

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09612

研究課題名(和文) 唾液腺発癌におけるEWSR1-ATF1融合遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis on the EWSR1-ATF1 fusion gene in salivary gland carcinogenesis

研究代表者

折館 伸彦 (ORIDATE, Nobuhiko)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：90312355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺癌は頭頸部癌のうち3-5%を占め、多彩な組織型を示すが、発癌過程における融合遺伝子の機能は明らかでない。唾液腺に生じる硝子化明細胞癌では、12番染色体と22番染色体の転座による融合遺伝子EWSR1-ATF1が93%の症例にみられるとの報告があるため、融合遺伝子産物が異常な転写活性を有し発癌を誘発することが想定される。本課題の目的は唾液腺における硝子化明細胞癌の発生に関するEWSR1-ATF1の役割の解明である。CreloxPシステムによって唾液腺特異的にEWSR1-ATF1を発現し、他部位では当該融合遺伝子を発現しない条件特異的遺伝子改変マウスを作製し、現在表現形質の解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単一の遺伝子変異がドライバー変異となる癌が存在することが明らかとなっており、これまでの発生臓器・病理形態分類とは別に、ゲノム情報による分子分類も現実になりつつある。染色体転座による融合遺伝子もドライバー変異の中のひとつと考えられている。悪性腫瘍の原因として融合遺伝子が挙げられるが、遺伝子解析法の進歩により肉腫、肺癌などの固形腫瘍でも新しい融合遺伝子が見出されている。頭頸部領域では、唾液腺癌で複数の融合遺伝子が報告されているが、その発癌過程における融合遺伝子の機能は不明であり、EWSR1-ATF1発現細胞における当該融合遺伝子の機能を明らかにし、新しい治療標的を見出すことに学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Salivary gland cancer accounts for 3-5% of head and neck cancers and shows various histological types, but the function of fusion genes in the carcinogenesis process is unclear. It has been reported that the fusion gene EWSR1-ATF1, which is a result of translocation of chromosomes 12 and 22, is found in 93% of cases of hyalinizing clear cell carcinoma occurring in the salivary gland. Therefore, it is assumed that the fusion gene product has abnormal transcriptional activity and induces carcinogenesis. The purpose of this project is to elucidate the role of EWSR1-ATF1 in the development of hyalinizing clear cell carcinoma in the salivary gland. We have created condition-specific genetically modified mice that express EWSR1-ATF1 specifically in the salivary gland and do not express the fusion gene in other parts of the body using the CreloxP system, and are currently analyzing their phenotypes.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：融合遺伝子 頭頸部癌 唾液腺癌 発癌 条件特異的遺伝子改変マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

単一の遺伝子変異がドライバー変異となる癌が存在することが明らかとなっており、これまでの発生臓器・病理形態分類とは別に、ゲノム情報による分子分類も現実になりつつある。染色体転座による融合遺伝子もドライバー変異の中のひとつと考えられている。造血器腫瘍の原因として融合遺伝子はよく知られており、代表例はPh染色体 (BCR-ABL融合遺伝子) で、慢性骨髄性白血病の95%に認められる。遺伝子解析法の進歩により肉腫、肺癌などの固形腫瘍でも新しい融合遺伝子が見出されており、新しい治療ターゲットとして注目されている。頭頸部領域においては、唾液腺癌で複数の融合遺伝子が報告されている。唾液腺癌は頭頸部癌のうち3-5%を占め、多彩な組織型を示すが、それぞれの組織型の症例数は限られているため、発癌過程における融合遺伝子の機能に関する研究は進んでいない。唾液腺に生じる硝子化明細胞癌では、12番染色体と22番染色体の転座による融合遺伝子EWSR1-ATF1が93%の症例にみられるとの報告があるため、融合遺伝子産物が異常な転写活性を有し発癌を誘発することが想定される。

