

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	吉田 奈七
<p>学位論文題目</p> <p>SETD2 and miR-21 as therapeutic targets for NUT midline carcinoma (NUT midline carcinomaの新規治療におけるSETD2とmiR-21の検討)</p> <p>共著者名</p> <p>奥村 俊介, 佐々木 高明, 千葉 伸一, 佐渡 正敏, 小山 恭平, 吉田 遼平, 平井 理子, 南 幸範, 北田 正博, 大崎 能伸</p> <p>Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics, 2022.3.14</p> <p>研究目的</p> <p>がん化に関連する遺伝子異常を特定し,分子標的治療薬をはじめとする個別化治療が進歩する一方で,未だに遺伝子異常が発見されても有効な治療法が確立していないがん種が存在する。Nuclear protein in testis(NUT) midline carcinoma (以下NMC) もその一つであり,染色体15q14上に位置するNUTM1遺伝子異常を有するがんとして定義される。臨床的な特徴として縦隔や体幹の正中線上に発生する点が挙げられ,またNMC患者は診断時点で進行癌であることが多く,従来の抗癌剤治療には抵抗性を示し平均生存期間は6-9か月と予後不良である。病理組織は未分化癌の像を呈することが多いが疾患特異性はなく,病理学的所見のみでの診断は不可能であり有効な診断法が求められる。</p> <p>NMCはNUTM1遺伝子再構成により発癌し,その融合遺伝子のパートナーとしてはbromodomain containing protein4(BRD4)が多くを占める。BRD4はbromodomain and extra-terminal domain(BET)ファミリータンパク質に属しており,ヒストンのアセチル化修飾というDNAの塩基配列を伴わないエピジェネティクス調節機構によりがん化を促進させる。最近の研究により,BRD4-NUTM1融合遺伝子を有する患者に対してBET阻害薬の有効性が報告され臨床試験段階にある。しかしNMCにおけるBET阻害薬の治療効果は限定的であり,また薬剤が効かなくなる耐性化が問題として残っている。</p> <p>我々は,NMCにおいてBRD4とは異なる治療標的が存在すると仮説を立て,がん細胞株を用いた基礎的な検証により新規治療法を提示することを目的とした。さらにNMCが疑われる臨床検体を活用することで,有効な診断方法を確立し,NMCにおける臨床研究へ向けた基盤構築の確立を目指した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 細胞株・薬剤

NMC細胞株としてTy82とHCC2429, 非NMC細胞株としてA549を用いた. BET阻害剤としてJQ-1とOTX015, WEE1阻害剤としてAZD1775を用いた. HCC2249細胞に由来したJQ-1の耐性株を樹立し, HCC2249-JQRと命名した.

2. MTSアッセイ

細胞を96ウェルプレートにまき, 24時間後に至適濃度の薬剤を投与した. さらに72時間後にCellTiter 96 AQ solutionを加えて, 4時間インキュベートした. 490nmの波長で吸光度を測定した.

3. siRNAトランスフェクション

ノックダウン実験として, Stealth RNAi siRNAを用いてNMC細胞株に対してsiRNAを72時間曝露させ, 遺伝子導入実験を行った.

4. ウェスタンブロット

至適条件で回収したタンパク質を4-12% SDS-PAGEで電気泳動し, PVDF膜に転写した. 各種一次抗体と反応させた後, 特異的二次抗体と反応させた.

5. 次世代シーケンサー

NMC細胞株および患者検体よりゲノムDNAを抽出し, 409個の癌関連遺伝子パネル(Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2)を用いて解析を行った. 機器はIon PGM Systemを使用し, 変異検出はIon Reporter ver.5.0.4を用いて解析した. またmicroRNA解析はコントロールのNMC細胞株およびNUTM1遺伝子をノックダウンしたNMC細胞株よりsmall RNAを抽出した(PureLink miRNA isolation kit). 機器はIon PGM Systemを使用し, CLC Genomics Workbenchソフトによる発現解析を行った.

6. miRNA機能解析

miRNAのmimicおよびinhibitorを用いて機能解析を行った. miRCURY LNA mimics, inhibitorを用いた. Lipofectamine3000を用いてNMC細胞へ導入し72時間の曝露を行った.

7. miRNAアッセイ

NMC細胞株よりsmall RNAを抽出した. TaqMan microRNA assaysを用いて細胞株から抽出したRNAに含まれるmiR-21-5pの発現量を解析した.

