

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02677

研究課題名(和文)肉腫融合遺伝子による発がんメカニズムの統合的探索

研究課題名(英文)Comprehensive investigation of tumorigenesis mechanism induced by sarcoma-related fusion genes

研究代表者

高阪 真路 (Kohsaka, Shinji)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：00627119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：肉腫関連融合遺伝子を3T3細胞、C2C12マウス筋芽細胞及びマウス間葉系幹細胞に導入し、増殖能、分化抑制機能を評価した。異なる蛍光蛋白質でラベルした親株とがん化株をポリマースライド上に播種し、比較セルアレイを実施し、がん化株のみが有意に増殖・接着する合成ポリマーを同定した。樹立したがん化株のRNA-seqを行い、クラスタリング解析及びGene Set Enrichment Analysisを行い、各融合遺伝子の特徴となる発現遺伝子群やシグナルパスウェイを同定し、クラスターごとに候補分子標的薬の選定を行い、薬剤評価実験により、融合遺伝子特異的に作用する分子標的薬を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

融合遺伝子特異的な遺伝子発現パターンが同定され、融合遺伝子横断的な分類がすすみ、融合遺伝子を標的とした分子標的薬の創薬に向けた分子プロファイリングの基盤が構築された。また融合遺伝子導入細胞特異的に増殖・接着する合成ポリマーが同定され、がん化や薬剤耐性などの細胞機能のスクリーニングに適したマテリアルの開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Sarcoma-related fusion genes were integrated into 3T3, C2C12 and mouse mesenchymal stem cells and abilities of cell proliferation and differentiation inhibition were evaluated. Parental cells and oncogenic cells were labeled with individual fluorescent proteins and seeded on polymer slides to identify synthetic polymers on which oncogenic cells grow rapidly or attach strongly compared with parental cells. Established oncogenic cells were performed RNA-seq and conducted clustering analysis and Gene Set Enrichment Analysis to identify gene sets and signaling pathways specifically affected by respective fusion genes. Candidate molecular targeted drugs having specific inhibitory effects on fusion-introduced cells were screened and validated by individual drug sensitivity assay.

研究分野：がんゲノム

キーワード：肉腫 融合遺伝子 機能解析

1. 研究開始当初の背景

肉腫は間葉系細胞を起源とする腫瘍であり、これまで正確な組織診断が困難であったが、近年組織特異的な染色体転座からキメラ遺伝子変異が発見され癌化のメカニズムは明らかになりつつある。しかしながら治療に関しては、抗がん剤の発達により生存率の上昇がみられるものの、いまだに薬剤抵抗性の高い腫瘍である。近年の分子生物学的手法による肉腫の分類が進み、分子標的治療が注目されているが、臨床応用されているものは多くはない。今後さらなる分子生物学の解析に基づいた個別化治療が望まれている。融合遺伝子の網羅的機能解析を行い、各融合遺伝子の詳細な機能解析が進めば、肉腫の分子プロファイリングが可能になり、治療法の確立につながると考えられる。また機能解析や創薬が困難である原因としてがん化能を評価する適切な培養系がないことにある。全ての融合遺伝子のがん化能評価ができる培養系を確立することが重要である。腫瘍組織中には分子細胞生物学的要素だけでなく、低酸素や低 pH、低栄養などの化学的要因も存在し、さらに、物理的要因も絡み合った極めて複雑な環境下でがん細胞が生存している。近年再生医療分野において合成ポリマーの細胞培養基材としての有用性が注目を浴びている。ポリマーはモノマーの種類や組み合わせによって異なる物性を生み出すことができ、これまでもバイオマテリアルによる xeno フリー・feeder フリーでのヒト ES 細胞の長期維持など、正常細胞に対する機能的バイオマテリアルの存在が幾つか報告されている。ヒト間葉系幹細胞の骨・筋肉・神経への分化系譜が足場の硬度に依存するとの基礎的知見も存在するが、がん化や薬剤耐性などの細胞機能のスクリーニングに適したマテリアルの存在は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では肉腫融合遺伝子のもたらす悪性化メカニズムを解明し、分子標的治療法の開発へむけた分子プロファイリングの基盤を構築することを目的とする。これまでに変異遺伝子をハイスループットに機能解析することを可能にする新しいがん遺伝子機能解析法、mixed all nominated mutants in one method (MANO 法)を開発し、variants of unknown significance (VUS)を網羅的に機能解析することで新規治療標的およびバイオマーカーの同定に成功している。この手法を用いることで同時に 100 種類以上の融合遺伝子変異体の増殖能の強さや薬剤感受性を評価することが可能である。特に肉腫融合遺伝子は通常培養下で細胞増殖能に影響しない場合が多いため、各融合遺伝子の機能評価に最適の培養条件を検討する必要があるが、MANO 法は多数の融合遺伝子を同時に条件検討できるため非常に有用である。

