

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461978

研究課題名(和文) 乳癌におけるChromothripsis変異を標的にした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel treatment for chromothripsis in breast cancer

研究代表者

角田 伸行 (Tsunoda, Nobuyuki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：40542684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌、骨腫瘍などの細胞株ではChromothripsisの発生頻度が低いと考えられた。乳癌、大腸癌、膵癌の細胞株での抗癌剤によるChromothripsis誘導に関しても、Chromothripsisの同定はできなかった。Chromothripsisと同様な遺伝子変異である融合遺伝子の探索によりノンコーディングRNAであるLOC642236とLOC283788からなる融合遺伝子など複数の融合遺伝子を同定した。融合遺伝子はChromothripsis同様に正常細胞には存在せず、分子標的治療の標的として適切である。これらの融合遺伝子を標的にした新たなコンセプトの癌治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chromothripsis has not been identified in breast cancer and bone tumor cell lines. Anti-cancer agents are not able to induce chromothripsis in cancer cell lines, including breast, colorectal and pancreatic cancer cell lines. Fusion genes are a genetic variation similar to chromothripsis. We identified several fusion genes, including two non-coding RNAs (LOC642236 and LOC283788). Because there are no fusion genes in normal cells, fusion genes are an appropriate target for molecular targeted therapy; therefore, novel treatment therapies involving the above fusion genes are expected in the future.

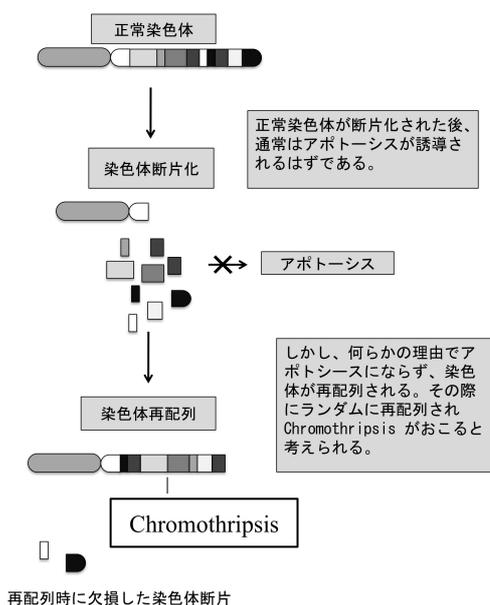
研究分野：外科学

キーワード：Chromothripsis

1. 研究開始当初の背景

発癌機構に関してこれまで多くの発癌モデルが考えられており、主なものとして1988年にVogelsteinが提唱した腺腫が突然変異により悪性化して癌になる adenoma-carcinoma sequence 説や Knudson が提唱した両親から受け継いだ2つの癌抑制遺伝子が2つとも突然変異をおこして癌になるという two hit theory 説がある。これらの発癌モデルで共通している点が2つある。1つは正常細胞に生じた突然変異により癌が生じること、もう1つは正常細胞に時間経過と共に突然変異が蓄積し正常機能の逸脱の結果、癌細胞になるということである。これまで細胞内での突然変異はある一定の頻度で、ランダムに1領域にのみおこると考えられていたが、最近の分子生物学の進歩により新たに Chromothripsis の存在が明らかになった (Forment JV. Nat Rev Cancer. 2012)。Chromothripsis は1から数本の染色体の限局した領域で、一度バラバラになった何十、何百の染色体断片が無秩序に繋がり染色体再配列をしたものとして同定された(図1)。

図1



Chromothripsis の原因として染色体凝集異常やテロメアの消耗異常が考えられているが、その発生機序の解明は十分にすすんでいない。

本研究では Chromothripsis の変異中の癌化に重要な変異を同定し、その変異に対する siRNA の開発および機能解析により癌に対する新規治療法の開発を行う。

2. 研究の目的

Chromothripsis は1から数本の染色体の限局した領域で何十、何百の染色体断片が無秩序に配列したものである。Chromothripsis は新しい概念であり、その発生機序や機能の解明は十分にすすんでいない。本研究では Chromothripsis の同定および Chromothripsis による変異の癌化への影響を検討し、そのメカニズムを解明する。また Chromothripsis 変異に対する siRNA を開発し、機能解析を行い、癌に対する新規治療法を開発する。