8. 臨床検体におけるBRD4-NUT融合遺伝子の検出

臨床試料解析は, 旭川医科大学医療倫理委員会の承認を得た(承認番号 15218-2). 検体採取前にすべての患者から書面によるインフォームドコンセントを得たうえでcDNAを作成した. BRD4-NUT融合遺伝子検出のための特異的プライマーとプローブを設計し, QuantStudio 3D Digital PCR システムを使用し, データ解析には QuantStudio 3D Analysis Suite Cloud ソフトウェアを用いて解析した.

9. 統計処理

GraphPad Prism Software version 7.0を用いて解析を行い, 結果はStudent's t-test, One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons testを用いて分析した. P-valueは, 0.05未満が統計学的に有意差ありとした.

成 績

1. NMC細胞株におけるSETD2遺伝子変異の同定とWEE1阻害薬の増殖抑制効果

NMC細胞株であるTy82およびHCC2429を対象に、次世代シーケンサーによる遺伝子解析を実施したところ、Ty82では19個、HCC2429では10個の遺伝子変異が検出され、2つの細胞株に共通する変異としてSETD2-p.Ser2382fsを同定した。SETD2はヒストンH3上のリジン36のトリメチル化(H3K36me3)を担うトランスフェラーゼであり、HCC2429細胞株ではH3K36me3の発現レベルが低下していたことから、SETD2遺伝子変異がH3K36me3欠損の機能喪失に寄与していることが示唆された。

既報よりH3K36me3欠損型悪性腫瘍にはWEE1阻害剤に対して高い感受性を示すことが報告されている。細胞増殖アッセイより、SETD2野生型のA549と比較し、2つのNMC細胞株ではWEE1阻害剤であるAZD1775に対する増殖抑制効果を認めた。次いでNMCに有効とされるBET阻害剤JQ-1とAZD1775の併用効果を検証したところ相加効果に留まっていた。HCC2429を起源とし、JQ-1阻害薬に耐性を示す細胞株としてHCC2429-JQRを作成したところ、AZD1775はHCC2429,HCC2429-JQRに同等の増殖抑制効果を示した。以上よりWEE1阻害剤がBET阻害剤の耐性株にも効果を示すと同時に、BET阻害薬とは異なる機序で抗腫瘍効果をもたらしている可能性を示した。

2. NMCにおけるmiR-21阻害薬とWEE1阻害薬の併用効果

各種癌においてmiRNAはエピジェネティクス制御や病原性の制御因子として重要であることが報告され新たな治療標的として期待されている。HCC2429に対してNUT siRNAを行ったところ、miR-21-5pの発現変化を認め、我々はmiR-21がNMC細胞株において腫瘍増殖因子であると考えた。その検証のためにHCC2429に対してmiR-21-5p阻害剤を投与したところ、コントロールに対して腫瘍増殖抑制効果を確認し、miR-21-5p阻害剤がNMC細胞株に対して新規治療となる可能性を示した。さらにHCC2429と比較しHCC2429-JQRではmiR-21の発現が有意に亢進しており、BET阻害薬の耐性機序であることが示唆された。そのためにHCC2429-JQR細胞に対してmiR-21阻害剤とAZD1775の増殖抑制効果を検証したところ併用効果が確認された。

3. NMC患者検体のデジタルPCR解析法の確立とSETD2遺伝子変異の検出

NMCの診断には免疫組織化学染色や蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法が用いられることが多いが定まった方法は確立していない。我々は高感度デジタルPCRがNMCのなかのBRD4-NUTM1融合遺伝子患者を同定するために有用であるかを検証するために、HCC2249細胞を用いたところ1000倍希釈まで高感度に異常遺伝子を検出できることを示した。次いでNMCが臨床的に疑われる32症例の臨床検体よりcDNAを抽出しデジタルPCRで解析を行ったところ、1つのサンプルでBRD4-NUTM1融合遺伝子を検出できた。さらに、デジタルPCRでBRD4-NUT融合遺伝子が検出された患者サンプルに対して次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析したところ、SETD2-p.Ser2382fsの変異が検出された。

考 案

本研究では以下の二つのことを明らかにした。1)NMCにおけるmiR-21阻害薬とWEE1阻害薬の新規併用療法による腫瘍増殖抑制効果, 2)BRD4-NUMT1融合遺伝子の高感度検出法の確立。

