

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08768

研究課題名(和文) 粘液型脂肪肉腫の多段階腫瘍関連メカニズムの解明と臨床応用に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Basic Research on mechanisms of multistep tumorigenesis in myxoid liposarcoma and its clinical applications

研究代表者

及川 恒輔(OIKAWA, Kosuke)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70348803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：染色体転座に起因するTLS-CHOPは、粘液型脂肪肉腫特異的な融合がんタンパクであり、腫瘍特異的な転写因子として機能すると考えられている。我々は以前、TLS-CHOPがDOL54の発現誘導を介して抗腫瘍活性を持つMDA-7のmRNAの発現を抑制することを明らかにしたが、本研究により、粘液型脂肪肉腫においてMDA-7は、PAI-1を介したユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解によっても抑制されていることが強く示唆された。また、粘液型脂肪肉腫細胞でMKL-1をノックダウンすると脂肪分化を促進することが分かり、MKL-1の分化療法の新規標的分子としての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘液型脂肪肉腫は、中高年の軟部肉腫の中では発生頻度が高いものの1つである。粘液型脂肪肉腫の予後は比較的良いとされているが、手術療法による治療では、発生部位や範囲により機能欠損の問題が生じる。その点、本研究のように、粘液型脂肪肉腫で働く腫瘍関連分子機構の解明とそれに関連した分子治療の新規標的分子の検索は、非侵襲的な治療法の開発につながる。さらに、腫瘍細胞におけるMDA-7の抑制機構の解明に関しては、その機構が他の種類の腫瘍にも共通する可能性が考えられるため、さらなる発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The TLS-CHOP fusion oncoprotein resulting from a specific chromosomal translocation is found in majority of human mixoid liposarcomas, and is thought to function as a tumor-specific transcription factor. Previously, we have revealed that TLS-CHOP represses expression of MDA-7 mRNA via induction of DOL54 expression. In this study, we showed that MDA-7 protein is degraded by the ubiquitin-proteasome system in myxoid liposarcoma cells, probably via induction of PAI-1 expression. Thus, MDA-7 may be strongly repressed at both mRNA and protein levels in myxoid liposarcoma cells. On the other hand, we have also found that MKL-1 knockdown promotes adipocytic differentiation in myxoid liposarcoma cells, suggesting that MKL-1 may be a promising molecular target in differentiation therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：粘液型脂肪肉腫 がんタンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

粘液型脂肪肉腫は、中高年に発生する軟部肉腫の中で発生頻度が高いものの1つである。12番染色体と16番染色体の相互転座により生じたTLS-CHOP キメラ遺伝子は、粘液型脂肪肉腫特異的ながん遺伝子であり、その遺伝子産物は転写因子として腫瘍の発生や進展に寄与するものと考えられている。我々はこれまでに、脂肪分化の際に12番染色体と16番染色体の核内配置(染色体テリトリー)が接近しこれらの染色体間で転座が起こりやすくなることを明らかにして以来(Kuroda, Oikawa et al., J. Cell Sci. 117: 5897-5903, 2004)、本来CHOPの5'-UTRだった配列に由来するTLSとCHOPの融合部分をエピトープに利用したTLS-CHOP特異的モノクローナル抗体を作成し(Oikawa et al., Am. J. Surg. Pathol. 30: 351-356, 2006)、TLS-CHOPが抗腫瘍活性を持つMDA-7の発現をmRNAレベルで抑制することや(Oikawa et al., Br. J. Cancer 106: 1976-1979, 2012)、そのMDA-7抑制をトランスフォーム活性を持つDOL54が仲介していること(Oikawa et al., 485: 209-214, 2017)、また、TLS-CHOPがmiR-486の発現抑制を介して腫瘍増殖と転移促進の機能を持つPAI-1の発現誘導をおこすこと(Borjigin, Oikawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 427: 355-360, 2012)などを明らかにしてきた。さらに、国内外の他の研究グループによってもTLS-CHOP の様々な下流分子が同定されてきており、それらを介した多段階の腫瘍関連メカニズムが想定されている。しかし、それらの分子機構には未解明な部分も多い。近年、新規抗癌剤ET-743 (trabectedin)が粘液型脂肪肉腫に有効であることが判明した。その詳細な作用機序は未だに不明ながら、ET-743はTLS-CHOP の機能を阻害し脂肪分化を誘導することが分かっている。従って、TLS-CHOPに制御される腫瘍関連分子機構の解明は、新規分子治療法の開発を考えるためにも益々その重要性が増して来た。

