

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08257

研究課題名(和文)スーパーエンハンサー機能異常を介した悪性ラブドイド腫瘍の分子病態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms of malignant rhabdoid tumors mediated by dysregulation of super-enhancer function.

研究代表者

桑原 康通 (Kawahara, Yasumichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30590327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性ラブドイド腫瘍(MRT)は、SNF5遺伝子の単一変異によって発症するが、DNAのメチル化状況によってTYR、SHH、MYCの3つのsubgroupに分類される。転写因子RUNX1はMYCのエンハンサー領域で結合し発現調節するが、SNF5欠損によりRUNX1の機能が変更され、MYC遺伝子の発現に影響しMYC subgroupが発生すると推察した。MRT細胞株でSNF5とRUNX1を共に発現させると、MYC mRNAとタンパク発現量の低下傾向を認めたが、SNF5、RUNX1単独では影響しなかった。RUNX1はSNF5の存在下でMYC遺伝子の発現を制御する可能性があるが、さらに検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性ラブドイド腫瘍(MRT)は、SNF5遺伝子単独の変異によって発症する腫瘍であるが、DNAのメチル化状況の相違によってMRTはサブグループ化し、腫瘍発症における分子機構には不明な点が多い。SNF5はSWI/SNFクロマチンリモデリング複合体のコアサブユニットであり、この分子を欠損する不完全なSWI/SNF複合体はエンハンサーを介した遺伝子発現制御の異常をもたらす。我々はSWI/SNF複合体が造血系転写因子RUNX1と機能協調することを手がかりに、SNF5欠損によるMYC発現への影響を解明した。MYC subgroupの発生機構にせまる研究であり、MRTの病態解明に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Malignant rhabdoid tumors (MRT) are initiated by a single mutation in the SNF5 gene and are classified into three subgroups, TYR, SHH, and MYC, according to DNA methylation situation. The transcription factor RUNX1 binds to and regulates the expression of MYC on its enhancer region, and we hypothesized that SNF5 deficiency alters the function of RUNX1, affecting the expression of the MYC gene and resulting in the MYC subgroup. Both SNF5 and RUNX1 expression in MRT cell lines showed a trend to decrease MYC mRNA and protein expression, but neither SNF5 nor RUNX1 alone had any effect, suggesting that RUNX1 may regulate MYC gene expression in the presence of SNF5, but further investigation is needed.

研究分野：小児がんにおけるクロマチンリモデリングと転写制御

キーワード：SWI/SNF複合体 RUNX1 SNF5 ラブドイド腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトのクロマチンリモデリング複合体である SWI/SNF 複合体は ATPase サブユニットの BRG1(または BRM)や SNF5/INI1/SMARCB1 (以下、SNF5)、BAF250 など約 10 種類のサブユニットから構成され、これらサブユニットの異常が様々な腫瘍の発生や悪性化に関与する。

悪性ラドイド腫瘍 (malignant rhabdoid tumor : 以下 MRT) は 1 歳未満の乳幼児の主に脳 (Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor; ATRT) や腎臓に発生する予後不良の小児固形腫瘍である。MRT は SNF5 の単独の遺伝子異常 (ただし両アレル異常) で発生すると考えられており、SNF5 遺伝子の機能解析と標的遺伝子群の解析が、MRT の病態解明と有効な治療法の確立に、直接的に貢献すると期待される。

研究者らは、MRT では SWI/SNF 複合体のサブユニットのうち BAF250A (ARID1A)、BAF60B、そして BAF180 の発現が低下し、SNF5 欠損によって、SWI/SNF 複合体が安定性を欠き、不完全な複合体 (以下、SWI/SNF 複合体) へと変化していることを報告した。また、SWI/SNF 複合体は、エンハンサーに対する機能不全を起こす一方で、スーパーエンハンサーに対する機能を保持し、MRT 細胞での遺伝子発現制御のバランスが崩れることが観察されたことから、SWI/SNF 複合体の異常な機能が MRT 病態に関与している可能性が推論された。

