

令和 元年 11月 17日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成29年度

受付番号 363

氏 名

富永直臣

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：Massachusetts Institute of Technology（国名： 米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

悪性中皮腫の発生と早期診断における BAP-1・HMGB1 の機能解析3. 派遣期間：平成 29年 11月 01日 ～ 令和 元年 10月 31日

4. 受入機関名及び部局名

Massachusetts Institute of Technology, Biology5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当3 ページ以上、英語で記入も可）**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

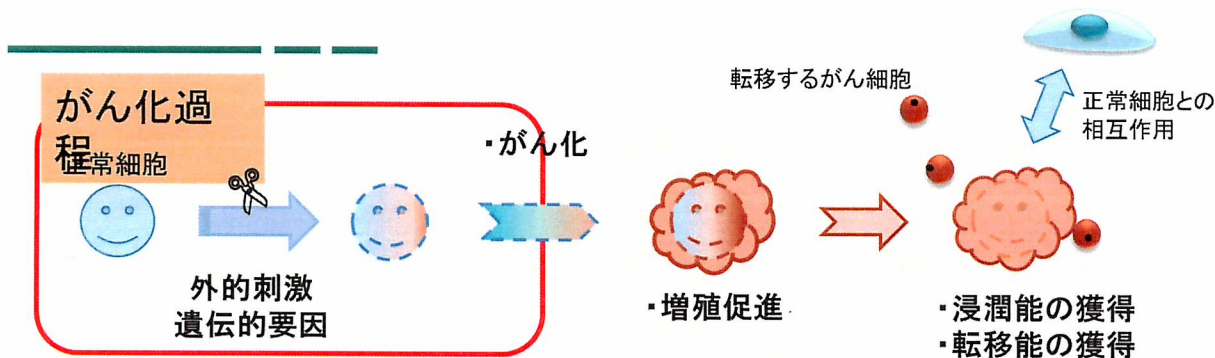
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

研究目的

がんは主要な死因であり、世界のがん患者数は2012年の時点で1400万人に上り、2020 年までに2200万人に増加すると予測されている。その為、早期診断や効果的な治療の開発が求められている。これまで多くの研究者が、前述の目的のために診断・治療法の開発を行ってきたが、依然としてがんの根治には至っていない。申請者はこれまでの研究を通して、がんの発生メカニズムを明らかにし、その発生を抑制することが必要であると考えた。これまで申請者が関わってきた乳がんは、女性のがん死因の第一位となっている。この様な主要ながん種は、がんの発生原因に多様性があり、生まれたがん細胞にも多様性がある。そのため、主要ながん種をがん化モデルとして使用することは難しい。希少がんに分類されるがんは、がん患者全体の20%程度を占めている。乳がんは全患者数の10%程度であることから、希少がん患者の全数は多く、いかに希少がんが多種類に分類されていることが分かる。一方、希少がんはがん種の中でも個々の割合が少なく・多種類であるため、研究の進展は乏しく、治療法開発が思うように進まない。しかし、希少がんは主要ながん種と比べ発がん原因が限定されているものもあり、がん発生研究という観点から良いモデルとなり得る。そのため、希少がん研究を通して、がんの発生メカニズムを明らかにし、希少がんの診断・治療応用のみならず、将来的にはがん種一般の発生メカニズムの解明を目指したい。中皮腫は、胸膜や腹膜にできる悪性腫瘍で、アスベストによる慢性炎症が原因と考えられている。日本での罹患数は、1980 年代前半から5 年で500人

と5倍に増加した。さらに2004年には953人と24年で10倍と急激に増加している。中皮腫の潜伏期間が平均40年とされていることから、今後日本の中皮腫の罹患および死亡はさらに増加すると予想されている（国立がん研究センターがん対策情報センター）。また欧州では毎年1.0-1.5万人の患者が罹患しており、今後35年間の間に25万人が中皮腫で死亡すると予測されている。そのため、希少がんの中でも中皮腫の治療法開発は喫緊の課題である。

Testaらは*BAP1*の生殖細胞系列変異が中皮腫の感受性因子であることを報告しており、がん発生機序に重要であることで注目が集まっている(Testa *et al.*, Nature Genet. 2011)。近年、*BAP1*タンパク質は、転写因子であるYin Yang 1(YY1)などのタンパク質と複合体を形成して遺伝子の転写を制御しており、DNA修復・細胞増殖・ストレス反応・アポトーシスなど様々な細胞機能に関与していることが報告されている(Tu *et al.*, Mol. Cell. Biol. 2010)。つまり、中皮腫では、がん抑制遺伝子である*BAP1*が機能不全となりがん化に至ると考えられる。*BAP1*の生殖細胞系列変異を持つ家系が存在するように、*BAP1*LOHマウスを用いた発がん過程は、より生体内での現象を反映していると考えられる。加えて、中皮腫患者から得られたがん組織をNGS解析する事によって、がん発生機序に重要な遺伝子の変異、融合遺伝子等の解析を行うことを目的とする。