一方、TLS はRNA 結合タンパクであり、近年、様々な細胞機能に関わる多様なRNA と結合し、その転写後調節にも関わることが示唆された。また、TLS がlong noncoding RNA (lncRNA)との結合を介して標的分子の発現を制御することも報告されている。従って、TLS-CHOPの存在が、TLS に結合する機能性RNA群の機能発現に変化を及ぼし、それが腫瘍化や腫瘍増殖に寄与するというメカニズムが想定できる。このメカニズムに関与するRNA 群を同定する実験計画を検討した場合、近年の次世代シーケンサーを用いた研究手法の進化により、現在、技術的・資金的に比較的容易に実施できる状況になってきた。

2. 研究の目的

(1) TLS-CHOP の新規下流分子群の同定と機能解析、及び他の分子との機能的相互作用の検討
以前より、TLS-CHOP の下流で腫瘍関連機能に関わる分子群の新規同定を進めてきており、これまでにDOL54、PAI-1、MDA-7などが挙がって来ていたが、これらの分子、及びまだ解析が進んでいない候補分子群について、その機能解析、及び他の分子との相互作用を検討する。

(2) TLS に結合する機能性 RNA の機能発現の変化と腫瘍機能との関わりの検討

TLS-CHOP 発現の有無による細胞内の全トランスクリプトームの発現状況の違いを、次世代シーケンサーを用いて検討する。そして、発現量に有意な変化があるRNA 群の機能を解析し、腫瘍関連機構との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) TLS-CHOP の新規下流分子群の同定と機能解析、及び他の分子との機能的相互作用の検討
以前の研究において、TLS-CHOP 下流で腫瘍関連機能に関わる分子として同定されたDOL54、PAI-1、MDA-7のうち、DOL54 と PAI-1 は腫瘍化や腫瘍の進展に寄与するが、MDA-7 は抗腫瘍活性を持ち TLS-CHOP の存在により発現抑制を受けている。しかし、DOL54 と PAI-1 の粘液型脂肪肉腫細胞における機能の詳細は未だに不明の部分も多く、また、これらの分子間の相互作用については、まだ、DOL54 が MDA-7 の転写抑制に関与することが示唆された以外、ほとんど分かっていない。そこで、これらの分子の特異的 siRNA を用いたシングルノックダウンやダブルノックダウンによる粘液型脂肪肉腫由来の培養細胞の細胞動態の観察や、ウエスタンブロットティングや定量的real-time PCR などによる他の分子の発現量の変化の検討を通じて、これらの分子の粘液型脂肪肉腫における機能や分子間相互作用を解析した。また、以前の研究におけるマイクロアレイ解析などから、TLS-CHOP の存在により発現状況が変化した遺伝子群についても、それらのノックダウンを行うことを通じて検討を行なった。

(2) TLS に結合する機能性 RNA の機能発現の変化と腫瘍機能との関わりの検討

粘液型脂肪肉腫由来の培養細胞を用いて、TLS-CHOP をノックダウンした細胞とコントロールの細胞からそれぞれ全 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により、TLS-CHOP の有無で発現量が有意に異なる RNA を選別した。そして、それらの分子について、腫瘍関連機構への関与を検討した。その際、近年、TLS との結合を介した機能発現が報告されている lncRNA に特に着目した。

4. 研究成果

(1) TLS-CHOP の新規下流分子群の同定と機能解析、及び他の分子との機能的相互作用の検討
以前の研究により、粘液型脂肪肉腫においては、TLS-CHOP が DOL54 の異常な発現を誘導し、そ

