

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 30 年

受付番号 201860350

氏 名 浅田 龍樹

(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： ニューヨーク （国名： アメリカ ）

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。

CRISPR/Cas9 による融合遺伝子、点変異を持つ腱滑膜巨細胞腫細胞株作成3. 派遣期間： 平成 31 年 2 月 27 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Memorial Hospital Research Laboratory5. 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。

【研究の背景】

がんが段階的に進行し、悪性形質を獲得していく多段階発がんは、ゲノム不安定性に起因する様々な遺伝子異常が蓄積していく過程を通じて起こる。次世代シーケンサー (NGS: Next-Generation Sequencer) の開発と普及により未知の配列を含むゲノム配列を網羅的に低コスト・短時間で解読することが可能となり、遺伝子異常を発生の主因とするがんの基礎研究は大きな転換期を迎えることとなった。これらの技術革新により、がんにおけるゲノム異常の全体像が解明されつつある (Vogelstein B. Science 2013)。実際に 2006 年以降、NGS を用いたがんゲノム解析研究は飛躍的に進歩し、ICGC (International Cancer Genome Consortium) や TCGA (The Cancer Genome Atlas) などの大規模がんゲノム解析プロジェクトの成果が多数報告されている。NGS を中心とした解析手法は発生頻度の高い癌腫の解析を中心に発展してきた。しかし、骨軟部腫瘍のゲノム解析はその希少性ゆえに解析が進まず、他の癌腫より大きく後れている。実際に癌腫では 2006 年頃から NGS を用いたゲノム解析の報告がなされてきているが、骨軟部腫瘍のゲノム解析の報告は 2013 年からであり、約 7 年遅れている。また、最近の研究は、がんにおける遺伝子異常の解明が、従来のがんの治療体系を個人に特化したオーダーメイド医療へと根本的に変える可能性を秘めていることを示している。たとえば ABL キナーゼや KIT キナーゼ遺伝子の異常がある血液腫瘍に対する、それらのキナーゼ阻害剤である Imatinib (Richard T. Blood 2004) や、EGFR 遺伝子変異を有する肺癌に対する EGFR 阻害剤である Gefitinib の有効性が示されている (Sirotnak FM. Clin Cancer Res 2000)。このように各種癌のドライバー遺伝子や特徴的な異常タンパク質の同定と、その分子を標的とした分子標的治療薬の開発は、がん研究における現在の潮流の一つとなっている。しかし、前述のように特に骨軟部腫瘍においては、その希少性と組織型の多様性から、各々の腫瘍に関する遺伝子異常の解明は未だ緒についたばかりであり、網羅的かつ探索的なゲノム異常の解析や、新規治療標的分子の網羅的な探索は今後の極めて重要な課題である。

【問題点、解決方策】

1) **骨軟部肉腫は代表的な希少がんであり、各組織型の頻度はさらに低く遺伝子異常が同定されていない腫瘍が多い**

欧州における希少がんのワーキンググループ RARECARE によると「希少がん」は年間発生数が人口 10 万人あたり 6 人以下と定義されている (Stiller CA. Eur J Cancer 2013)。骨軟部肉腫は年間発生数が 2.8 人と代表的な希少がんである。さらに骨軟部肉腫の組織型は 50 種類以上にも及ぶため、組織型ごとに骨軟部肉腫の解析を行う場合、その希少性はさらに高くなる。このため、骨軟部肉腫個々の組織型について十分な検体を収集して解析を進めることは困難を極める。解決のためには、集約化された大規模な施設においてシーケンシングを行い遣

伝子異常を同定する必要がある。

2) 骨軟部肉腫は難治がんであり、新規治療標的の同定が必要である

上述の背景から、骨軟部肉腫における病態解明、新規治療薬の開発は他のがんと比較して大きく遅れをとっている。大部分の骨軟部肉腫は手術による完全切除以外に有効な治療法がない難治がんである。それぞれの遺伝子異常に応じた治療開発が望まれる。