更に本研究では isogenic ながん細胞モデルを構築することで融合遺伝子導入後のトランスクリプトーム解析を網羅的に行う。これまでに融合遺伝子の大規模解析は行われておらず、網羅的に比較することでそれぞれの機能がより詳細に評価することで、肉腫発がんメカニズムの統合理解を進める。

また本研究では、ポリマーマイクロアレイの技術を用い、数百種類の合成ポリマーからがん化能や薬剤耐性レベルを評価可能な足場材となり得るバイオマテリアルを探索する。ポリマーマイクロアレイは、何百種類もの独自に合成したポリマーをスライドガラス上に等間隔にスポットし、その上で一斉に細胞を培養することで機能性ポリマーをハイスループットにスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

・MANO 法を用いた融合遺伝子機能解析及び最適評価系の確立

本研究では約 100 種類の融合遺伝子の機能解析を行う。まずマウス線維芽細胞 3T3 細胞に融合遺伝子を導入し、3T3 focus formation assay 及び MANO 法での cell competition assay を行いこのアッセイ系でがん化能評価ができるかを判定する。そこでがん化能が評価できなかった融合遺伝子については C2C12 マウス筋芽細胞及びマウス間葉系幹細胞に遺伝子導入し、分化誘導培地やバイオマテリアルを選択し分化誘導を行い、MANO 法での細胞数変化を定量し、融合遺伝子の分化抑制機能を評価すると共に評価に適した培養系を確立する。

・がん化能評価に適したバイオマテリアルの開発

トランスフォームしたがん細胞のみが生存可能なバイオマテリアルを探索する。まずは上記解析でがん化を確認できた融合遺伝子をマウス間葉系幹細胞に導入した isogenic モデルで、異なる蛍光蛋白質でラベルした親株とがん化株をポリマースライド上に播種し、比較セルアレイを実施する。がん化株のみが有意に増殖・接着する合成ポリマーを蛍光イメージングにより抽出する。増殖と接着のみでの評価が及ばず、培養系の精度を上げる必要がある場合には、骨・脂肪・軟骨への分化誘導条件下に暴露し、Alizarin-red S・Oil-red O 染色によって分化指向性や分化抵抗性の観点から、がん化株特異的な機能性ポリマーを探索する。最終的に同定したポリマー群と MANO 法とを組み合わせることにより、融合遺伝子導入全クローン混在下での活性変異体の分離精度を評価し、革新的な分離デバイスを開発する。

・トランスクリプトーム解析

3T3 マウス線維芽細胞, C2C12 マウス筋芽細胞, マウス間葉系幹細胞からの isogenic 細胞株を用いて各融合遺伝子が発現制御する特異的な遺伝子発現パターンを比較し, 100 種類の融合遺伝子のクラスタリング解析を行う.

・分子標的薬スクリーニング

融合遺伝子のクラスタリング解析および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)により各融合遺伝子の特徴となる発現遺伝子群やシグナルパスウェイを同定しクラスターごとに分子標的を絞り込み, 候補分子標的薬の選定を行う. それらの薬剤投与実験を行い MANO 法で評価することで, 融合遺伝子特異的に作用する分子標的薬の候補を同定する.