れが抗腫瘍活性を持つ MDA-7 の転写を抑制することが、粘液型脂肪肉腫細胞の増殖維持に必須であることを解明した(Oikawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 485: 209-214, 2017)。一方、TLS-CHOP は PAI-1 も発現誘導し、PAI-1 をノックダウンすると粘液型脂肪肉腫細胞の増殖が抑制されることも報告した(Borjigin, Oikawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 427: 355-360, 2012)。本研究では、PAI-1 も MDA-7 の発現を抑制する機能を持つことが示唆されたが、PAI-1 をノックアウトしても DOL54 とは違い MDA-7 の mRNA 量は増加しなかった。そして、PAI-1 は DOL54 のような MDA-7 の転写の抑制ではなく、ユビキチン-プロテアソーム系による MDA-7 タンパクの分解による抑制を行うことが示唆された(投稿準備中)。従って、少なくとも粘液型脂肪肉腫においては、2つの分子経路で強力に MDA-7 の発現を抑制することで、腫瘍細胞を維持していることが分かった。これらの分子経路に関わる分子群は治療の新規標的分子として有用と想定される。

一方、以前の研究におけるマイクロアレイ解析などから得られた、TLS-CHOP により発現が変化した遺伝子群の検討では、めばしい結果は未だ得られていないが、研究項目 2 の次世代シーケンサーを用いた RNA-seq による解析から得られた結果のうち、coding RNA についての検討から、TLS-CHOP に最も発現誘導を受けていた mRNA が様々な腫瘍において腫瘍関連機能が報告されている転写因子 SOX11 をコードしていたため、これについてさらに検討を進めた。現在は、再び次世代シーケンサーを用いて、粘液型脂肪肉腫において SOX11 の下流で腫瘍関連機能を担う分子群の検索を行なっているところである。

さらに、RNA-seq による TLS-CHOP 下流の coding RNA の検討において、サーカディアンリズムを制御する時計遺伝子の 1 つに発現量の変化が見られた。以前の研究により、サーカディアンリズムの乱れががん化の重要な要因になることが示唆されており、また、1日の中の投薬のタイミングが薬効に大きく影響する例が報告されている。従って、粘液型脂肪肉腫の発生機構や薬剤治療を考える上で、今後、サーカディアンリズムが重要な要素の 1 つとなってくる可能性が出てきた。現在、これらに関しても詳細な解析を進めることを検討している。

(2) TLS に結合する機能性 RNA の機能発現の変化と腫瘍機能との関わりの検討

本項目では、次世代シーケンサーを用いて、TLS-CHOPの有無により発現量が変化するRNAを網羅的に解析するRNA-seqの結果の中から、lncRNAに着目して検討を行なっている。しかし、lncRNAは、まだその発現状況や機能について未知のものが多いため、TLS-CHOPにより量が増減する多数のlncRNAの中からどの分子に着目して解析を進めるかについて現在選別中である。従って、TLS-CHOP が関与するlncRNAの機能発現の変化や腫瘍関連機能の解明には、まだしばらく時間がかかる見込みである。

