

研究課題：子宮平滑筋肉腫発生・転移に関与する遺伝子の同定

所属：大阪大学大学院医学系研究科産科学婦人科学教室

小玉美智子

【緒言】

子宮平滑筋肉腫は非常に悪性度の高い腫瘍であり、外科的手術可能な初期の症例以外に対しては確立された治療法が存在せず、中央生存期間は約31ヶ月と極めて予後不良である。また、子宮平滑筋肉腫は子宮悪性腫瘍の1%と稀であるのに対して、同じく子宮平滑筋を発生母地とするcommon diseaseである良性子宮筋腫との鑑別方法は確立されておらず、子宮筋腫に対する手術後に平滑筋肉腫と診断される事が殆どである。従って、症例を予めハイボリュームセンターへ集積することが難しく、また発症頻度が少ない腫瘍であることから、過去に大規模な網羅的遺伝子変異データベースは存在しない。TCGAプロジェクトの一つである肉腫についてのデータセットにおいては、80症例の平滑筋肉腫が含まれ、コピー数多型としてTP53、ATRX、RB1、PTENの減少、MYOCDの増加が、体細胞変異としてTP53変異が認められた。子宮以外に発生する平滑筋肉腫と子宮平滑筋肉腫は分子学的に異なっており、異なる臨床的アプローチが必要だと考えられるものの、子宮平滑筋肉腫は80例中27例に過ぎず、その発生や転移の機序には不明な点が多い。

腫瘍組織を網羅的に解析したデータセットを利用した発がんメカニズムの解析が困難である希少悪性腫瘍においては、網羅的に遺伝子変異を生じた結果発生した腫瘍を解析することによって、発癌に寄与した遺伝子を同定できるフォワードジェネティクス手法が有用であると考えられる。その一つであるマウスを用いた網羅的な癌遺伝子同定法であるSleeping Beauty (SB) トランスポゾンスクリーニングを我々は過去に行い、各種癌のドライバー遺伝子を同定、報告してきた。今回、トランスポゾン挿入変異により子宮平滑筋肉腫を発生する新たなマウスモデルの作製に成功し、子宮平滑筋肉腫発生及び血行性転移のドライバー遺伝子候補を多数同定した。本研究によって、ヒト子宮平滑筋肉腫発生・転移の機序を明らかにする為、候補遺伝子複数について肉腫発生メカニズムに如何に関与するか検証を行い、その臨床的意義を明らかとすることを目指した。

【方法】

SBトランスポゾンスクリーニングは無作為挿入転移型トランスポゾンを用いたin vivoスクリーニングである。本スクリーニングは、Creリコンビナーゼにて発現が制御されるトランスポゼースと高コピーのSBトランスポゾンと同時に有するマウス(SBマウス)、臓器特異的にCreリコンビナーゼを発現するマウスを使用する。トランスポゾンとは、トランスポゼースの存在下でゲノム上を無作為に転移するDNA塩基配列であるが、本スクリーニングのトランスポゼースは、転移先の遺伝子発現を挿入位置・方向依存性に減弱・増強させるよう内部塩基配列が設計されている。SBトランスポゾンがマウスの目的臓器において無作為に転移挿入を反復することで、癌化に強く寄与する挿入変異を獲得した細胞が増加し癌が発症する。発症した腫瘍細胞からDNAを抽出し、トランスポゾン挿入部位を次世代シーケンサーにより解析することで、発癌に寄与した遺伝子の網羅的な同定が可能となる。

本手法を子宮平滑筋肉腫のドライバー遺伝子探索に用いる為、生殖器細胞においてCreリコンビナーゼを発現するAmhr2-CreマウスとSBマウス、更に発癌を促進する為Pten欠損マウス、Kras持続活性化を来たすKrasG12D変異マウスを交配させ、Amhr2/SB/Pten/Krasマウスを作成した。Amhr2/SB/Pten/Krasマウスは、ほぼ全例に月齢2~3ヶ月で子宮平滑筋肉腫を発症