NMC細胞株を用いた検証により, SETD2遺伝子変異とmiR-21という新規治療標的を見出した。前者はSETD2の機能喪失に伴うH3K36me3の発現低下とWEE1阻害剤の関連性に着目し, WEE1阻害薬がNMCに対して増殖抑制効果をもたらすことを示した。NMCに対して有効性が示されている数少ない薬剤としてBET阻害薬が挙げられるが, 同薬剤への耐性化は克服すべき課題である。本研究で得られた知見はWEE1阻害薬, miR-21阻害薬共に単剤または併用療法によるBET阻害薬耐性株への有効性が確認された。さらにmiRNA発現はDNAメチル化とヒストン修飾の制御に関与することが知られており, SETD2遺伝子変異と同様に治療効果の背景としてエピジェネティクスにより発癌制御機構の可能性を示唆するものである。

またNMC患者はその診断法に一定の見解がなく, 診断法の確立が急務である。今回我々が確立したデジタルPCRは高感度解析としての利点があり今後, NMC患者診断として臨床応用が期待される。さらにデジタルPCRにより同定された患者サンプルにおいても, NMC細胞株における検証で得られたSETD2遺伝子変異を認めたことは我々の研究結果を強固に保証するものである。

一方で本研究では*in vivo*を用いた検証がなく, かつ新規併用療法の機序の解明についても十分な解析が行われていないことが問題である。今後の臨床応用を目指したさらなる基盤研究が必要である。




結 論

SETD2欠損とmiR-21がNMCの治療標的であることを明らかにした。これにより, WEE1阻害剤およびmiR-21阻害剤は, NMCの新規治療選択となる可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. French CA, Miyoshi I, Aster JC, et al.: BRD4 bromodomain gene rearrangement in aggressive carcinoma with translocation t(15;19). Am J Pathol 159: 1987-1992, 2001.
2. French CA, Miyoshi I, Kubonishi I, Grier HE, Perez-Atayde AR and Fletcher JA: BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. Cancer Res 63: 304-307, 2003.
3. French CA: NUT Carcinoma: Clinicopathologic features, pathogenesis, and treatment. Pathol Int 68: 583-595, 2018.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	吉田 奈七
		審査委員長	谷野 美智枝 
		審査委員	水上 裕輔 
		審査委員	山本 明美 
学 位 論 文 題 目			
SETD2 and miR-21 as therapeutic targets for NUT midline carcinoma (NUT midline carcinoma の新規治療における SETD2 と miR-21 の検討)			
<p>希少がんの一つである Nut midline carcinoma(NMC)の高感度診断法の確立および新規治療標的分子の発見を目的とした研究であり、診断法の確立と新規治療標的分子の検索を試みた。</p> <p>はじめに、NMC が BRD4-NUT 融合遺伝子を有する HCC2429 細胞株を用いて高感度に検出するデジタル PCR を構築し、臨床検体による診断が可能であることを示した。</p> <p>次に、2 種の NMC 細胞株を用いたターゲットシーケンス法により遺伝子変異の検索を行い、共通する新規の SETD2 変異を同定した。SETD2 は多岐にわたる癌種にみられ、腎癌では WEE1 阻害剤による合成致死が報告されている。本研究でも、NMC 細胞株は WEE1 阻害剤に感受性を示した。現在 NMC において臨床試験段階にある BET 阻害剤は効果があるもの、短期間で薬剤耐性が生ずることが知られている。そのため、BET 阻害剤耐性株を樹立し、WEE1 の感受性および BET 阻害剤との併用効果を検証したところ、WEE1 阻害剤による抗腫瘍効果と併用による相加効果が示された。</p> <p>さらに薬剤耐性機構をより詳細に検討するため、NUT knock down 細胞株を作成し miRNA 解析を行い、miR21 に着目した。実際に BET 阻害剤耐性株において miR21 の上昇を認めており、miR21 阻害による増殖抑制を確認し、前項で抗腫瘍効果が認められた WEE1 阻害剤との併用効果も評価した結果、相加効果を認めた。</p> <p>以上より NMC の診断において、デジタル PCR 法による BRD4-NUT 融合遺伝子の検出が有用である事、WEE1 阻害剤および miR21 阻害剤による抗腫瘍効果の可能性が示唆された。</p> <p>本論文の内容は独創的で、データ解析も十分なされていた。論文提出者は各審査委員の諮問において当該論文および関連領域に関する質問に的確に答え、十分な知識を有することが確認された。また本論文は国際的学術雑誌である Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics 誌に印刷公表済みである。以上より本審査委員会は、本論文が博士(医学)の学位に値すると判断した。</p>			