

平成30年6月19日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20349

研究課題名(和文)新規BCOR変異による腎明細胞肉腫腫瘍発生機序の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of tumorigenesis through novel BCOR abnormality in clear cell sarcoma of the kidney

研究代表者

上野 瞳 (Ueno, Hitomi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・上級研究員

研究者番号：30435630

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)：新規BCOR変異(BCOR internal tandem duplication：BCOR-ITD)は、ポリコームの形成に重要なドメイン内に重複を生じた変異である。

BCOR-ITDは、BCOR結合因子であるBCL6およびPCGF1を結合可能であることが明らかとなった。BCOR-ITDが他の腫瘍で認められるBCOR変異とは異なる機序で腫瘍を発生させる可能性がある。腫瘍検体を用いたヒストン修飾解析(ChIPシーケンス)の結果、特徴的なヒストン修飾領域が存在した。その領域は、DNAメチル化解析においても同様に特徴あるパターンを示した。

研究成果の概要(英文)：Clear cell sarcoma of the kidney has a characteristic novel BCOR abnormality; i.e. duplicated sequences at important domain for polycomb repressive complex formation (BCOR internal tandem duplication: BCOR-ITD). We investigated binding ability of BCOR-ITD to BCOR binding proteins.

BCOR-ITD was capable to bind BCL6 and PCGF1, both of which are BCOR binding proteins. Therefore, BCOR-ITD could be involved in tumorigenesis by potential different mechanisms from BCOR loss of function mutations, such as frameshift and nonsense mutations. As a result of histone modification analysis of tumor samples using ChIP-sequencing, clear cell sarcoma of the kidney had some distinctive peak regions. The regions were also exhibited unique pattern in DNA methylation analysis.

研究分野：小児がん

キーワード：腎明細胞肉腫 BCOR ポリコーム

1. 研究開始当初の背景

小児腎腫瘍には、腎芽腫(Wilms)、腎明細胞肉腫(CCSK)、腎ラブドイド腫瘍(RTK)、間葉芽腎腫(CMN)などが含まれる。Wilms、RTK、とCMNの一部については、それぞれ特徴的な遺伝子変異が報告されたことで、鑑別診断が可能となり、腫瘍発生機序の解明が進みつつある。しかし、CCSKに関しては、共通した遺伝子変異の報告がなく、病理学的所見も多様なため、診断が困難で病態解明も進んでいなかった。欧米の研究者から、CCSKの12%に*YWHAE-NUTM2*融合遺伝子が認められることが報告されたが、国内のCCSK患者においては、検出されていなかった。我々は、CCSKの分子遺伝学的特徴を明らかにするために、DNAメチル化修飾に注目して解析を行い、CCSKのDNAが他の腫瘍に比べて高メチル化傾向にあることを明らかにしている。このDNA高メチル化は、ヒストン修飾に関連する遺伝子の変異に起因する可能性があると考え、DNAメチル化データから、候補遺伝子を絞り込み、*BCL6 corepressor (BCOR)*遺伝子異常の発見に至った。*BCOR*遺伝子の異常は、他の種類の多くの小児がんで報告されているが、その変異型や変異箇所から機能喪失型と考えられている。

我々の発見した変異は、in-frame internal tandem duplication (ITD)という、珍しい変異型であり、特に*BCOR*におけるITD変異(*BCOR*-ITD)は、初めての報告である。*BCOR*-ITDは、CCSK全例に共通して認められること、ポリコーム複合体の1つであるBCOR複合体(異性型PRC1)の形成に重要なPCGF Ub-like fold discriminator (PUFD)ドメインに変異が生じていることから、*BCOR*-ITDがポリコーム機能異常を介してCCSKの腫瘍発生を誘導するドライバー遺伝子である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究はCCSKの腫瘍発生メカニズムを明らかにすることを目指している。主に新規*BCOR*-ITD変異の機能について、タンパク質結合能、複合体形成能およびエピゲノム異常について解析することで、他の小児がんで認められるBCOR変異との相違を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CCSKにおけるBCOR結合因子およびポリコーム複合体関連因子の遺伝子発現解析:

腫瘍検体(Wilms 6例、CCSK 6例、RTK 5例、CMN 9例、非腫瘍部腎組織 5例)からRNAを抽出し、定量PCRにてCCSKにおけるBCOR結合因子およびポリコーム複合体関連因子の遺伝子発現解析を行った。

