

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591628

研究課題名（和文） 骨軟部腫瘍におけるオーロラキナーゼの解析

研究課題名（英文） Analysis of Aurora Kinases in bone and soft tissue tumors

研究代表者

大野 貴敏 (OONO TAKATOSHI)

岐阜大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60281052

研究成果の概要：

ユーイング肉腫は小児にみられる悪性骨軟部腫瘍であり、骨肉腫に次いで頻度が高く生命予後不良な疾患である。この腫瘍の約 90% に存在する融合遺伝子 EWS-Fli1 は、強力な転写因子としてテロメラゼ、血管内皮増殖因子、ホスホリパーゼ D2 (PLD2) などを調節し腫瘍化を促進すると考えられている。Aurora A および Aurora B はセリン・スレオニンキナーゼの一種で、細胞周期の制御に重要な役割を果たし、様々な癌細胞において過剰発現していることが知られている。今回、EWS 融合遺伝子が、Aurora キナーゼ遺伝子のプロモーターに直接結合してその発現を促進することを明らかとした。この知見はユーイング肉腫の治療の標的として Aurora キナーゼが有望である可能性を示唆する。

一方我々は以前、EWS/Fli-1 が phospholipase D2(PLD2)を介して、細胞内増殖シグナルである MEK/ERK 経路や PI3K/Akt 経路を活性化することを報告した。今回、これらの経路を阻害することで、ユーイング肉腫の、抗がん剤に対する感受性を高め、治療効果を促進することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,600,000	0	2,600,000
2007 年度	500,000	150,000	650,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	300,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：(1) ユーイング肉腫 (2) EWS-Fli1 融合遺伝子 (3) オーロラキナーゼ

(4) 骨軟部腫瘍 (5) 転写因子 (6) 癌遺伝子

1. 研究開始当初の背景  
ユーイング肉腫の約 90% に融合遺伝子

EWS-Fli1 が存在するが、これまでわれわれはこの融合遺伝子の解析を進め、この遺伝子産物が塩基配列特異的な DNA 結合蛋白であり、

強力な転写因子としてテロメラゼ、血管内皮増殖因子、ホスホリパーゼ D2 (PLD2) などを調節し腫瘍化を促進することを報告した。さらに EWS-Fli1 を標的とした分子標的治療の研究を進め、この遺伝子を特異的に抑制する siRNA やリボザイムなどを合成し、その抗腫瘍効果を示した。その研究過程で EWS 融合遺伝子が Aurora kinase を activate する結果を得た。Aurora A および Aurora B はセリン・スレオニンキナーゼの一種で、細胞周期の制御に重要な役割を果たし、様々な癌細胞において過剰発現していることが知られているが、ユーイング肉腫との関連は不明である。一方、これまで多くの腫瘍細胞において、細胞内増殖シグナルである MEK/ERK 経路や PI3K/Akt 経路の活性化が報告されている。更に化学療法薬の使用により、高率にこれらのシグナル経路が活性化される。我々は EWS/Fli-1 が phospholipase D2(PLD2) を介して、これらの細胞増殖シグナル経路を活性化することを以前報告した。

## 2. 研究の目的

EWS-Fli1 が Aurora キナーゼ(Aurora A および Aurora B)の発現を促進する機構を明らかにすること。さらに MEK/ERK 経路や PI3K/Akt 経路の阻害剤が、ユーイング肉腫に対して抗腫瘍効果を有するかを明らかにすること。

## 3. 研究の方法

- 1) EWS-Fli1 を発現する細胞として TC135 および A673 を用い、EWS-Fli1 を発現しない細胞として HT1080 を用いた。siRNA や遺伝子を導入した細胞の mRNA 量やタンパク質量は RT-PCR およびウェスタンブロット法で測定した。
- 2) Aurora A および B のプロモータープラスミドは、それぞれの遺伝子の-1486 から+354 および-1879 から+392 の領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子(pGL3)に接続して構築し、ルシフェラーゼ活性はルミノメーターを用いて測定した。Aurora A および B プロモーターの部分欠失遺伝子を用いて、EWS-Fli1 による活性化に必要な領域を同定した。
- 3) Aurora A および B のプロモーター領域の Ets 結合部位の変異体を作成しルシフェラーゼアッセイによって、EWS-Fli1 の結合部位を同定した。
- 4) EWS-Fli1 と Aurora A および B プロモーターの結合は、クロマチン免疫沈降法によって確認した。Aurora A, B プロモーターの転写開始部位付近の primer 或いは1000bp以上上流の primer を用いて免疫沈降物を鋳型に PCR を行った。
- 5) TC-135 に ActD を投与し、その細胞死誘