3. 研究の方法

【ヒト由来乳癌細胞株における

Chromothripsisの探索】

乳癌細胞株MCF7、MDA-MB-231の培養を行なった。MCF7、MDA-MB-231における Chromothripsisの探索をシーケンサーにておこなった。

【骨腫瘍由来細胞株における

Chromothripsisの探索】

乳癌ではChromothripsisの発生頻度の低く同定できなかったため、発生頻度が高く、4分の1の細胞でChromothripsisが存在すると報告されている骨腫瘍由来細胞株HuO-3N1、HuO-9N2、HT-1080の培養を行なった。HT-1080におけるChromothripsisの探索をシーケンサーにておこなった。

【抗癌剤投与によるChromothripsisの誘導】

Chromothripsisはアポトーシスが誘導されずに生じた染色体のランダムな再配列が原因の1つと考えられている。Chromothripsisを発生させるために高濃度の抗癌剤を短期間で投与した乳癌細胞株MCF7、MDA-MB-231の培養を行なった。

乳癌細胞株MCF7、MDA-MB-231に対して5FUを1、5、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ で投与を行い、24時間培養後に抗癌剤を含まない培養液に変更し継続培養した。これらの細胞株での生存した細胞に関してChromothripsisの探索をシーケンサーにておこなった。

大腸癌細胞株DLD1および膵癌細胞株KLM1、Panc1について5FUを10、100、500、1000 $\mu\text{g/ml}$ で投与を行い、24時間培養後に抗癌剤を含まない培養液に変更し継続培養し、生存した細胞に関してChromothripsisの探索をシーケンサーにておこなった。

また同様の実験をシスプラチンにても行った。

【癌細胞株における融合遺伝子の探索】

Chromothripsisは、正常細胞には存在していないと考えられ、Chromothripsisの変異は分子標的治療の標的として適切である。しかし、Chromothripsisの同定が困難であったため、Chromothripsis同様に遺伝子変異である融合遺伝子の探索を次世代シーケンサーにて行なった。

4. 研究成果

【ヒト由来乳癌細胞株における

Chromothripsisの探索】

乳癌細胞株MCF7、MDA-MB-231においてChromothripsisの同定ができなかった。乳癌ではChromothripsisの発生頻度の低いことが考えられた。

【骨腫瘍由来細胞株における

Chromothripsisの探索】

骨腫瘍由来細胞株Hu0-3N1、Hu0-9N2 HT-1080においてChromothripsisの同定はできな

かった。癌細胞株は不死化された癌細胞であり、Chromothripsisの発生頻度の低いことが考えられた。

【抗癌剤投与によるChromothripsisの誘導】

乳癌細胞株MCF7、MDA-MB-231は5FU濃度が10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ では生存できなかった。5FU濃度が1、5 $\mu\text{g/ml}$ で生存した細胞に関してChromothripsisの検討を行なったが、Chromothripsisの同定ができなかった。

大腸癌細胞株DLD1は5FU濃度が10、50 $\mu\text{g/ml}$ で生存した細胞に関してChromothripsisの検討を行なったが、Chromothripsisの同定ができなかった。

膵癌細胞株KLM1、Panc1は5FU濃度が500、1000 $\mu\text{g/ml}$ 以上では細胞が生存できず、10、100 $\mu\text{g/ml}$ で軽度増殖が抑制されていた(図2)(図3)。

図2

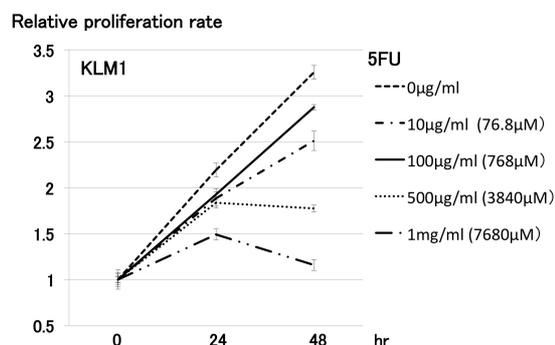
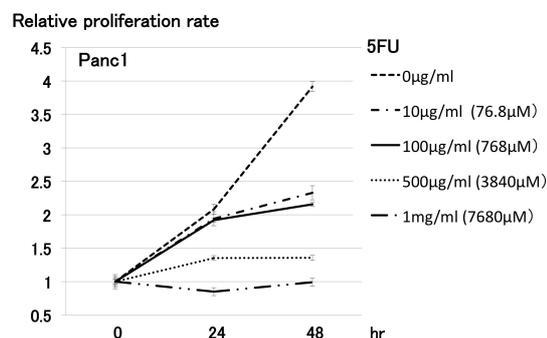