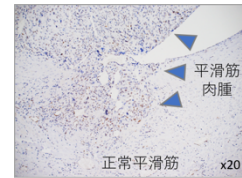
したが、トランスポゾンを持たないPten欠損・Kras活性化マウス(Amhr2/Pten/Krasマウス)には同腫瘍の発生を全く認めなかったことから、トランスポゾン挿入変異が子宮平滑筋肉腫発生に必須であると考えられた。85腫瘍についてトランスポゾン挿入部位を次世代シーケンサーで網羅的に同定し、挿入頻度を統計学的に解析することで、有意に高頻度なトランスポゾン挿入を認めた子宮平滑筋肉腫ドライバー遺伝子候補を同定した。

また、子宮平滑筋肉腫は早期から血行性転移を生じうる腫瘍であり、その制御機構を明らかにする為、マウス子宮平滑筋肉腫から樹立した複数の細胞株を免疫正常マウス尾静脈より投与することで、肺転移腫瘍を発生する血行性転移モデルを作成した。肺転移巣50腫瘍を同様にシーケンス・解析した所、原発巣とは異なる遺伝子群への高頻度な挿入が認められ、血行性転移のドライバー遺伝子として機能している事が示唆された。

マウス子宮平滑筋肉腫発生・転移に関与するドライバー遺伝子候補について、ヒト子宮平滑筋肉腫における意義を検証する為、まずヒト子宮平滑筋肉腫細胞株LMS1, UT1, SKNを使用して候補遺伝子発現減弱による細胞増殖能や遊走能・浸潤能の変化、形質転換の有無について検討した。候補遺伝子の一つ、Zinc fingerタンパクファミリーに属するZNF217は乳癌において癌遺伝子として働き、転写因子として機能することが報告されており、子宮平滑筋肉腫においても同様の機能が予測され、CHIP-seq解析による同遺伝子の制御機構解明を試みた。また、所属機関である大阪大学附属病院で保管されている子宮平滑筋肉腫手術検体には、子宮平滑筋肉腫原発巣及び同一症例における正常子宮平滑筋組織、また肺転移性腫瘍がある。それらを用いて免疫組織染色を行い、ヒト子宮平滑筋肉腫組織における候補遺伝子の発現について検討を行った。

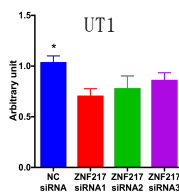
【結果】

SBスクリーニングで同定された、子宮平滑筋肉腫発生に関与したと考えられる19候補遺伝子のうち、癌遺伝子として機能していたZNF217について、ヒト平滑筋肉腫組織での発現を確認した。1998年から2018年の間に大阪大学附属病院で子宮全摘を行った子宮平滑筋肉腫症例のうち、子宮正常平滑筋及び子宮平滑筋肉腫組織の両方が保存されている14症例につき免疫組織染色を行った。14例中5例においては正常平滑筋よりも平滑筋肉腫組織においてZNF217発現が高く、ZNF217が子宮平滑筋肉腫発生に関与している可能性が示唆された。

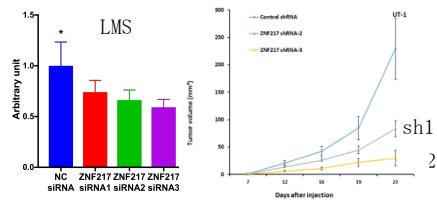


治療標的としてのZNF217の意義を確認するため、複数のヒト平滑筋細胞株においてsiRNAによりZNF217の発現を減弱させ、細胞増殖能について検討した。MTSアッセイにて、有意に減少する事を確認した。また、in vivoにおいてもSCIDマウスを用いたゼノグラフトアッセイにて有意に腫瘍形成能低下を認めた。(上図)

MTS assay

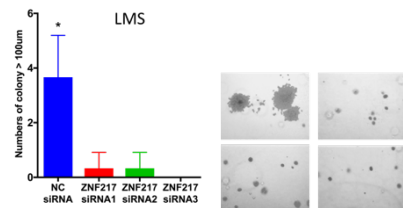


Xenograft assay



また、ZNF217減弱によって、有意に足場非依存性細胞増殖が減少すること、スフィア形成能が減少することが示され、癌形質転換及び癌幹細胞を抑制する可能性が示唆された。(右図)