4. 研究成果

肉腫関連融合遺伝子の配列情報をデータベースより取得し, 機能評価予定の肉腫関連融合遺伝子のクローニングを行い, 必要なコンストラクトを構築した. マウス線維芽細胞である 3T3 細胞に融合遺伝子を導入し, 3T3 focus formation assay 及び MANO 法での cell growth competition assay を行い, このアッセイ系でのがん化能を評価した. 3T3 細胞においてがん化能が評価できなかった融合遺伝子については C2C12 マウス筋芽細胞及びマウス間葉系幹細胞に遺伝子導入し, 分化誘導培地やバイオマテリアルを選択し分化誘導を行い, MANO 法での細胞数変化を定量し, 融合遺伝子の分化抑制機能を評価すると共に評価に適した培養系を確立した. 更にトランスフォームしたがん細胞のみが生存可能なバイオマテリアル探索を行った. がん化を確認できた融合遺伝子を 3T3 細胞, C2C12 細胞に導入した isogenic モデルで, 異なる蛍光蛋白質でラベルした親株とがん化株をポリマースライド上に播種し, 比較セルアレイを実施し, がん化株のみが有意に増殖・接着する合成ポリマーを蛍光イメージングにより抽出した. 3T3 細胞, C2C12 細胞, マウス間葉系幹細胞に肉腫関連融合遺伝子を導入した isogenic 細胞株の RNA-seq を行い, 各融合遺伝子が発現制御する特異的な遺伝子発現パターンを比較し, 融合遺伝子のクラスタリング解析を行った. さらに, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)により各融合遺伝子の特徴となる発現遺伝子群やシグナルパスウェイを同定しクラスターごとに, 候補分子標的薬の選定を行った. MANO 法を用いて候補薬剤評価実験を行い, 融合遺伝子特異的に作用する分子標的薬を同定した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hayashi T, Takamochi K, Kohsaka S, Kishikawa S, Suehara Y, Takahashi F, Suzuki K, Saito T, Yao T	4. 巻 -
2. 論文標題 Transformation from EGFR/PTEN co-mutated lung adenocarcinoma to small cell carcinoma in lymph node metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12919.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kohsaka S, Hayashi T, Nagano M, Ueno T, Kojima S, Kawazu M, Shiraishi Y, Kishikawa S, Suehara Y, Takahashi F, Takahashi K, Suzuki K, Takamochi K, Mano H	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of Novel CD74-NRG2 Fusion From Comprehensive Profiling of Lung Adenocarcinoma in Japanese Never or Light Smokers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtho.2020.01.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Makise N, Mori T, Kobayashi H, Nakagawa K, Ryo E, Nakajima J, Kohsaka S, Mano H, Aburatani H, Yoshida A and Ushiku T	4. 巻 -
2. 論文標題 Mesenchymal Tumors with RREB1-MRTFB Fusion Involving the Mediastinum: Extra-Glossal Ectomesenchymal Chondromyxoid Tumors?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/his.14080.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa N, Takeda Nakamura I, Ueno T, Kojima S, Kawazu M, Akaike K, Okubo T, Takagi T, Suehara Y, Hayashi T, Saito T, Kaneko K, Mano H, Kohsaka S	4. 巻 9
2. 論文標題 Detection of circulating sarcoma tumor cells using a microfluidic chip-type cell sorter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56377-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ando M, Kobayashi H, Shinozaki-Ushiku A, Chikuda H, Matsubayashi Y, Yoshida M, Saito Y, Kohsaka S, Oda K, Miyagawa K, Aburatani H, Mano H, Yamasoba T	4. 巻 -
2. 論文標題 Spinal solitary fibrous tumor of the neck: Next-generation sequencing-based analysis of genomic aberrations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.12.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa D, Takahashi F, Mitsuishi Y, Tajima K, Hidayat M, Winardi W, Ihara H, Kanamori K, Matsumoto N, Asao T, Ko R, Shukuya T, Takamochi K, Hayashi T, Suehara Y, Takeda Nakamura I, Ueno T, Kohsaka S, Mano H, Takahashi K	4. 巻 11
2. 論文標題 Activation of insulin-like growth factor-1 receptor confers acquired resistance to osimertinib in non-small cell lung cancer with EGFR T790M mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thorac Cancer	6. 最初と最後の頁 140-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suehara Y, Okubo T, Kurihara T, Hayashi T, Kohsaka S, Kazuno S, Sano K, Hasegawa N, Miura Y, Akaike K, Kim Y, Takamochi K, Takahashi F, Ueno T, Kaneko K, Saito T	4. 巻 13
2. 論文標題 Protein Expression Profiles Corresponding to Histological Changes with Denosumab Treatment in Giant Cell Tumors of Bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proteomics Clinical Applications	6. 最初と最後の頁 e1800147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prca.201800147.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kage H, Kohsaka S, Shinozaki-Ushiku A, Hiraishi Y, Sato J, Nagayama K, Ushiku T, Takai D, Nakajima J, Miyagawa K, Aburatani H, Mano H, Nagase T	4. 巻 110
2. 論文標題 Small lung tumor biopsy samples are feasible for high quality targeted next generation sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2652-2657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kohsaka S, Tatsuno K, Ueno T, et al.	4. 巻 110
2. 論文標題 Comprehensive assay for the molecular profiling of cancer by target enrichment from formalin-fixed paraffin-embedded specimens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1464-1479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii M, Suehara Y, Sano K, Kohsaka S, Hayashi T, Kazuno S, Akaike K, Mukaiharu K, Kim Y, Okubo T, Takamochi K, Takahashi F, Kaneko K, Saito T	4. 巻 9