3) 骨軟部肉腫におけるゲノム異常解析は未だ緒についたばかりであり、今後の極めて重要な課題である

近年、一部の骨軟部肉腫の全ゲノム・エクソン解析、RNA sequence 解析の結果が報告され、軟骨芽細胞腫、骨巨細胞腫における *H3F3B*, *H3F3A* 変異 (Behjati S. Nat Genet 2013)、血管肉腫における *PTPRB*, *PLCG1* 変異 (Behjati S. Nat Genet 2014)、胎児型横紋筋肉腫における *MYOD1* 変異 (Kohsaka S. Nat Genet 2014)、孤在性線維性腫瘍における *NAB2-STAT6* 融合遺伝子 (Robinson DR. Nat Genet 2013) などが明らかになった。また骨肉腫では、全ゲノム解析により約 80% という高頻度な p53 変異が明らかとなった (Chen X. Cell Rep 2014)。しかしながら、50 種類以上に及ぶ骨軟部腫瘍のほとんどに関して未だ網羅的な遺伝子変異の探索は行われておらず、解析を進める必要がある。

【今回の研究の目的】

骨軟部腫瘍の特徴として、組織型によっては融合遺伝子が高頻度で見られる。融合遺伝子は頻度の高さや細胞株を用いた基礎実験から主要なドライバー遺伝子であると考えられている。近年、新規の融合遺伝子が発見されており、以前には円形細胞肉腫として Ewing 肉腫と同様に扱われていた *CIC-DUX4* や *BCOR-CCNB3* 陽性肉腫は、現在は予後や化学療法の反応性が異なることが分かってきた (Antonescu CR. Am J Surg Pathol, 2017. Kao YC. Am J Surg Pathol, 2018)。また *EWSR1*(FUS) rearrangement 陽性 Ewing/Ewing-like 肉腫において *EWSR1-FLI1* が約 80% の症例に見られるが、*EWSR1-ERG* が約 15% の症例に見られる。*EWSR1-ERG* を持つ Ewing 肉腫は chromoplexy が高頻度に見られ、*EWSR1-FLI1* 陽性 Ewing 肉腫に比較して、予後が悪い可能性が指摘されている (Anderson ND. Science, 2018)。このように近年、新規融合遺伝子の発見と融合遺伝子に基づいた臨床病理学的な分類が進んでいる。

筆者はこれまでに、脱分化型脂肪肉腫における新規融合遺伝子 *CTDSP1/2-DNM3OS* (Hirata M, Nat Commun, 2019)、*CSF1-COL6A3* が主要な融合遺伝子である腱滑膜巨細胞腫における *CSF1-VCAM1*, *CSF1-NF1*, *CSF1-CDH1* (Tsuda Y, Int J Cancer, 2019) を同定してきた。今回の研究においてはこうした研究を生かして以下を目指した。

- 1) MSK-IMPACT、融合遺伝子パネルを用いた骨軟部腫瘍に対する融合遺伝子の同定と臨床病理学的検討を行う
- 2) CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いてヒト ES 細胞に *LMNA-NTRK1*, *ETV6-NTRK3*, *CSF1* 融合遺伝子を導入し、内在性の遺伝子変異を有した細胞株を作製する。
- 3) 上記の細胞株とコントロール細胞株の発現プロファイルを比較・検討することで、病態解明と治療標的の同定を行い、さらに *in vitro*, *in vivo* の実験系を用いて有効な新規治療開発への応用の可能性を探索。

【研究方法・結果】

【結果 1】 Sclerosing epithelioid fibrosarcoma of bone における新規融合遺伝子の同定と臨床病理学的な検討

Sclerosing epithelioid fibrosarcoma of bone において新規の融合遺伝子 *EWSR1-CREB3L1/2* を同定した。また、50% の症例に転移が出現するといった aggressive な経過をとることを報告した。

