

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590464

研究課題名(和文) 中皮腫における新規原因遺伝子の同定と発癌機構の解明

研究課題名(英文) Identification of novel causative genes in mesothelioma and the elucidation of the carcinogenic mechanism

研究代表者

嘉数 直樹 (Kakazu, Naoki)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：20264757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：中皮腫はアスベストの曝露から生じる予後不良な腫瘍である。我々は、中皮腫の発生に関与する新規の融合遺伝子候補を同定するために、中皮腫細胞を次世代シーケンサーにより解析した。最初に、中皮腫細胞株を対象に全トランスクリプトームショットガンシーケンスを行い、多数の融合転写産物を網羅的に検出した。次に、これら検出された融合転写産物の発現の有無を確認するために、他に5つの中皮腫細胞株も加えてRT-PCRを行い、候補を絞り込んだ。その結果、2つの融合遺伝子(DUS4L-BCAP29、PDPN-PRDM2)が中皮腫の病態に関連した有力な候補であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mesothelioma is a poor prognosis tumor due to former exposure to asbestos. We analyzed mesothelioma cells by next generation sequencing to identify novel candidate fusion genes associated with the development of mesothelioma. Firstly, we performed whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-Seq) of a mesothelioma cell line and comprehensively detected many fusion transcripts. Secondly, we performed RT-PCR in the cell line and the other five to confirm the presence of these detected fusion transcripts, and narrowed down the candidate fusion genes. These results suggest that two fusion genes (DUS4L-BCAP29, PDPN-PRDM2) are the potential candidates implicated in the pathogenesis of mesothelioma in this study.

研究分野：細胞遺伝学、分子生物学

キーワード：中皮腫 融合転写産物

1. 研究開始当初の背景

(1) 中皮腫の現状

世界各国で中皮腫患者は急増しており、我が国に限っても 2040 年までに累計 10 万人以上の患者が死亡すると予測されている (Robinson BW & Lake RA, 2005)。加えて、最近においても、中皮腫の診断からの生存期間中央値は 1 年未満との推計があり、予後は極めて不良である。

近年、様々な固形腫瘍において、原因となるだけでなく、治療の分子標的にもなりうる遺伝子変異が続々と明らかになってきている。しかしながら、中皮腫については世界的に患者数が増加しているにもかかわらず、過去の研究からは原因となるような遺伝子変異はまだほとんど同定されておらず、有効な分子標的治療法も確立されていない。それだけに中皮腫の基礎研究と臨床研究の両面にわたる進展への社会的ニーズは高い。

(2) 固形腫瘍におけるドライバー遺伝子変異としての融合遺伝子

腫瘍細胞においては多種多様な遺伝子変異が認められるが、そのうちで癌の発生に直接関わり、癌細胞の生存・増殖に不可欠な変異のことを、ドライバー遺伝子変異と呼ぶことが多くなった。

一方、腫瘍細胞にはゲノム不安定性により二次的に発生したと考えられる遺伝子変異も多いが、それらはパッセンジャー遺伝子変異と称されている。ドライバー遺伝子変異は発癌に本質的に関わるだけでなく、有効な薬物治療の分子標的となりうる点からも重要である。

造血器腫瘍においては、ドライバー遺伝子変異の多くは融合遺伝子として染色体転座の転座切断点上から同定され、その後の発癌機構の解明に大きく寄与した。近年は、肺癌や前立腺癌等の固形腫瘍においても、ドライ

バー遺伝子変異が融合遺伝子であることが続々と明らかになってきた。こうした融合遺伝子 (以後、ドライバー融合遺伝子と呼ぶ) の発見をブレイクスルーに発癌経路が解明され、分子標的治療薬の開発へとつながる例も増えている。実際に、特定のドライバー融合遺伝子を対象に保険適用済みや治験中である分子標的治療薬としてそれぞれ、ALK 融合陽性肺癌での Crizotinib、RET 融合陽性肺癌での Vandetanib が挙げられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、中皮腫において新規のドライバー融合遺伝子候補を同定することである。加えて、同定したドライバー融合遺伝子候補による発癌経路を明らかにし、既存の阻害剤の中からその経路をブロックし、中皮腫細胞の増殖を抑制する分子標的治療薬候補を見出すことも目的とする。

新規のドライバー融合遺伝子候補を同定することで、中皮腫発生の分子機構の一端に迫る。

3. 研究の方法

我々は中皮腫の原因遺伝子候補となるような融合遺伝子を同定する目的で、先行研究において中皮腫細胞株 ACC-MESO-4 に認められた 3 番と 7 番染色体間の染色体転座の切断点を手がかりに fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 解析等で融合遺伝子を同定する研究を進めてきた。その結果、DNA トポイソメラーゼ (*TOP2B*) 遺伝子が切断点上に局在していることを明らかにした。さらに、Southern blot 解析によっても 3 番と 7 番染色体間の融合遺伝子によると思われる *TOP2B* 遺伝子の再構成を検出できた。しかしながら、FISH 法では、その他の候補融合遺伝子の探索に時間を要し、また、通常の染色体

解析レベルでは検出できないような微細な染色体転座や欠失によって形成された融合遺伝子は、探索が困難である欠点があった。

そこで、平成 24 年度から網羅的に融合転写産物候補を探索できるシーケンス技術 whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-Seq) 法を導入した。本研究におけるその具体的な方法は以下の通りである。