一方で、2016 年にドイツ、カナダの各グループから悪性ラドイド腫瘍のうち脳に発生する Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor (ATRT) の臨床検体における DNA メチル化アレイによる解析等から、ATRT は 3 つのサブグループに分類できることが、相次いで報告された。すなわち、MRT は SNF5 の単一遺伝子異常という基盤の上に、MYC 関連遺伝子の発現亢進した MYC subgroup、NOTCH や Gli2 や PTCH2 遺伝子が発現亢進する SHH-Notch subgroup、そして転写因子 MIFT、OTX2 や TYR 遺伝子の活性化が見られる TYR subgroup の 3 グループである。

このように、MRT の発生・病態を解明するための重要な課題として：

- (1) 単一遺伝子異常から subgroup が派生するエピジェネティクス機構の解明
- (2) 各 subgroup における病態解明：SWI/SNF 複合体と転写因子など転写関連因子との関係
- (3) 各 subgroup に対する特異的な新規治療標的の同定と有効性の検証が浮き彫りとなっている状況にある。

このような中、inv16 の異常を有する急性骨髄性白血病において、RUNX1 がスーパーエンハンサーの調節を介して MYC 遺伝子の転写制御に関与し、この RUNX1 の機能は SWI/SNF 複合体によって調節されていることが示された。そこで当研究では、SWI/SNF 複合体が RUNX1 作用へ干渉することによって MYC の発現異常をきたすのではないかという仮説をたてて検討を進めた。

2. 研究の目的

本研究は SNF5 欠損による転写制御機構を明らかにし、MRT における SNF5 単一遺伝子異常という共通の遺伝子異常の役割、subgroup が形成されるメカニズム、そしてプロモーターやエンハンサーでの SWI/SNF 複合体と RUNX1 などの転写因子の機能協調メカニズムを解明し、MRT の腫瘍発生メカニズムと、細胞増殖や細胞維持の機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規 MRT 細胞株の樹立

細胞培養のための腫瘍サンプルは、頸部腫瘍と腹水から採取された。頸部腫瘍と腹水から 2 つの細胞株を樹立し、それぞれ KP-MRT-KS および KP-MRT-KSa と命名した。細胞は、ペニシリン (100 U/ml), ストレプトマイシン (100 µg/ml) および 10% FBS を含む RPMI 1640 で、37 °C, 5% CO₂ の環境で培養した。

(2) トランスフェクション

培養した細胞に Lipofectamine 2000 を用いて RUNX1、SNF5 発現プラスミドをトランスフェクションで導入した。

(3) ウェスタンブロット解析

NP40 緩衝液を用いてタンパクを抽出し、30 µg のタンパク質を 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。抗 SNF5 抗体、抗 RUNX1 抗体、抗 MYC 抗体、抗 α -アクチン抗体を用いて検出した。

(4) DNA 抽出とシーケンス解析

0.5% SDS とプロテイナーゼ K を含む Tris/EDTA/NaCl バッファ (10 mM Tris pH8.0, 10 mM EDTA pH8.0 and 100 mM NaCl) 液に細胞を懸濁し、55 °C で 3 時間インキュベートした後、フェノール抽出によりゲノム DNA を単離した。BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit と ABI PRISM 3500 Sequence Detection System を用いてゲノム DNA のサンガーシーケンシングを行った。DNA メチル化プロファイリングには Illumina HumanMethylation850 Bead Chip アレイを用いて解析した。

(5) RNA 抽出 とリアルタイム PCR による定量

ISOGEN Kit (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて、培養細胞やリンパ球から RNA を抽出した。1 µg RNA に相当する cDNA を作成し、サイバークリーンを用いて RT-PCR によって MYC 遺伝子の発現量を GAPDH 遺伝子をコントロールとして定量した。