明細胞肉腫における先行研究として、Tet-on systemで全身にEWSR1-ATF1を発現させたモデルマウスでは軟部組織に腫瘍形成が認められた報告がある (K Yamada et al. J Clin Invest. 123, 600-610, 2013)。当該軟部組織腫瘍の起源は神経堤由来と考えられたが、3ヶ月の観察期間では他部位には明らかな腫瘍形成は見られなかった。形成した腫瘍から樹立した肉腫細胞株をヌードマウスに皮下移植したところ、Dox投与では腫瘍形成し、Dox非投与では形成せず、腫瘍形成にDoxによる本融合遺伝子の遺伝子発現誘導が不可欠との結果が示された。DNAマイクロアレイによる肉腫細胞株の本融合遺伝子発現前後のパターンの比較から、Fosの発現量が著明に増加し、ChIP-qPCRによってEWSR1-ATF1がFosプロモーター上のCREに結合し転写が活性化されていることが示されている。本モデルマウスで唾液腺に硝子化明細胞癌を形成しなかった理由を考察すると以下の3点が考えられる。

- (1) 唾液腺硝子化明細胞癌症例 (EWSR1 exon11-ATF1 exon3) と明細胞肉腫 (EWSR1 exon8-ATF1 exon4, EWSR1 exon7-ATF1 exon5) とでは、break pointの違いが認められ、融合遺伝子産物の機能に違いがあり、例えばDNA結合部位が変化する、高次構造が変化する、RNA結合能が残る、転写因子複合体の構成が変化する、などが発生する癌腫の差という表現型の違いとなる可能性
- (2) 唾液腺の腫瘍形成に3ヶ月以上の時間が必要
- (3) 硝子化明細胞癌発生には、融合遺伝子の他に何らかの遺伝子変異が必要

以上から、全身に融合遺伝子を発現させる遺伝子改変マウスではなく、Cre-loxpシステムによって唾液腺特異的にEWSR1-ATF1を発現させる方法を想起した。

2. 研究の目的

- (1) 唾液腺に生じる硝子化明細胞癌では、12番染色体と22番染色体の転座による融合遺伝子

EWSR1-ATF1が93%の症例にみられるとの報告があるため、融合遺伝子産物が異常な転写活性を有することが想定される。EWSR1蛋白質はRNA結合蛋白質でRNA polymeraseと結合し、RNAのプロセシングに関与するとされる。EWSR1はATF1以外にも融合パートナーを複数有しており、唾液腺腫瘍以外ではEWSR1-WT1, EWSR1-NR4A3, EWSR1-ZNF444, EWSR1-PBX1, EWSR1-POU5F1, EWSR1-ETS (FLI1, ERG, ETV, E1AF, FEVなど) 等の報告があり、多様な腫瘍形成メカニズムが想定されるものの、硝子化明細胞癌の発生におけるEWSR1-ATF1の役割に関しては解明されておらず、その機能を明らかにすることが本研究課題の学術的「問い」となる。

(2) 本研究の目的は、唾液腺硝子化明細胞癌の発生においてEWSR1-ATF1がドライバー変異である蓋然性が高いと考え、EWSR1-ATF1を発現するマウスとEWSR1-ATF1を発現する細胞を作製し、その機能を解析することである。

EWSR1-ATF1は明細胞肉腫の原因と考えられており、全身に同遺伝子を発現させると唾液腺腫瘍以外に肉腫を形成する可能性があるため、コンディショナルCre-loxpシステムを用い、ROSA26遺伝子座内にCreリコンビナーゼ標的配列loxPで挟まれたEWSR1-ATF1を有するマウスと唾液腺特異的CreマウスであるMMTV-Creマウス、Iama-Creマウスと交配させることで、唾液腺特異的にEWSR1-ATF1を発現する遺伝子改変マウスを作製し、唾液腺における腫瘍形成能を確認することによって、本研究課題の学術的独自性を保証する。

さらに、ヒト胎児腎細胞HEK293A細胞と唾液腺扁平上皮癌A253細胞にDoxycyclin依存性に遺伝子を発現するTet-onシステムとともにEWSR1-ATF1を導入し、表現型の変化についての検証や、ChIP-seq、ATAC-seq、RNA-seqといったNGS解析を用いて融合転写因子の結合部位の変化や発現変動の解析に発展させることによって、本研究課題の創造性を担保する。

(3) EWSR1蛋白質はRNA結合蛋白質でRNA polymeraseと結合し、RNAのプロセシングに関与するとされる。唾液腺硝子化明細胞癌において認められる融合パートナーATF1は、CREBファミリーの転写因子のひとつであり、cAMPやCaイオンの上昇を核内に伝達する役割を担っている。しかしながら、両者の融合遺伝子であるEWSR1-ATF1の発癌過程における役割は未だ解明されていない。まず、