(2) *BCOR*-ITDにおける既知のBCOR結合タンパク質結合能の検討:

*BCOR*結合タンパク BCL6 および MLLT3 を

其々、Mycタグ融合タンパクとしてHEK293細胞にてBCORタンパクと一過性co-transfectionを行った。BCORタンパクは、野生型、BCOR-ITD変異、ナンセンス変異(S1642X, E1732X)をFLAGタグ融合タンパクとして発現させ免疫沈降を行った。

(3) *BCOR*-ITDのポリコーム複合体形成能の検討:

① HEK293細胞にレトロウイルスベクターにてMycタグ融合PCGF1を安定発現させ、FLAGタグ融合BCORを一過性に発現させた。

② HEK293細胞にMycタグ融合PCGF1とFLAGタグ融合BCORをco-transfectionし免疫沈降を行った。

(4) CCSKにおけるヒストン修飾の検討:

CCSK腫瘍検体3例および非腫瘍部腎組織3例の抗H3K4me3抗体、抗H3K27ac抗体、抗H3K9me3抗体、抗H3K27me3抗体によるChIPシーケンス解析を行い、CCSKにおける特徴的なヒストン修飾領域を探索した。

(5) ゲノム編集によるBCOR-ITD変異細胞株の作出の試み:

ヒト線維肉腫由来HT1080細胞、ヒト胎児肺由来MRC5細胞、ヒト胚性癌細胞株NT2細胞、ヒト胎児腎細胞株HEK293細胞を用い、CRISPR/Cas9にてゲノム編集を行った。*BCOR*遺伝子の下流に薬剤耐性遺伝子を組み込んだ。

4. 研究成果

(1) CCSKにおけるBCOR結合因子およびポリコーム複合体関連因子の遺伝子発現解析

BCOR結合因子である*BCL6*及び*MLLT3*の遺伝子発現は、非腫瘍部腎組織(Kidney)および他の小児腎腫瘍に比べ、CCSKにおいて有意な増加が認められた。一方で、PCGF1の遺伝子発現は腫瘍病型間での差を認めなかった。

(図1)

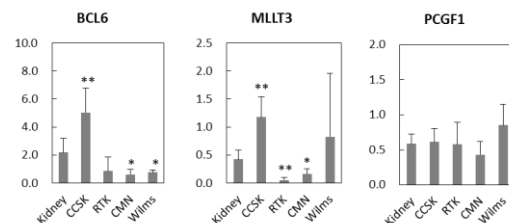


図2 BCOR結合因子の遺伝子発現

** p<0.01, * p<0.05

ポリコーム複合体関連因子の発現について、*RING1B*, *KDM2B*, *CBX4*, *CBX8*, *EZH2*, *EED*, *BMI1*は、非腫瘍部腎組織に比べ全ての小児腎腫瘍で発現増加の傾向を認めた。特に、*RING1B*, *KDM2B*, *CBX4*, *EZH2*は、CCSKにおいて有意な増加を認めた。*CBX2*, *SUZ12*は、非腫瘍部腎組織に対して有意な差を認めなかった(図2)。

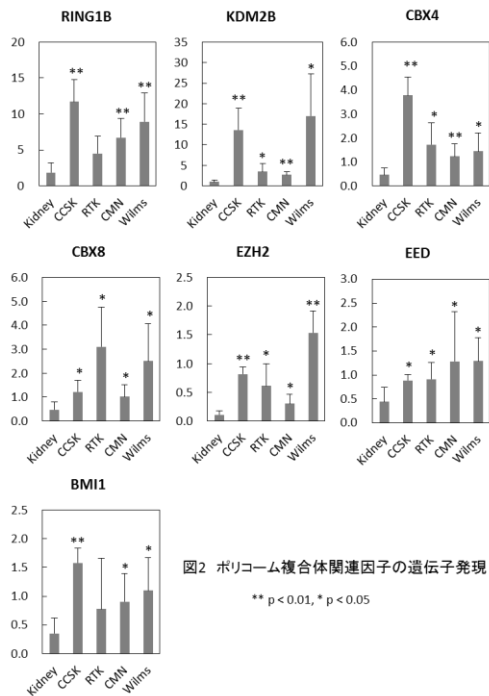


図2 ポリコーム複合体関連因子の遺伝子発現
** p < 0.01, * p < 0.05

(2) BCOR-ITD における既知の BCOR 結合タンパク質結合能の検討

BCOR と BCL6 の結合について、免疫沈降の結果、野生型、BCOR-ITD、ナンセンス変異共に結合が認められた。MLLT3 との結合については、全ての BCOR との結合を確認することが出来なかった。