4. 研究成果

(1) 新規 MRT 細胞株の樹立と subgroup の決定

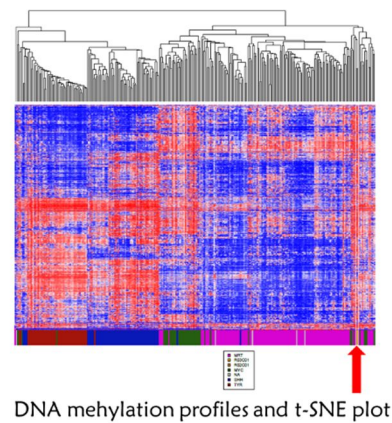
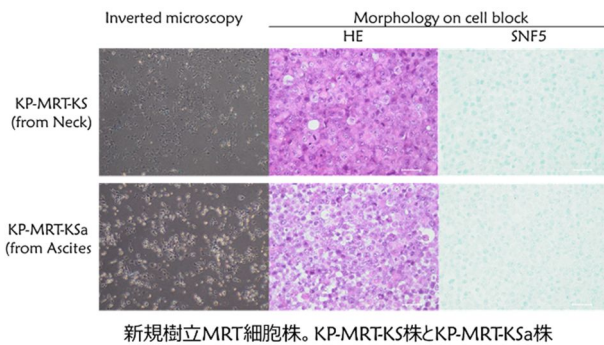
症例は生後7か月の女児。左側頸部腫瘤と、左眼瞼下垂、左眼裂狭小、左瞳孔縮瞳、左流涙低下、左顔面の発汗低下を伴うホルネル症候群、左上肢の麻痺で発症した。CTではC6/7レベルの左椎間孔に腫瘤と連続する軟部影を認め、頭部MRIで小脳虫部に腫瘤を認めた。頸部腫瘤より行った生検の結果、悪性ラブドイド腫瘍(MRT)と診断した。多剤併用化学療法と頸部と頭部腫瘤に対して放射線療法を行った。頭部、頸部の腫瘍は縮小を認めたが、頭部病変に対する放射線治療中に水頭症を発症し、VPシャントを行った。さらに化学療法を継続したが、発症後7か月で、髄膜播種による増悪を認め、発症後9か月で脳幹部に新たな腫瘤性病変の出現と腹水を認め、発症後10か月で永眠された。

本児の頸部腫瘤の生検組織と腹水より2種類の細胞株(KP-MRT-KS、KP-MRT-KSa)を樹立した。細胞株ではSNF5の発現を認めず、SNF5遺伝子の解析の結果、exon2においてc.157

C>T、exon5ではc.551_569dup19のナンセンス変異を認め、両アレルともにSNF5遺伝子が不活化しており、これら新規に樹立したKP-MRT-KS、KP-MRT-KSa細胞株は分子遺伝学的検討からもたしかにMRT細胞株であるものと確定した。

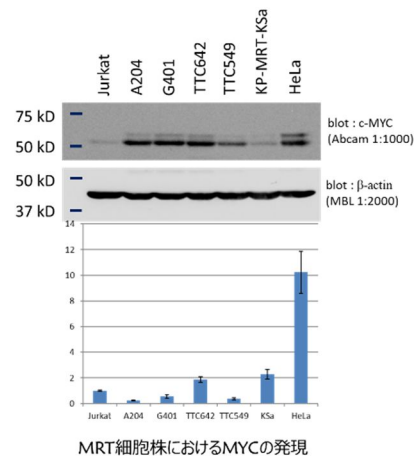
さらにDNAメチレーションアレイによって、この細胞株はともにMYC subgroupに合致することを同定した。また、手持ちの他のMRT細胞株であるA204、G401、TTC642、そしてTTC549はDNAメチル化アレイ解析によっていずれもMYC subgroupに分類され、今回樹立した新規の細胞株を含めすべてMYC subgroupに分類されたことから、この後の実験はMYC subgroupに関して解析することとした。