唾液腺特異的にEWSR1-ATF1を発現する遺伝子改変マウスを作製し、組織学的・生化学的解析を行い、腫瘍形成能について明らかにする。次いで、Doxycyclin依存性に遺伝子を発現するTet-onシステム細胞を用いてEWSR1-ATF1遺伝子産物の結合部位と下流遺伝子を同定することによって、唾液腺におけるEWSR1-ATF1のドライバー変異としての機能を解明する。

3. 研究の方法

研究代表者は、平成30年度～令和2年度の基盤研究において、BHD症候群の責任遺伝子FLCNの唾液腺特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製し、本ノックアウトマウスに自然発生した唾液腺腫瘍の組織学的検討について報告した (Isono Y, Oridate N, et al, Biochem Biophys Res Commun 522: 931-938, 2020)。

本研究課題で対象とするEWSR1-ATF1をTet-on systemを用いて全身に発現させたモデルマウスでは軟部組織に腫瘍形成が認められた報告がある(K Yamada et al. J Clin Invest. 123, 600-

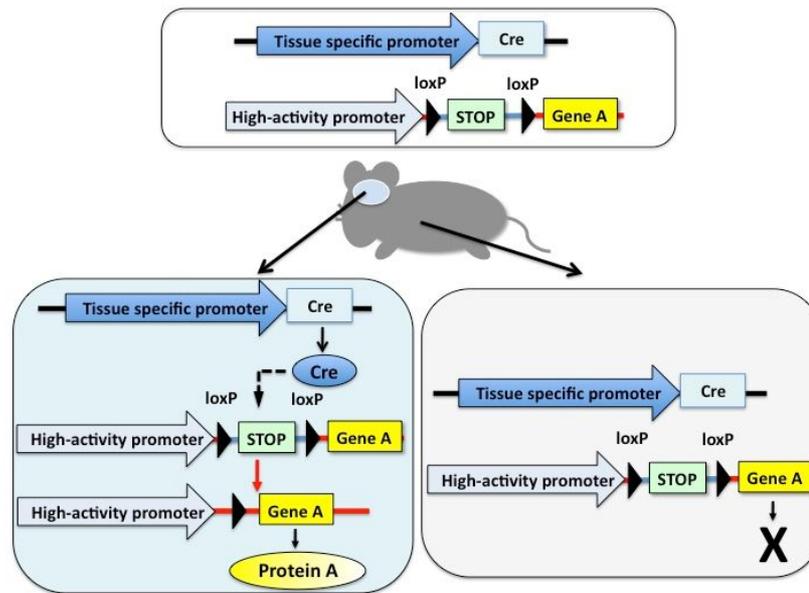
610, 2013)が、3ヶ月の観察期間では唾液腺を含め、他部位には明らかな腫瘍形成は見られなかった。唾液腺における硝子化明細胞癌の発生に関するEWSR1-ATF1の役割を解明するには唾液腺特異的にEWSR1-ATF1を発現し、他部位では当該融合遺伝子を発現しない条件特異的(コンディショナル)遺伝子改変マウスを作製することが理想である。

コンディショナルCre-loxpシステムによる条件特異性の賦与は、組織特異的プロモーターの下流にCreリコンビナーゼ遺伝子をつけた外来遺伝子(MMTV-Cre、Iama-Cre)、高発現が期待できるプロモーター下流に2つのloxP配列に挟まれた転写停止配列、さらにその下流に目的の遺伝子をつなげた外来遺伝子(EWSR1-ATF1)を導入することによる。このシステム下では、組織特異的プロモーターが働く部位ではCreの働きでloxP配列間の転写停止配列が欠損し、その下流に位置する目的遺伝子が高発現する。一方、組織特異的プロモーターが作動しない部位ではCreが働かないため転写停止配列が機能して目的の遺伝子は発現しない。また転写因子ATF1のみを唾液腺特異的に発現する唾液腺特異的ATF1発現マウスを作成し、EWSR1-ATF1融合遺伝子発現マウスとの比較検討を行う。