図3



5FU濃度が10、100 $\mu\text{g/ml}$ で生存していた膵癌細胞株KLM1、Panc1の細胞に関してChromothripsisの検討を行なったが、Chromothripsisの同定ができなかった。

大腸癌細胞株DLD1、膵癌細胞株KLM1にシスラチンにて行ったChromothripsisの同定ができなかった。

【癌細胞株における融合遺伝子の探索】

融合遺伝子の探索の探索を行ない、複数の融合遺伝子を同定した。これらの中には融合タンパクを合成するZNF839とCYP4V2からなる融合遺伝子やJAK1とTERF2からなる融合遺伝子、また融合タンパクを合成しないノンコーディングRNAであるLOC642236とLOC283788からなる融合遺伝子などが存在していた(表1)。

表1

Gene1	Chromosome1	Fusion-Point1	Start1	Length1
JAK1	chr1	65304679	65304949	107
Gene2	Chromosome2	Fusion-Point2	Start2	Length2
TERF2	chr16	69390553	69390485	112

Gene1	Chromosome1	Fusion-Point1	Start1	Length1
LOC642236	chr9	68429474	68429502	101
Gene2	Chromosome2	Fusion-Point2	Start2	Length2
LOC283788	chrUn_gl000219	79242	78881	100

Gene1	Chromosome1	Fusion-Point1	Start1	Length1
ZNF839	chr14	102809858	102809476	120
Gene2	Chromosome2	Fusion-Point2	Start2	Length2
CYP4V2	chr4	187132688	187132630	100

融合遺伝子はChromothripsis同様に遺伝子変異である。Chromothripsis同様に正常細胞には存在していないと考えられ分子標的治療の標的として適切である。

融合遺伝子すべてが癌化に関わっているとは考えにくく、ドライバー遺伝子(癌の機能において重要な役割を有する遺伝子)とパッセンジャー遺伝子(発現亢進しているが重要な役割を有していない遺伝子)のように癌化に重要なものとそうでないものが存在すると考えられる。これら融合遺伝子を標的にしたこれまでとは異なる新たなコンセプトの癌治療法や診断法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Yamura Y, Asai N, Enomoto A, Kato T, Mii S, Kondo Y, Ushida K, Niimi K, Tsunoda N, Nagino M, Ichihara S, Furukawa K, Maeda K, Murohara T, Takahashi M. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression.

Cancer Res. 2015 Mar 1;75(5):813-23. doi: 10.1158/0008-5472. (査読有)

Sato N, Maeda M, Sugiyama M, Ito S, Hyodo T, Masuda A, Tsunoda N, Kokuryo T, Hamaguchi M, Nagino M, Senga T.

Inhibition of SNW1 association with spliceosomal proteins promotes apoptosis in breast cancer cells.

Cancer Med. 2015 Feb;4(2):268-77. doi: 10.1002/cam4.366. (査読有)

Nishimae K, Tsunoda N, Yokoyama Y, Kokuryo T, Iwakoshi A, Takahashi M, Nagino M. The impact of Girdin

expression on recurrence-free survival in patients with luminal-type breast cancer. Breast Cancer. 2015

Sep;22(5):445-51. doi:

10.1007/s12282-013-0501-3. (査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

角田 伸行 (TSUNODA, NOBUYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号: 40542684

(2)研究分担者

榑野 正人 (NAGINO, MASATO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 20237564

横山 幸浩 (YOKOYAMA, YUKIHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80378091

國料 俊男 (KOKURYO, TOSHIO)
名古屋大学・医学系研究科・特任講師
研究者番号：60378023