(3) BCOR-ITD のポリコーム複合体形成能の検討

HEK293 細胞にてレトロウイルスによる PCGF1 安定発現細胞を作成し、BCOR を一過性発現させたところ、野生型および BCOR-ITD 変異において PCGF1 タンパクの発現量が BCOR の発現量に依存する結果を得た。一方で PCGF1 結合ドメインの多くを欠失したナンセンス変異 (S1642X) においては、PCGF1 の発現量の上昇を認めなかった。

BCOR と PCGF1 の結合を確認するため、其々を co-transfection にて発現させ、免疫沈降を行った。その結果、BCOR-ITD と PCGF1 の結合率は、野生型 (Wild) に比べてやや低い傾向があるものの、有意な差を認めなかった。一方で、S1642X 変異においては、PCGF1 との結合率が極めて低かった。E1732X 変異は、Wild に比べて明らかに低いものの、S1642X 変異よりも結合率が高かった。

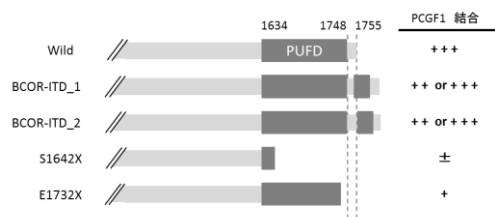


図3 BCOR変異体C末端の模式図とPCGF1との結合

(4) CCSK におけるヒストン修飾の検討

CCSK 腫瘍検体と非腫瘍部腎組織における ChIP シークエンスの結果を比較したところ、CCSK における H3K27me3 のピーク数が多い傾向があることがわかった。また、特徴的な H3K4me3 のピーク領域があることが分かった。このピーク領域は、Infinium450K による DNA メチル化解析においても同様に特徴的であった。

(5) ゲノム編集による BCOR-ITD 変異細胞株の作出の試み

BCOR-ITD 変異を有する細胞株が存在しないことから、BCOR-ITD 変異細胞の作出を行った。細胞株を用いたゲノム編集を試み、相同組み換えによる BCOR-ITD 変異への置換を行った。MRC5 細胞、NT2 細胞では、BCOR-ITD 細胞を得ることが出来なかったが、HT1080 細胞および HEK293 細胞において、BCOR-ITD 変異への置換が確認された。

しかしながら、HT1080 細胞は BCOR 遺伝子の promoter 領域に DNA メチル化修飾が生じており、BCOR-ITD の遺伝子発現を確認することが出来なかった。一方で、HEK293 細胞における BCOR-ITD の遺伝子発現は確認されたが、同一細胞内での野生型 BCOR の発現も認められ、複数の X 染色体の存在もしくは X 染色体不活化の破綻が推測される。

今回、BCOR-ITD のみを発現する細胞を得ることは出来なかったが、HT1080 細胞の結果から、CCSK の腫瘍発生母地となった細胞は、BCOR を発現している細胞であることが考えられる。

以上の事から、BCOR-ITD 変異は、これまで発見されていた frameshift 変異やナンセンス変異による機能喪失型変異とは異なる機序で腫瘍を発生させている可能性を見出した。現在、BCOR-ITD 変異は、他の小児がんでも発見されつつあり、我々の研究は腎腫瘍のみならず BCOR-ITD 変異陽性腫瘍の発生機序の解明にも繋がると期待される。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 上野瞳, 大喜肇, 清河信敬. 小児腎腫瘍における新規遺伝子異常. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).
- (2) 上野瞳, 大喜肇, 清河信敬. 小児腎腫瘍におけるポリコーム複合体構成因子の発現解析. 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2016 年 11 月 9 日, ひめぎんホール (愛媛県県民文化会館) (愛媛県・松山市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 瞳 (Ueno Hitomi)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・上級研究員
研究者番号：30435630

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

大喜多 肇 (Okita Hajime)

慶応義塾大学・医学部・病理学教室・准教授

高田 修治 (Takada Shuji)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長

中林 一彦 (Nakabayashi Kazuhiko)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・周産期ゲノミクス研究室・室長

清河 信敬 (Kiyokowa Nobutaka)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・部長