

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 1 9 日現在

機関番号：1 7 1 0 4

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：1 8 K 1 0 0 4 6

研究課題名（和文）石綿関連悪性中皮腫の次世代シーケンスで同定した融合遺伝子の発癌・治療標的性解析

研究課題名（英文）Carcinogenesis and therapeutic targetability analysis of fusion genes identified by next-generation sequencing of asbestos-related malignant mesothelioma

研究代表者

嘉数 直樹（Kakazu, Naoki）

九州工業大学・学生支援本部・特任教授

研究者番号：2 0 2 6 4 7 5 7

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンシング技術の導入により、悪性中皮腫の発癌に関与していると考えられる融合遺伝子が続々と明らかになってきた。これらの多くは、NF2、ALK、BAP1、PBRM1、SETD2、EWSR1、PTENの各融合群にグループ分けできる。研究代表者が解析した悪性中皮腫細胞株においては、ALK融合群の2融合遺伝子（ALK-SDC1、ALK-RAB3B）とSETD2融合群の1融合遺伝子（SETD2-PCDH15）が同定され、悪性中皮腫の発癌に関与している可能性が考えられた。ALK融合遺伝子陽性の悪性中皮腫に対しては、分子標的治療薬としてALKチロシンキナーゼ阻害薬が治療効果を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、悪性中皮腫細胞株のゲノムを次世代シーケンシング技術によって解析することにより、悪性中皮腫の発癌に関与し、かつ、分子標的治療のターゲットの候補となりうる融合遺伝子を同定できた点で、本研究は学術的意義があると考えられる。

また、本研究では悪性中皮腫の細胞株でしか解析できなかったが、患者の腫瘍組織を次世代シーケンシング技術によって解析することにより、その患者の癌の発生に関与している固有の融合遺伝子を捉えることも可能であることが示され、さらには、その融合遺伝子をターゲットとする有効な分子標的治療薬を探索することにも役立つことが示唆された点で、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using of the next-generation sequencing technologies has led to the identification of a number of fusion genes that may be involved in the carcinogenesis of malignant mesothelioma. Many of these can be grouped into the NF2, ALK, BAP1, PBRM1, SETD2, EWSR1 and PTEN fusion groups. In the malignant mesothelioma cell line analysed by the next-generation sequencing technologies, two fusion genes in the ALK fusion group (ALK-SDC1 and ALK-RAB3B) and one fusion gene in the SETD2 fusion group (SETD2-PCDH15) were identified and may be involved in the development of malignant mesothelioma. It was suggested that ALK tyrosine kinase inhibitors as molecularly-targeted therapies may be effective in the treatment of ALK fusion-positive malignant mesothelioma.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：悪性中皮腫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 固形腫瘍における融合遺伝子同定の意義

20世紀には、造血器腫瘍において、染色体解析技術により病型特異的な染色体転座が数多く明らかになり、その転座切断点の詳細な分子生物学的解析によって融合遺伝子が多く同定された。次いで蛋白レベルでのシグナル伝達の解析に引き継がれて、融合遺伝子が発癌に本質的な役割を果たしていることが明らかになった。

一方、固形腫瘍においては、病型特異的な染色体転座がなかなか見出されなかったため、融合遺伝子の同定は困難であった。ところが、21世紀に入って次世代シーケンサーが開発され、RNA-sequencing (RNA-Seq) 解析技術と組み合わせることによって、染色体解析技術によらない全ゲノム解析による融合遺伝子の同定が可能になった。この一連の技術革新によって、多くの種類の固形腫瘍において、その発癌に深く関与していると考えられる融合遺伝子が続々と明らかになってきた。近年の代表的な発見例として、神経膠腫や悪性黒色腫等の固形腫瘍におけるNTRK融合遺伝子が挙げられる。NTRK融合遺伝子陽性の腫瘍については、生成される融合蛋白のキナーゼ活性を阻害する薬剤であるEntrectinibやLarotrectinibの臨床的有効性が明らかになり、我が国において分子標的治療薬として相次いで臨床適用が承認された。このように、病態に本質的に関与している融合遺伝子の発見は発癌機構の解明だけではなく、分子標的治療薬の開発にもつながる。

(2) 悪性中皮腫の特徴

悪性中皮腫の症例の80%以上が石綿曝露、特に職業的曝露と密接に関連している。このため、近年では世界各国で石綿の製造や使用は禁止されているが、石綿曝露から悪性中皮腫発生までの潜伏期間がおおよそ20年～50年と長いことから、今でも世界中で悪性中皮腫の発生率は横ばいか上昇し続けている。悪性中皮腫の患者に対しては、手術療法や抗癌剤投与および放射線照射等のさまざまな治療法が試みられているが、全生存期間は18ヵ月未満と依然として予後は不良である。

(3) 悪性中皮腫の発癌機構の解明と分子標的治療薬の開発に向けて

予後不良の悪性中皮腫に対しては、次世代シーケンシング技術とRNA-Seq解析技術による全ゲノム解析によって他の固形腫瘍と同様に発癌に関与している融合遺伝子が発見できれば、発癌のドライバーであったり、分子標的治療のターゲットであったりして、悪性中皮腫の発癌機構の解明や有効な分子標的治療薬の開発に結び付き、全生存期間の延伸に寄与することが期待される。

2. 研究の目的

研究代表者は、悪性中皮腫の細胞株を対象に次世代シーケンシング技術とRNA-Seq解析技術による全ゲノム解析を行い、発癌のドライバーや分子標的治療のターゲットとなりうる融合遺伝子候補を発見することを目的として、本研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