また、研究の進行過程から新たに浮上してきたテーマとして、「粘液型脂肪肉腫の脂肪分化誘導による新規治療法の開発」がある。他の研究グループの研究により、MKL1をノックアウトすると脂肪前駆細胞が脂肪分化するという報告があったため、本研究において、粘液型脂肪肉腫細胞でMKL1をノックアウトし、細胞数がコンフレントに達した後、脂肪分化誘導培地に細胞を置いたところ、脂肪滴が発生した。従って、粘液型脂肪肉腫の分化療法の開発を考える際、MKL-1は有力な分子標的の候補となることが分かった(投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Fuyuki, Bhawal Ujjal K., Sugiyama Nao, Osaki Shoko, Oikawa Kosuke, Muragaki Yasuteru	4. 巻 2
2. 論文標題 Potential Role of DEC1 in Cervical Cancer Cells Involving Overexpression and Apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clocks & Sleep	6. 最初と最後の頁 26~38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/clockssleep2010004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤冬樹、パワールウジャー、及川恒輔、村垣泰光
2. 発表標題 サイトケラチン14 とサイトケラチン17 は、腺癌浸潤部の微小集塊状領域において高発現している
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 及川恒輔、佐藤冬樹、黒田雅彦、尾崎敬、村垣泰光
2. 発表標題 粘液型脂肪肉腫においてTLS-CHOP は抗腫瘍性サイトカインIL-24 を多重機構で抑制する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山奈生、佐藤冬樹、尾崎祥子、パワールクマール、及川恒輔、村垣泰光
2. 発表標題 子宮頸癌においてBHLH 型転写因子DEC1 発現は幹細胞マーカーSOX2 とc-MYC 発現を制御する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuyuki Sato, Ujjarl Bhawal, Kosuke Oikawa, Yasuteru Muragaki
2. 発表標題 Smad3 suppresses epithelial cell migration and proliferation via the clock gene Dec1
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Oikawa, Fuyuki Sato, Yasuteru Muragaki
2. 発表標題 Promotion of adipocyte differentiation of myxoid liposarcoma cells by inhibition of MKL1 expression
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 及川恒輔、木下洸樹、中川裕貴、佐藤冬樹、尾崎敬、村垣泰光
2. 発表標題 粘液型脂肪肉腫特異的キメラがんタンパクTLS-CHOPの新規下流分子の検索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Oikawa, Fuyuki Sato, Yasuteru Muragaki.
2. 発表標題 Analysis of dual mechanism of IL-24 suppression in myxoid liposarcoma cells.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fuyuki Sato, Ujjal Bhawal, Kosuke Oikawa, Yasuteru Muragaki.
2. 発表標題 Clock geneDEC1 regulates the expression of stem cell marker genes SOX2 and c-MYC in cervical cancer.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kosuke Mori, Fuyuki Sato, Kosuke Oikawa, Yasuteru Muragaki.
2. 発表標題 CK14 and CK17 are partially expressed in microaggregate form of invasive cells of pancreatic cancer.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 及川恒輔、神川陽平、横田健斗、佐藤冬樹、尾崎 敬、村垣泰光
2. 発表標題 粘液型脂肪肉腫における腫瘍細胞維持及び脂肪分化阻害に関わる分子機構の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎敬, 田伏克惇, 渡邊雄也, 中西雅子, 佐藤冬樹, 及川恒輔, 覚道健一, 村垣泰光
2. 発表標題 マイクロ波による細胞現象の分子生物学的検討 - 甲状腺癌細胞株を使用して -
3. 学会等名 第37回Microwave Surgery 研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎敬, 田伏克惇, 渡邊雄也, 中西雅子, 佐藤冬樹, 及川恒輔, 覚道健一, 村垣泰光
2. 発表標題 マイクロ波効果による細胞現象の分子生物学的検討 - 甲状腺癌細胞株を使用して -
3. 学会等名 第61回日本臨床検査医学会近畿支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 1.尾崎敬, 田伏克惇, 渡邊雄也, 中西雅子, 佐藤冬樹, 及川恒輔, 覚道健一, 村垣泰光
2. 発表標題 マイクロ波効果で誘導されて未知なる細胞の検討 甲状腺癌細胞株を使用して
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kosuke Oikawa, Fuyuki Sato, Yasuteru Muragaki.
2. 発表標題 Analysis of multiple mechanisms of IL-24 suppression that is essential for growth of myxoid liposarcoma cells.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fuyuki Sato, Kosuke Oikawa, Yasuteru Muragaki.
2. 発表標題 BHLH transcription factor DEC1 and DEC2 play important roles in cancer cell metabolism
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 及川 恒輔、佐藤 冬樹、尾崎 敬、村垣 泰光
2. 発表標題 粘液型脂肪肉腫の新規腫瘍関連機構の検討
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 冬樹、Ujjal Bhawal、及川 恒輔、村垣 泰光
2. 発表標題 転写因子DEC1とDEC2は日内リズムと腫瘍の発育進展をクロストークする
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	村垣 泰光 (MURAGAKI Yasuteru) (40190904)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	