LMS



これらの現象をZNF217が如何に制御しているのか、転写因子としての役割を解明するため、CHIPシーケンスを行うこととした。まず、CHIPアッセイ

の最適化を複数の抗体で行った。過去に報告されたZNF217の結合部位であるERBB3及びCCND1のプロモーター領域が、ZNF217抗体によるCHIPサンプルでmock IgGサンプルの30-100倍程度増幅されている抗体を選択し、サンプル調製を行ってシーケンスを行ったが、結果としてはCHIPサンプルにおける濃縮が認められなかった。

一方、子宮平滑筋肉腫の血行性転移に関与したと考えられる遺伝子のうち、遺伝子Xに着目し、ヒト平滑筋肉腫における役割の解明を試みた。

遺伝子Xについては、siRNAにて遺伝子発現を減弱させたヒト子宮平滑筋細胞株を用いて、MTSアッセイで細胞増殖能を評価したが、有意な影響を与えなかった。一方、ボイデンチェンバー法を用いた遊走能試験では、複数の子宮平滑筋細胞株において、遺伝子Xの発現減弱が遊走能を有意に抑制していることが証明された。

ヒト平滑筋肉腫の転移組織は、多くは生検組織で、組織量がごく僅かにしか残存していないものが多く、腫瘍成分を含んでおり検討が可能だったのは6症例からの10組織のみであった。更に、初回手術時の原発腫瘍組織と組み合わせて評価できたのは3症例のみであった。3症例のうち、2症例では原発腫瘍及び正常子宮平滑筋、再発転移腫瘍が、1症例では原発腫瘍及び再発転移腫瘍が評価可能であった。正常組織では遺伝子X陰性であるが、原発腫瘍では1/3で陽性、転移巣では3例ともに陽性であった。

【考察】

子宮平滑筋肉腫に対するSBスクリーニングでは、コントロールマウスに1例も認められなかった子宮平滑筋肉腫が、agingが可能であったSBトランスポゾンマウス全例に約2ヶ月で発症するという劇的な腫瘍発生を認めた。これまで過去に行われた他の癌腫のSBスクリーニングでは、トランスポゾン挿入転移によって発癌が促進され、がん抑制遺伝子が候補遺伝子として同定されることが多かったのに対し、本スクリーニングのようにde novoの腫瘍が急速に発症したのは特筆すべき現象であった。その結果として、候補遺伝子に複数の癌遺伝子が上位にあがったことは、納得の行く結果である。

複数の候補遺伝子についてトランクドライバー遺伝子を検出する解析を行った結果、上位にランクされたZNF217はC2H2型亜鉛フィンガーを含み、20q13.2に位置する遺伝子である。過去に乳癌や卵巣明細胞腺癌において癌遺伝子として機能する事が報告されているが、子宮平滑筋肉腫について報告されたことはない。本研究では、ヒト子宮平滑筋肉腫におけるZNF217発現増強、またその治療的意義について示された。ZNF217はERBB3発現を促進し、AKT-MAPK経路を活性化することが知られている、また、ヒト子宮平滑筋肉腫においては、PI3K-AKT-mTOR経路活性化が重要な役割を持つ事がこれまでに示されており、今回のPTEN欠失をベースとしたマウスモデルにおいて、更にZNF217発現が加わったことで、PI3K-AKT-mTOR経路が促進され、肉腫化に寄与したのではないかと考える。

また、血行性転移に関与したと考えている遺伝子Xについて、最近胃癌、大腸癌、胆管癌などで、癌細胞増殖また上皮間葉転換に関与することが報告され始めている。本研究では、子宮平滑筋発症モデルからではなく、転移モデルでのみ候補遺伝子として検出されており、実際に平滑筋肉腫細胞株の細胞増殖能には影響を与えない事が示されている。今後、遊走能、上皮間葉転換、接着能などに着目して研究を進める予定としている。

【結語】

SBトランスポゾンスクリーニングにより、マウス子宮平滑筋発症・血行性転移に関与する複数のドライバー遺伝子が検出され、ヒト子宮平滑筋肉腫における同様の役割が示された。