4. 研究成果：唾液腺特異的遺伝子改変マウスの作製

唾液腺癌は頭頸部癌のうち3-5%を占め、多彩な組織型を示すが、発癌過程における融合遺伝子の機能は明らかでない。唾液腺に生じる硝子化明細胞癌では、12番染色体と22番染色体の転座による融合遺伝子EWSR1-ATF1が93%の症例にみられるとの報告があるため、融合遺伝子産物が異常な転写活性を有し発癌を誘発することが想定される。本課題の目的は唾液腺における硝子化明細胞癌の発生に関するEWSR1-ATF1の役割の解明である。Cre-loxpシステムによって唾液腺特異的にEWSR1-ATF1を発現し、他部位では当該融合遺伝子を発現しない条件特異的遺伝子改変マウスを作製し、現在表現形質の解析中である。

コンディショナル遺伝子改変マウスの作製



単一の遺伝子変異がドライバー変異となる癌が存在することが明らかとなっており、これまでの発生臓器・病理形態分類とは別に、ゲノム情報による分子分類も現実になりつつある。染色体転座による融合遺伝子もドライバー変異の中のひとつと考えられている。悪性腫瘍の原因として融合遺伝子が挙げられるが、遺伝子解析法の進歩により肉腫、肺癌などの固形腫瘍でも新しい融合遺伝子が見出されている。頭頸部領域では、唾液腺癌で複数の融合遺伝子が報告されているが、その発癌過程における融合遺伝子の機能は不明であり、EWSR1-ATF1発現細胞における当該融合遺伝子の機能を明らかにし、新しい治療標的を見出すことに学術的意義がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aizawa Yoshihiro, Takada Kentaro, Aoyama Jun, Sano Daisuke, Taniguchi Hideki, Oridate Nobuhiko	4. 巻 46
2. 論文標題 Establishment of experimental salivary gland cancer models using organoid culture and patient-derived xenografting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 409 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13402-022-00758-6	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 Takahashi Shunji, Oridate Nobuhiko, Tahara Makato	4. 巻 27
2. 論文標題 First-line pembrolizumab ± chemotherapy for recurrent/metastatic head and neck cancer: Japanese subgroup of KEYNOTE-048	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1805 ~ 1817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-022-02233-6	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 Nakayama Meijin, Wada Takashi, Isono Yasuhiro, Sano Daisuke, Nishimura Goshi, Oridate Nobuhiko, Holsinger F. Christopher, Orosco Ryan	4. 巻 50
2. 論文標題 Narrow-field supracricoid partial laryngectomy: Procedure development and initial clinical experiences	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 403 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2022.09.011	査読の有無 無
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 OKADA TAKURO, MATSUKI TAKASHI, FUSHIMI CHIHIRO, OKAMOTO ISAKU, SATO HIROKI, KONDO TAKAHITO, TOKASHIKI KUNIHICO, ITO TATSUYA, MASUBUCHI TATSUO, TADA YUICHIRO, MIURA KOUKI, HANYU KENJI, OMURA GO, TAKAHASHI HIDEKI, YAMASHITA TAKU, ORIDATE NOBUHICO, TSUKAHARA KIYOAKI	4. 巻 42
2. 論文標題 Nivolumab for Platinum-refractory and -sensitive Recurrent and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4907 ~ 4912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15996	査読の有無 無
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 SANO DAISUKE, TOKUHISA MOTOHIKO, TAKAHASHI HIDEAKI, HATANO TAKASHI, NISHIMURA GOSHI, ICHIKAWA YASUSHI, ORIDATE NOBUHIKO	4. 巻 42
2. 論文標題 Real-world Therapeutic Outcomes of the Pembrolizumab Regimen as First-line Therapy for Recurrent/Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Single-center Retrospective Cohort Study in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4477 ~ 4484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15948	査読の有無 無
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 Sano Daisuke, Shimizu Akira, Tateya Ichiro, Fujiwara Kazunori, Kishimoto Yo, Maruo Takashi, Fujimoto Yasushi, Mori Terushige, Kato Hisayuki, Tsukahara Kiyooki, Oridate Nobuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Current Status of Transoral Surgery for Patients With Early-Stage Pharyngeal and Laryngeal Cancers in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 804933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2021.804933	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0件

〔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	蓮見 壽史 (Hasumi Hisashi) (40749876)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	

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