

転移制御因子の探索を目的とした肺腺がん原発巣及びリンパ節転移巣の全エクソンシーケンス解析

47126344 がん先端生命科学分野

武吉 緑

指導教官 土原 一哉

[背景・目的]

がんにおいて転移は予後不良因子のひとつとして知られている。本研究対象である肺腺がんにおいても転移により 5 年相対生存率の低下が認められる。従って、転移制御因子の解明は肺腺がんの治療戦略開発や転移予測診断法の開発につながり、予後改善につながる事が期待される。

これまでに転移に関する研究は多く報告されており、様々な分子が転移制御因子として報告されてきた。転移においてがん細胞における浸潤能及び遊走能の獲得が重要であることが報告されており、その因子の一つとして細胞骨格因子が知られている。がん細胞の転移過程において様々な細胞骨格因子の発現変化が転移能獲得と相関することが報告されているが、未だ転移制御の責任因子は明らかになっていない。転移する際に多くの遺伝子発現が変化することから、転移関連遺伝子発現を転写段階で制御する転移責任因子の存在が示唆される。

肺腺がんの原発巣は遺伝子変異の蓄積により不均一な集団を形成しており、それらの変異がしばしばがん細胞の転移能獲得に寄与することが考えられる。これまでの転移研究で盛んに行われてきた発現解析において責任遺伝子の同定に至っていないことから、転移責任因子が遺伝子変異により転移促進的に機能している可能性がある。近年の飛躍的なゲノム解析技術の発展は網羅的な遺伝子構造異常の探索を容易にし、様々な疾病の制御に寄与する変異遺伝子の同定に貢献した。肺腺がん原発巣及びリンパ節転移巣の網羅的ゲノム解析を行う事で転移に際する遺伝子構造異常を明らかにすることができ、転移に寄与した変異遺伝子の同定が期待できる。本研究の目的は網羅的ゲノム解析により転移における遺伝子構造異常を明らかにし、転移責任候補遺伝子を探索する事である。

[方法]

2010年に当研究室で全エクソンシーケンス(WXS)を行った97例の肺腺がん原発巣のうち、ゲノム解析に足るゲノムDNAの抽出が可能と考えられる領域性があるリンパ節転移巣を認めた16症例を本研究の解析対象とした。パラフィン包埋ブロックのリンパ節転移巣がん細胞を回収し、ゲノムDNAの抽出、全エクソン領域の濃縮を行い、超並列シーケンサーを用いてWXSを行った。得られたシーケンスデータをヒトゲノム参照配列にアラインメントし、変異検出プログラムにより変異検出を行った。検出した変異から custom filtering をかけ信頼性の高い変異を抽出した後に生殖細胞系列変異を除いたものを体細胞変異とした。リンパ節転移巣における体細胞変異から対応の原発巣で認められた体細胞変異を除くことでリンパ節転移巣特異的な体細胞変異を抽出した。リンパ節転移巣特異的な体細胞変異の中からの転移制御候補遺伝子の抽出は変異アレル頻度の算出と Polyphen プログラムを用いた翻訳後タンパク質への影響予測により行った。転写制御候補遺伝子の中から SCAI を抽出する際は Gene Ontology 解析と過去の転移への関与の報告を参考にした。SCAI 変異遺伝子の機能的意義を解明するため、PC9 細胞から SCAI の CDS 領域をクローニングし、pQCXIP レトロウイルスベクターに導入することで変異型及び野生型遺伝子発現プラスミドを作製した。作製したプラスミドを PC9 細胞に一過性遺伝子導入し、SCAI によって機能抑制されることが知られている転写因子 SRF の転写活性をレポーターアッセイにより評価した。また、肺腺がん細胞株における SCAI 遺伝子及び ITGB1、ACTA2 遺伝子の発現をトランスクリプトーム解析及び定量的 RT-PCR で検討をした。

[結果・考察]

1) リンパ節転移巣 16 例の WXS の質の確認

WXS 解析の結果、リンパ節転移巣試料の average read depth の中央値は 93.4 (47.3-209.3)であり、原発巣における中央値 46.6 (40.1-56.4)以上の値を示した (Figure 1)。この結果から、転移巣試料において原発巣と同等以上の変異検出が可能であることが示唆された。

