子

No.	Cell	Gene 1	Gene 2	1 Chr.	2 Chr.	1 exon	2 exon	Reads
1	HB1.1	ATRX	MAGT1	X	X	1	2	20
2	HB1.1	RBM27	ATP5H	5	17	3	6	2
3	HB1.3	CAP1	COL1A2	1	7	7	15	2
4	HB1.3	DBNDD2	SYS1	20	20	non coding	4	2
5	HB1.4	RPS7	CAP1	2	1	non coding	polyA	3
6	HB1.4	RPS7SP	CAP1	2	2	non coding	polyA	3
7	HB1.5	COL1A1	EIF4E	17	4	16	non coding	2
8	HB1.6	ATRX	MAGT1	X	X	1	2	20
9	HB1.7	PSPC1	ZMYM5	13	13	3	4	2
10	HB1.7	RPL13A	HSP5A	19	9	8	non coding	3
11	HB1.7	RPL13AP5	HSP5A	10	9	1	non coding	3
12	HB1.8	GAA	IKBKAP	17	9	5	22	2
13	HB1.9	RPN2	CLIC4	20	1	5	non coding	2
14	HB1.10	UBB	TNFRS1A	17	12	2	non coding	2
15	HB1.11	PITRM1	PFKP	10	10	22	17	2
16	HB1.11	TNC	NPM1	9	5	non coding		2
17	BM-MSC	ATRX	MAGT1	X	X	1	2	20
18	BM-MSC	LPR1B	APR3C	2	12	1	6	2
19	UMUC-3	CTTN	SERINC1	11	6	14	non coding	2
20	UMUC-3	MAML1	COL23A1	5	5	1	2	10
21	UMUC-3	PC	TSPAN18	11	11	14	non coding	2
22	UMUC-3	RNF13	PFN2	3	3	3	2	2

合計 22 個の融合遺伝子の候補を検出した。BM-MSC で見つかった ATRX-MAGT1 はハイブリッド細胞 HB1-1 と HB1-6 に検出された。このうちの多くは non coding 領域との融合でタンパク質として機能していないと考えられる。この中で融合蛋白質として機能すると推測されるのは HB1-7 で検出された PSPC1-ZMYM5 融合遺伝子で、この融合遺伝子は既に存在は報告されている。しかし融合蛋白質としての機能はほとんどわかっていない (Liljebjorn H et al, Nature COMMUNICATIONS, 2016, 7:11790)。今回、細胞融合を行うことで融合遺伝子形成を検出することはできたが、転座ではなく、染色体 13 内での小さな欠失によって形成されたものであった。

図3 . HB1-6 の皮下腫瘍の成長



(3) ハイブリッド細胞による腫瘍形成
および癌微小環境の解析

ハイブリッド細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍の成長について検討した。ハイブリッド HB1-6 細胞を移植した場合、8週から 16 週にかけて腫瘍が大きく成長する群と、26 週以降に大きく成長する群の 2 つのパターンに分かれる傾向にあることが判明した。このパターンの違いを調べるためにそれぞれの腫瘍から RNA を調整し、RNA-seq 解析を行った。多くの遺伝子が変動する中で、細胞融合で発現が増加する X 遺伝子は成長の早い腫瘍で強く発現し、成長の遅い腫瘍では殆ど発現していなかった。

この X 遺伝子を CRISPR-Cas9 で遺伝子破壊した HB1-6 細胞をヌードマウスに移植すると、殆ど腫瘍は形成されず、いったん形成されても、腫瘍は委縮し、完治することが判明した。現在この X 遺伝子の働きについて詳細の検討中である (論文作成中)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 田島陽一、芝崎太：マウス生体内でのがん細胞と間葉系幹細胞との自然融合の検討. 第 41 回日本分子生物学会年会,2018.11.29.
2. 田島陽一、芝崎太：間葉系幹細胞との細胞融合により作製した休眠がん細胞の休眠に関連する遺伝子の探索. 第 41 回日本分子生物学会年会,2018.11.29.
3. 田島陽一、芝崎太：がんと間葉系幹細胞との融合における形質変化の解析.ConBio2017 2017.12.6. 神戸

〔図書〕 (計 0 件)

〔知的財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)