2. 論文標題 Proteomic signatures corresponding to the SS18/SSX fusion gene in synovial sarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 37509-37519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26493.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kohsaka S, Petronczki M, Solca F, Maemondo M	4. 巻 15
2. 論文標題 Tumor clonality and resistance mechanisms in EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: implications for therapeutic sequencing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Future Oncol	6. 最初と最後の頁 637-652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/fon-2018-0736.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaike K, Suehara Y, Kohsaka S, Hayashi T, Tanabe Y, Kazuno S, Mukaiharu K, Toda-Ishii M, Kurihara T, Kim Y, Okubo T, Hayashi Y, Takamochi K, Takahashi F, Kaneko K, Ladanyi M, Saito T	4. 巻 9
2. 論文標題 PPP2R1A regulated by PAX3/FOXO1 fusion contributes to the acquisition of aggressive behavior in PAX3/FOXO1-positive alveolar rhabdomyosarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 25206-25215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25392.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 14件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 廣瀬毅, 高阪真路, 池上政周, 間野博行
2. 発表標題 EGFR遺伝子exon 20挿入変異に対するハイスループット機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路
2. 発表標題 がん個別化医療の実現に向けた戦略的研究開発
3. 学会等名 第237回呼吸器学会関東地方会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路
2. 発表標題 ハイスループット遺伝子機能解析法のがんゲノム医療への応用
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路
2. 発表標題 シングルセル解析のがんゲノム医療への応用
3. 学会等名 第16回日本病理学会カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路, 長野匡晃, 上野敏秀, 間野博行
2. 発表標題 がん遺伝子における意義不明バリエーションのハイスループット機能解析法
3. 学会等名 第17回日本臨床学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路
2. 発表標題 Application of a High-throughput Functional Evaluation of Variants of Unknown Significance to Personalized Medicine
3. 学会等名 第38回札幌国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路
2. 発表標題 がん研究からがんゲノム医療への応用
3. 学会等名 2019年度第1回教育研修・講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路, 間野博行
2. 発表標題 ゲノム医療におけるリキッドバイオプシーの有用性
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路
2. 発表標題 がんゲノム医療の実現にむけたがん遺伝子ハイスループット機能解析法の構築
3. 学会等名 第30回日本医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高阪真路, 長野匡晃, 間野博行
2. 発表標題 がん遺伝子ハイスループット機能解析によるがん生物学の統合的理解
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高阪真路, 長野匡晃, 間野博行
2. 発表標題 意義不明変異陽性がんに対する分子標的治療
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高阪真路, 長野匡晃, 間野博行
2. 発表標題 ハイスループット機能解析法のがんゲノム医療への応用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Kohsaka, Masaaki Nagano, and Hiroyuki Mano
2. 発表標題 Application of a High-throughput Functional Evaluation of Variants of Unknown Significance to Personalized Medicine
3. 学会等名 The 6th JCA-AACR Special Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高阪真路, 長野匡晃, 間野博行
2. 発表標題 がんゲノム医療のためのハイスループット機能解析法の確立
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高阪真路
2. 発表標題 NGSのゲノム解析レポートの読み方
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高阪真路, 長野匡晃, 間野博行
2. 発表標題 肺がん関連遺伝子変異のハイスループット機能解析
3. 学会等名 第22回がん分子標的治療学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Nagano, Shinji Kohsaka, Toshihide Ueno, Shinya Kojima, Masachika Ikegami, Ikuko Takeda, and Hiroyuki Mano
2. 発表標題 High-throughput functional evaluation of variants of unknown significance in ERBB2
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 高阪 真路	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 272
3. 書名 医学のあゆみ がん研究10か年戦略の成果と課題 プレジジョンメディシンの実現に向けた意義不明変異の解釈	

1. 著者名 高阪 真路	4. 発行年 2019年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 112
3. 書名 病理と臨床 2019年10月号 シングルセル解析遺伝子解析	

1. 著者名 高阪 真路	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 100
3. 書名 BIO Clinica 2019年 8月臨時増刊号 VUS解釈のためのハイスループット機能解析法	

1. 著者名 高阪 真路, 辰野 健二, 織田 克利	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 102
3. 書名 Precision Medicine 2019年2月号 がんクリニカルシーケンス検査の開発と臨床応用	

1. 著者名 高阪 真路, 辰野 健二, 織田 克利	4. 発行年 2018年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 132
3. 書名 特集 がんゲノム医療・Precision Medicineの展開と諸問題	

1. 著者名 高阪真路	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 243
3. 書名 実験医学増刊 Vol.36 No.15 動き始めた がんゲノム医療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梶 康一 (Tabu koichi) (10466469)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------