2) リンパ節転移巣特異的な体細胞変異の抽出

リンパ節転移巣で認められた体細胞変異から原発巣における体細胞変異を除き 195 個の一塩基置換変異と 11 個の挿入・欠失変異、合計 206 個のリンパ節転移巣特異的な体細胞変異を明らかにした (Figure 2)。全症例の転移巣特異的な体細胞変異数は 0 個から 42 個までと多様であった。また、転移巣特異的な変異遺伝子について Gene Ontology 解析を行った結果、転移において重要である細胞骨格や細胞接着などの細胞機能に関わる遺伝子が濃縮されていた。

3) 転移制御候補変異遺伝子の抽出

がん細胞が転移する際に浸潤能や遊走能に有利性を与えていた体細胞変異は、転移初期からがん細胞が有していた可能性が高いと予測される。そのため、本研究ではリンパ節転移巣特異的な体細胞変異の変異アレル頻度に着目して転移制御候補遺伝子の抽出を試みた。非がん部症例の single nucleotide polymorphisms (SNPs) の変異アレル頻度の分布から heterozygous な変異は 32.1% 以上の変異アレル頻度を示すと予測した。32.1% 以上の変異アレル頻度を示す転移巣特異的な体細胞変異は転移巣がん組織を構成する大部分のがん細胞が有していると推測し、この条件を満たす 22 個の変異遺伝子を転移責任遺伝子候補として抽出した。転移責任候補遺伝子のうち、転写段階でがん細胞の遊走・浸潤能を制御することが報告されている *SCAI* 遺伝子に着目し機能解析を行った。

4) 変異型 *SCAI* タンパク質の機能解析と肺腺がん細胞における *SCAI* 遺伝子の発現解析

WXS 解析において変異型 *SCAI* の機能解析を行った。変異型 *SCAI* の SRF を介した転写活性に与える影響を検証するためにデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、野生型及び変異型 *SCAI* を発現させた PC9 細胞株間で SRF を介した転写活性に有意差は認められなかった (Figure 3)。しかし変異型 *SCAI* が SRF を介した転写活性に与える影響については更なる検討が必要である。26 株の肺腺がん細胞株のトランスクリプトーム解析の結果から転移関連遺伝子 *ITGB1* や *ACTA2* の発現は *SCAI* の発現と負の相関を示した (Figure 4)。この結果から、肺腺がんにおいて *SCAI* が転移関連遺伝子の発現を負に制御している事が示唆された。

[結論]

肺腺がん原発巣及びリンパ節転移巣試料の WXS 解析結果の比較検討から 22 個の転移責任遺伝子候補を明らかにした。また、転移責任遺伝子候補として抽出した *SCAI* 遺伝子の転移関連遺伝子の発現制御への寄与については今後解析を進める必要がある。

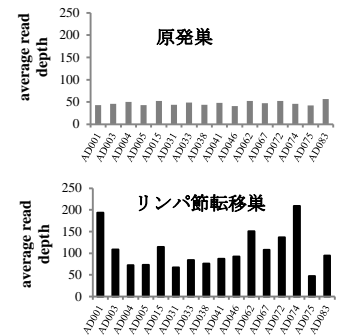


Figure 1 原発巣及び転移巣にお

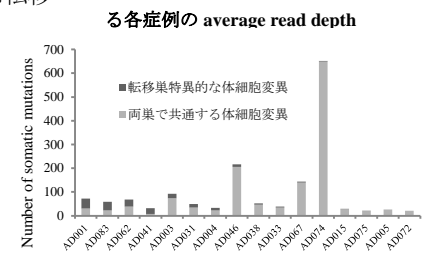


Figure 2 各症例における体細胞変異個数

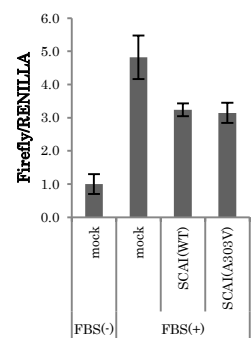


Figure 3. 変異型 *SCAI* の SRF 抑制能の検討

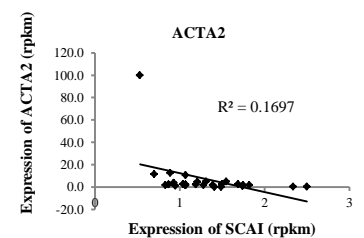
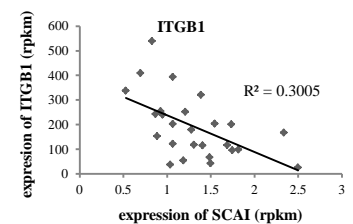


Figure 4 肺腺がん細胞株における *SCAI* と転移関連遺伝子発現の検討