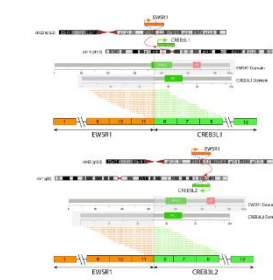


Fig.1 *EWSR1-CREB3L1/2*

【結果 2】 Ewing sarcoma (*EWSR1*/FUS-EFT family gene fusion) と Small round cell sarcoma with *EWSR1*/FUS-non EFT family gene fusion における融合遺伝子の解析と臨床病理学的所見との関連性の探索

EWSR1/FUS-*FEV* 融合遺伝子を持つ Ewing sarcoma の融合遺伝子の解析を行い、*FEV* の Exon2 以降が融合遺伝子に含まれることを報告した。また、軟部発生が多く、予後は *EWSR1*/FUS-*FLI1* を持つ Ewing 肉腫と比較して悪いことを発見した。

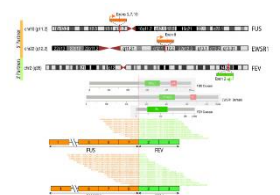


Fig.2 *EWSR1/FUS-FEV*

Ewing sarcoma (*EWSR1*/FUS-EFT family gene fusion) と Small round cell sarcoma with *EWSR1*/FUS-non EFT family gene fusion を解析して、それぞれの融合遺伝子の頻度を同定した。また、融合遺伝子の種類によって年

齡、骨軟部発生、四肢・体幹発生の頻度が異なることを発見した。FEV, NFAT2, ERG の融合遺伝子を持つ肉腫は EWSR1/FUS-FLI1 陽性 Ewing 肉腫よりも予後が悪いことを発見し報告した。

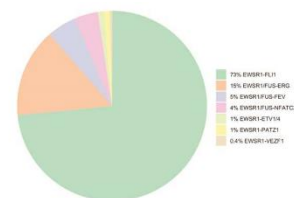


Fig. 3 融合遺伝子の頻度

【結果 3】 Epithelioid haemangioma of bone における新規融合遺伝子同定と臨床病理学的な検討

Epithelioid haemangioma of bone において *FOS-LMNA*, *FOS-VIM*, *ZFP36-FOSB*, *WWTR1-FOSB* 融合遺伝子を同定した。また 33% が局所再発を起こし、locally aggressive な性質を持つ点や、pseudomyogenic hemangioendothelioma、epithelioid hemangioendothelioma などの血管系腫瘍との病理学的な鑑別点を示した。

【結果 4】 Generation of cell line model with NTRK or CSF1 fusion in human ES cell

ヒト ES 細胞を用いて CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術で融合遺伝子を導入した。融合遺伝子導入後に間葉系細胞や上皮系細胞に分化させ、肉腫ならびに癌腫のモデル作成が可能になると考えたためヒト ES 細胞を用いた。*LMNA-NTRK1*、*ETV6-NTRK3*、*COL6A3-CSF1* 融合遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて導入し、これらの遺伝子を有する細胞株を作製した。通常の CRISPR/Cas9 システムを用いた人工転座作製では、目的とする転座が導入される細胞は標的細胞全体の 0.1-2.0% と非常に効率が低いため、Hygromycin を用いて細胞を選択した。

1. 融合遺伝子産物を発現した細胞株を作成した。

CRISPR-CAS9 でターゲット部位を切断して Homology arm と LoxP で挟まれた Hyg 発現遺伝子を間に持つ融合遺伝子を hES 細胞に導入。Hyg で selection したのちに、Cre は発現させて LoxP 部位を除くと融合遺伝子が発現するというシステムを作成した。D0 に Cre を発現させて D2, 7, 12 に gDNA と RNA を抽出して PCR を行って *LMNA-NTRK1* 融合遺伝子が発現していることを確認した。融合遺伝子の発現は継代を続けて 1 か月後にも維持されていた。また GRE で発現を誘導していないコントロールと比較して qPCR では NTRK1 のキナーゼ部位の発現は上昇していた。