ACC-MESO-4 より cDNA ライブラリーを作製し、次世代シーケンサー (HiSeq 2000) による RNA-Seq 解析を行った。得られた paired-end read 配列のペアそれぞれを cDNA 及びヒトゲノムのリファレンス配列にアライメントし、ペア配列がお互いに異なる遺伝子の一部と一致するものを選択した。次にこれら異なる遺伝子が融合する箇所 (切断点) にまたがってアライメントされるリードを探索し、そのゲノム上における mapping と切断点を決定した。こうして網羅的に同定した多数の融合遺伝子候補について融合遺伝子検出ソフトウェア (deFuse version 0.5.0) のアルゴリズムを用いて、陽性が偽陽性かを判定した。そして、偽陽性の可能性が高いと判断された融合遺伝子候補は最初の段階で除外し、絞り込んだ候補についてそれぞれ、ACC-MESO-4 やそれ以外の中皮腫細胞株 5 株 (ACC-MESO-1、NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452、HMMME) における発現の有無を検証するため、RT-PCR 解析を行った。プライマーについては、paired-end read のシーケンスデータを基にして切断点を挟み込むように設定した。また、正常組織由来の total RNA 上では検出されないことも、同じく RT-PCR で念のために検証した。

さらに、過去の研究において同一の融合遺伝子が他の種類の癌で同定されていないか、あるいは、その融合遺伝子の予想される機能等も考慮して、最終候補を絞り込んでいった。

4. 研究成果

RNA-seq 解析によって ACC-MESO-4 を解析した結果、予想外であったが、3,437 もの融合転写産物が検出された。そのほとんどは、融合が真の陽性である確率 (probability) が 0.5 未満で偽陽性と判断された。残った融合転写産物について、RT-PCR で改めて ACC-MESO-4 での発現の有無を検証した。その結果、確認ができた融合転写産物は 60 に絞られた。

それらの中から、最終的には *DUS4L-BCAP29*、*PDPN-PRDM2* が有力な融合転写産物候補として絞られた。これらは、正常組織由来の total RNA では検出されないことも確認した。

DUS4L-BCAP29 融合転写産物は複数の胃癌臨床検体においても検出されており、実験的に soft agar assay で形質転換能を有することが報告されている (Kim HP, et al., 2014)。なお、同転写産物は RT-PCR で ACC-MESO-4 以外の中皮腫細胞株 5 株 (ACC-MESO-1、NCI-H28、NCI-H2052、NCI-H2452、HMMME) 全てにおいて発現が確認できた。

PDPN は ACC-MESO-4 も含めた中皮腫の細胞株や臨床組織検体において高率に過剰発現していることが報告され、診断マーカーにもなっている。また、PDPN が過剰発現している細胞株では、抗 PDPN 抗体 (NZ-1) が *in vitro* で中皮腫細胞の増殖を抑制する効果があることも報告されている (Abe S, et al., 2013)。

PDPN が過剰発現している ACC-MESO-4 では、*PDPN-PRDM2* 融合により PDPN の転写が恒常的に活性化されている可能性も考えられる。また、こうした *PDPN* 融合遺伝子を有する細胞株では、分子標的治療薬候補としての抗 PDPN 抗体の抗腫瘍効果も期待される

今回同定した 2 種類の融合転写産物は中皮腫の発生機構に本質的に関与している可能性が示唆された。

<引用文献>

Robinson BW & Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. N Engl J Med 353: 1591-1603, 2005.

Kim HP, Cho GA, Han SW, Shin JY, Jeong EG, Song SH, Lee WC, Lee KH, Bang D, Seo JS, Kim JI, Kim TY. Novel fusion transcripts in human gastric cancer revealed by transcriptome analysis. Oncogene 33: 5434-5441, 2014.

Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. J Immunol 190: 6239-6249, 2013.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kakazu N, Yamane H, Miyachi M, Shiwaku K, Hosoi H. Identification of the 12q15 amplicon within the homogeneously staining regions in the embryonal rhabdomyosarcoma cell line RMS-YM. Cytogenet Genome Research 142: 167-173, 2014. 査読有

DOI: 10.1159/000357930

Yoshida H, Miyachi M, Sakamoto K, Ouchi K, Yagyu S, Kikuchi K, Kuwahara Y, Tsuchiya K, Imamura T, Iehara T, Kakazu N, Hojo H, Hosoi H. PAX3-NCOA2 fusion gene plays a dual role in promoting the proliferation and inhibiting the myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells. Oncogene 33:

5601-5608, 2014. 査読有

DOI: 10.1038/onc.2013.491

〔学会発表〕(計2件)

嘉数直樹、山根史嗣. 次世代シーケンサーによる悪性中皮腫における融合転写産物の網羅的同定. 日本衛生学会学術総会、ホテルアバローム紀の国(和歌山市)、2015年3月27日

Yoshida H, Miyachi M, Sakamoto K, Ouchi K, Yagyu S, Kikuchi K, Kuwahara Y, Tsuchiya K, Imamura T, Iehara T, Kakazu N, Hojo H, Hosoi H: Deciphering the mechanism of PAX3-NCOA2 tumorigenesis in rhabdomyosarcoma. Connective Tissue Oncology Society 2014 annual meeting, Oct 16 2014, Berlin, Germany

6 . 研究組織

(1)研究代表者

嘉数 直樹 (KAKAZU, Naoki)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号: 20264757