遂行状況と成果

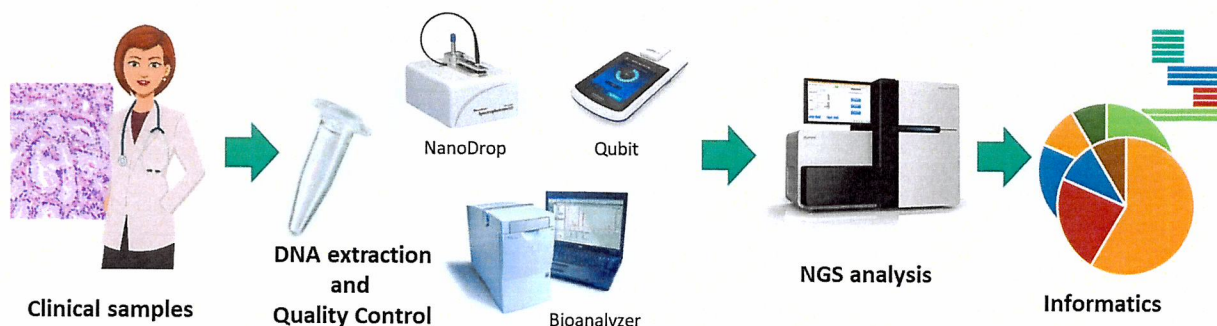
1. 中皮腫患者から得られたがん細胞のNGS解析

トルコの中央アナトリア高原に位置するカッパドキア地方では、中皮腫の発生が非常に高いことが知られている。これは、土や岩石に含まれる天然鉱物繊維に起因する。実際、カッパドキア地方では、岩石に穴を掘って住居を作り生活をしているため日常的に天然鉱物繊維に暴露している。前述の通り、中皮腫の原因はアスベストを含む天然鉱物繊維であるため、カッパドキア地方の住民はアスベストを原因とする中皮腫を高率で発症する。今回、このカッパドキア地方の中皮腫患者から得られたがん細胞サンプルを用いてNGS解析を行った。

NGS解析に先だって、研究室にある情報から、カッパドキア地方のいくつかの家系を調べたところ、興味深いことに、家系によって中皮腫の発生頻度が異なっていた。カッパドキア地方に住み、なおかつアスベストに長期的に暴露しているにもかかわらず家系による違いがあるという点から、DNA上にがん化防止に対する脆弱性があると考えられる。更に、この地域には宗教上近親婚が多いため、そのような遺伝子が保存されてきた可能性もある。これらのことから、DNA上のSNPsに注目しがん化要因について検討した。

NGS解析では、がん細胞からDNAを抽出し、5 μ gのDNAを用いて断片化、タグ付けを行い、Miseq (illumine社) で解析を行った。シーケンシング後に得られたリード配列情報は、

FASTQ形式のファイルで出力される。FASTQファイルには各リード毎のクオリティが評価されており、Qスコアに換算し、エラー率を求める。次に、クオリティが低いリードについては消去し、クオリティが高いリードのみをNIHが公開しているヒト遺伝子情報をもとにマッピングを行う。マッピングされたリード配列は、いくつかのアルゴリズムを用いて変異の検出とその変異のフィルタリングを行う。さらに、これらの情報に、遺伝子名、コーディング情報、翻訳後のタンパク質に与えるインパクトなどの情報をアノテーションしていく。これら配列のアライメント情報から最終的にIntegrative Genomics Viewer (IGV) ソフトウェアを用いて可視化し、特徴的なSNPs、融合遺伝子等中皮腫発症者に特徴的な遺伝子情報を抽出した。上記の解析の結果、3個の融合遺伝子候補が明らかとなった。



2. NGS解析で得られた融合遺伝子の同定

NGS解析で得られた結果をもとに、融合遺伝子が実際に存在するかどうかを確認した。カップパドキア地方に住む、中皮腫患者から得られたがん細胞を用いてDNAを抽出し、PCR法を用いて増幅の有無を確認することで融合遺伝子の存在を確定する。NGS解析の特徴から、シーケンス配列が読み取れるのは100bp程度になるいくつかのリードを組み合わせシーケンス配列を延長したとしても120-150bp程度であった。この限られた配列を用いて、NCBIが提供するBlastを用いて検索した。その結果、3個の融合遺伝子が実際に新規性が高いことが明らかとなった。

さらに、新規性が高い融合遺伝子X個に対して、PCR法を用いてDNA増幅を行うため、プライマー設計を行った。プライマー設計を行う際、

- a) 融合遺伝子をまたぐ両サイドにプライマーを配置する
- b) 特異性が高いものを選ぶ

という点に注意して行っている。

その後、PCR増幅を行い、1.5%アガロースゲル電気泳動で確認したところ、複数の中皮腫患者から融合遺伝子の可能性がある増幅が確認できた。

これらの融合遺伝子は、中皮腫の原因遺伝子となっている可能性があり、さらに詳細な検討を予定している。