(2) MYCの発現の検討



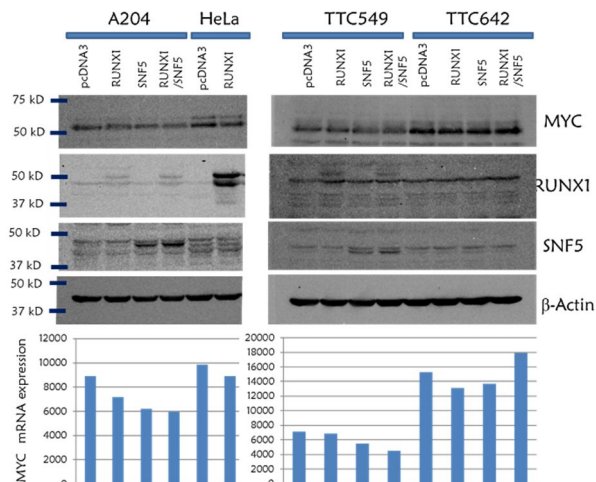
DNA methylation profiles and t-SNE plot

これらの細胞株における MYC の発現を定量したところ、A204、G401、TTC642、TTC549 の MYC の mRNA 発現とタンパクの発現は相関することを確認した。しかし、KP-MRT-KSa 細胞については MYC の mRNA の発現とタンパクの発現量は相関しなかった。そこで、A204、G401、TTC642、TTC549 を用いて解析をすすめることとした。また、これらの MRT 細胞株では RUNX1 の発現が、mRNA レベルとタンパク発現の双方で認められないことを確認した。



(3) MYC 遺伝子発現への RUNX1 の影響の検討

MRT 細胞株において SNF5 の発現や RUNX1 の発現によって MYC 遺伝子の発現に影響があるのかどうかを検討した。まず、A204 細胞に SNF5、RUNX1 またはその両方をトランスフェクションによって導入し、MYC の mRNA の変化を定量的 PCR 法によって、MYC のタンパク量の変化についてはウエスタンブロット法を用いて確認した。結果、SNF5 と RUNX1 の両方の遺伝子を導入した群でわずかに MYC



mRNA とタンパク発現量の低下傾向を認めたが、SNF5、RUNX1 単独では MYC 遺伝子の発現に影響は認めなかった。しかし、その効果は小さなものであり、重ねて TTC549 や TTC642 細胞、HeLa 細胞でも追加検討したが、MYC 遺伝子への効果は確認できなかった。

そこで、これら MRT 細胞株への遺伝子導入効率について検討したところ、導入効率は A204 で 60%程度、その他の細胞では 30%未満であったことから、遺伝子導入効率の影響によって、結果が影響を受けている可能性が考えられた。現在、遺伝子導入法を一過性発現手法から Tet-on システムへと変更を行い、また、SNF5 の影響を検討する目的で、HeLa 細胞株で SNF5 を CRISPR-Cas9 を用いてノックアウトした細胞の樹立を試みて確認実験を進めている。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasumichi Kuwahara, Tomoko Iehara, Eisuke Ichise, Yoshiki Katsumi, Kazutaka Ouchi, Kunihiko Tsuchiya, Mitsuru Miyachi, Eiichi Konishi, Hiroyasu Sasajima, Satoaki Nakamura, Shige-hisa Fumino, Tatsuro Tajiri, Pascal D Johann, Michael Fruhwald, Tsukasa Okuda, Hajime Hosoi	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel Two MRT Cell Lines Established from Multiple Sites of a Synchronous MRT Patient	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6159-6170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14636	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 該当する

〔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 Yasumichi Kuwahara, Tomoko Iehara, Yoshiki Katsumi, Kunihiko Tsuchiya, Mitsuru Miyachi, Tatsuro Tajiri, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda, Hajime Hosoi
2. 発表標題 Two New MRT Cell Lines Established from Multiple Sites of a Synchronous MRT with a Unique DNA Methylation Pattern.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	奥田 司 (Okuda Tsukasa) (30291587)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授 (24303)	

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