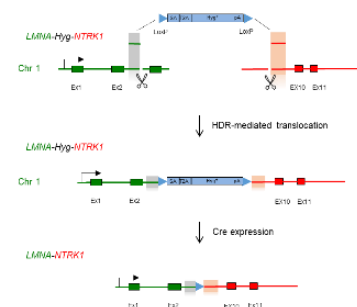


Fig.4 *LMNA-NTRK1* 陽性 ES 細胞の作製

2. NTRK 融合遺伝子発現細胞に関して、NTRK 阻害剤の効果を検討した。NTRK 阻害剤に対する特定の耐性変異が知られているため、耐性変異を導入。その後に治療標的と成りうる分子が同定された場合や、薬剤スクリーニングにより有望であった場合には *in vitro* 及び *in vivo* で候補の薬剤について検討を加える予定である。

3. また患者検体を用いて *in vitro* 及び *in vivo* での結果を検討する予定である。

【本研究の特色、着眼点、独創的な点】

Memorial Sloan Kettering Cancer Center(MSKCC)で開発された Target sequence panel である MSK-IMPACT と融合遺伝子パネルを用いて、骨軟部腫瘍において新規の融合遺伝子を同定した。MSKCC は世界で初めて MSK-IMPACT というターゲット遺伝子解析パネルを導入しており、骨軟部腫瘍においても大規模なデータを保有している。これらのデータを用いて解析を行う事でこれまでに報告されていない融合遺伝子や、融合遺伝子と臨床病理所見との関連を解析可能であった。

また、最新の CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた人工転座遺伝子の作製を行った。これまで hES 細胞を用いて CRISPR/Cas9 による人工転座作製について報告している先行研究は留学先の研究室の他にはない。本研究では *LMNA-NTRK1*、*ETV6-NTRK3*、*CSF1-COL6A3* 融合遺伝子の導入を試み、まずは *LMNA-NTRK1* の導入に成功した。MSKCC の持つ CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術の実績と、患者検体を用いた解析を可能とする豊富な症例数が本研究の独創性を高めている点である。これまで融合遺伝子や遺伝子変異体をレンチウイルスなどで発現誘導した細胞株が作成され機能解析が行われているが、非生理的であり疾患モデルとして欠点も見られた。たとえば、実際に細胞株で得られた薬剤の効果と、臨床での薬剤の効果とが解離し、新規治療の開発へと結びつかない場合があった。本研究では CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術により内因性の遺伝子改変を行うものであり、病態のより生理的な評価が可能となり、これまでにない先進的かつ独創的な視点から病態のさらなる理解、治療開発に関する重要な知見が得られることが期待される。

【当該研究の位置づけ、意義】

骨軟部腫瘍においてこれまでに報告のない融合遺伝子を同定し病態の解明に向けて有用な情報を提供した。骨軟部肉腫において融合遺伝子を内在性に発現した正確な疾患モデルは少なく、これが病態の正確な解明や、新規薬剤の臨床現場への導入という革新的な進歩がなかった一つの要因である。CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた hES 細胞における人工転座遺伝子の作製は世界初の試みであり、本研究において内在性の変異を

発現した細胞株を作製することができれば、疾患モデルとなり、病態解明と新規治療の開発に大きく貢献できると考えられる。

【予想されるインパクト及び将来の見通し】

骨軟部肉腫における病態解明、前臨床研究への応用、さらにはこれまでなし得なかった新規治療薬の臨床導入に発展できる可能性がある。さらに、本研究から得られた CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による人工転座遺伝子や遺伝子変異の作製と前臨床研究への応用というアプローチは融合遺伝子や遺伝子変異の存在が知られている他の肉腫、例えば粘液型脂肪肉腫、滑膜肉腫、Ewing 肉腫などの解析にも大きな進展をもたらし、これらの疾患における病態解明や新規治療開発への応用に発展できる可能性がある。