悪性中皮腫の6つのヒト細胞株が今回の研究では用いられた。ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、HMMMEは理研バイオリソースセンターから購入した。H28、H2052、H2452はAmerican Type Culture

Collectionから購入した。

(2) 次世代シーケンシングと RNA-Seq 解析

ACC-MESO-4より通常の方法に従ってcDNAライブラリーを作製し、次世代シーケンサーIllumina HiSeq 2000 sequencing platformに基づくRNA-Seq解析を行った。得られたpaired-end read配列情報をdeFuse (version 0.5.0) アルゴリズムにより解析し、融合遺伝子から発現したと考えられるキメラRNA候補を網羅的に同定した。

(3) RT-PCR 解析

次世代シーケンシング技術と RNA-Seq 解析技術によって同定した複数のキメラ RNA 候補それぞれについてシーケンスデータを基にして切断点を挟むようにプライマーを設定し、RT-PCR 解析で ACC-MESO-4 や他の悪性中皮腫細胞株 5 株 (ACC-MESO-1、H28、H2052、H2452、HMMME) において実際に発現しているのか確認した。

(4) 発癌のドライバーや分子標的治療のターゲットとなりうる融合遺伝子の検討

RNA-Seq 解析によって同定されたキメラ RNA 候補それぞれについて、発癌のドライバーや分子標的治療のターゲットとなりうる融合遺伝子から発現したものの、シーケンスデータや過去の文献情報等を基に分析・検討した。

4. 研究成果

(1) 悪性中皮腫における融合遺伝子群の同定

次世代シーケンシング技術の導入により、悪性中皮腫において発癌に関与していると考えられる融合遺伝子が続々と明らかになってきた。それに伴い、同定された複数の融合遺伝子間において片方の遺伝子が同じであるような場合がいくつも見つかり、グループを形成できることも明らかになってきた。現時点では、NF2融合群 (11融合遺伝子)、ALK融合群 (5融合遺伝子)、BAP1融合群 (5融合遺伝子)、PBRM1融合群 (5融合遺伝子)、SETD2融合群 (4融合遺伝子)、EWSR1融合群 (3融合遺伝子)、PTEN融合群 (2融合遺伝子) にグループ分けできることが示唆された。研究代表者がRNA-seq解析した悪性中皮腫細胞株ACC-Meso-4においては、ALK融合群の2融合遺伝子 (ALK-SDC1、ALK-RAB3B) とSETD2融合群の1融合遺伝子 (SETD2-PCDH15) が同定され、悪性中皮腫の発癌に関与している可能性が考えられたが、今後のさらなる解析で明らかにしていく必要がある。

(2) ALK融合遺伝子を有する悪性中皮腫における分子標的治療の可能性の検討

ALK融合群については、肺癌においてもALK-EML4融合遺伝子が非小細胞性肺癌で数多く見出されている。このようなALK融合遺伝子陽性の肺癌に対しては、ALKチロシンキナーゼ阻害薬が分子標的治療薬として高い治療効果を示すことが臨床で確認されている。これらの阻害薬は、ALK融合遺伝子を有する悪性中皮腫の症例においても治療効果を示すことが期待される。

(3) DUS4L-BCAP29 キメラ RNA の発現の確認と悪性中皮腫の発癌への関与の検討

キメラRNAが形成される機序としては主に2通りが考えられている。1つは異なる染色体間の転座や同一染色体内における逆位 (inversion) や欠失等による構造異常から、離れた位置にある遺伝子が切断と融合により融合遺伝子を形成し、キメラRNAを発現する場合である。もう一つは同一染色体内で同じ転写配向を持つ隣接する遺伝子間のread-throughによってキメラRNAを形成する場合である。このようなスプライシングのことをcis-splicing of adjacent genes (cis-SAGe) と呼んでいる。

ACC-Meso-4のRNA-seq解析によって同定されたキメラRNAのうちで他の癌腫で過去に発現の文献報告があったのは、我々が調べた限りでは、DUS4L-BCAP29キメラRNAだけであった。DUS4L-

BCAP29キメラRNAは、他の悪性中皮腫細胞株の5株（ACC-MESO-1、H28、H2052、H2452、HMMME）でも発現が確認された。このキメラRNAもcis-SAGeによって形成されるが、もともとは胃癌と前立腺癌の細胞株や患者の検体において同定されたものであった。実験的にもsoft agar assayで形質転換能が確認され腫瘍原性を有することが報告されていた。一方で、DUS4L-BCAP29キメラRNAは非癌性の組織や細胞においても、癌性の細胞株や組織と同程度に発現していることが明らかになっている。機能獲得アプローチにより、DUS4L-BCAP29の過剰発現は非癌細胞株においても細胞の増殖と運動性を促進することが示されている。悪性中皮腫細胞株の6株において発現が確認されたDUS4L-BCAP29キメラRNAが悪性中皮腫の発癌や進展にどの程度関与しているのかは不明であった。cis-SAGeにより形成されたキメラRNAは非癌性の組織や細胞においても発現していることがあり、癌固有の変異ではない可能性もあるので、注意が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Matsumoto Kensuke、Kakazu Naoki (These two authors contributed equally to this work)、Imataki Osamu、Kondo Akihiro、Kanaji Nobuhiro、Kadowaki Norimitsu	4 . 巻 202
2 . 論文標題 Hairy cell leukaemia with an IGH-BRAF fusion gene	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 British Journal of Haematology	6 . 最初と最後の頁 e67-e70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.18980	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 嘉数直樹
2 . 発表標題 悪性中皮腫における発癌ドライバー遺伝子の候補となりうる融合遺伝子の探索
3 . 学会等名 第97回産業衛生学会
4 . 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------