導効果を評価した。

- 6) ActDによって誘導される TC-135 の細胞死における caspase の関与を明らかにするため、caspase 活性を示す細胞を染色するとともに caspase 活性を測定した。また、caspase によって分解される PARP 蛋白をウェスタンブロット法にて観察した。
- 7) caspase の阻害剤である Z-VAD-FMK (100 $\mu$ M) を投与した際の、ActD によって誘導される caspase 3/7 活性、PARP 蛋白の分解および TC-135 の細胞死の変化を観察した。
- 8) EWS/Fli-1 に対する siRNA を TC-135 細胞へ導入して EWS/Fli-1 の発現を抑制した際の、ActD による PARP 蛋白の分解量をウェスタンブロット法にて解析した。
- 9) 細胞内シグナル伝達系において ERK の上流に存在する MEK の阻害剤 U0126 (5 $\mu$ M)、もしくは Akt の上流に存在する PI3K の阻害剤 LY294002 (10 $\mu$ M) の存在下で TC-135 細胞に ActD を投与し、細胞の増殖抑制効果を検討した。さらに ERK および Akt のリン酸化と PARP 蛋白の分解量をウェスタンブロット法にて解析した。
- 10) TC-135 細胞をヌードマウスの皮下に接種し腫瘍を形成させ前述の薬剤の抗腫瘍効果を検討した。実験群を①vehicle (PBS) 群、②ActD (0.045mg/kg) 単独投与群、③ActD (0.225mg/kg) 単独投与群、④U0126 (4mg/kg) と LY294002 (20mg/kg) 併用投与群、⑤ ActD (0.045mg/kg) と U0126 (4mg/kg) と LY294002 (20mg/kg) 併用投与群とし、薬剤を週 1 回腹腔内投与した。腫瘍サイズは  $V = 0.5 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$  とし、3 日に 1 回、4 週にわたって計測した。

## 4. 研究成果

- 1) EWS-Fli1 を発現する TC135 細胞に EWS-Fli1 の siRNA を導入して、EWS-Fli1 の mRNA およびタンパク量が減少することを確認したが、Aurora A および Aurora B の mRNA およびタンパク量も低下することが明らかとなった。
- 2) EWS-Fli1 を発現する TC135 および A673 細胞では、EWS-Fli1 を発現しない HT1080 細胞に比べて Aurora A および B のプロモーター活性は、有意に上昇した。
- 3) EWS-Fli1 とともに種々の部分欠失させたプロモーターを挿入されたレポータープラスミドを導入した HT1080 細胞を用いて、EWS-Fli1 によるプロモーターの活性化に必要な領域が Aurora A では -124 から-75bp, Aurora B では-74 から

- +34bp であることが明らかとなった。
- 4) EWS-Fli1 の転写活性化領域内の Ets 結合部位の変異体を用いたルシフェラーゼアッセイにより, Aurora A では-84 から-81bp, Aurora B では -71 から-68bp の Ets 結合部位が重要であることがわかった。
  - 5) HT1080細胞に Flag-EWS-Fli1 を導入し, クロマチン免疫沈降を行い, Aurora A および B 共に野生型プロモーターを導入したもののみ転写開始部位付近の primer を用いた時にバンドを認めた。TC135細胞から, Fli1 抗体にてクロマチン免疫沈降を行った後, 転写開始部位付近の primer を用いた PCR によって Aurora A, B promoter とともにバンドを確認した。このことは EWS-Fli1 が細胞内で Aurora A および B のプロモーターと直接結合することを示している。Ewing 肉腫細胞株 TC-135 に対し, ActD はその濃度および作用時間依存性に細胞死を誘導した。
  - 6) ActD を投与した細胞群で, caspase の活性を示す細胞の比率が優位に上昇していた。更に, 死細胞中に占める caspase 活性陽性細胞の比率は 90%以上であり, ActD により誘導される細胞死のほとんどは caspase-dependent apoptosis であることが判明した。また, ActD はその濃度および作用時間依存性に TC-135 細胞の PARP 蛋白の分解と caspase 3/7 活性を誘導した。
  - 7) Z-VAD-FMK によって, ActD により誘導される TC-135 細胞の caspase 3/7 活性や PARP 蛋白の分解は有意に阻害された。しかしながら, ActD 投与に伴う細胞死を有意に救済することはできず, caspase 活性を示す細胞を有意に減少させることもできなかった。これは, TC-135 細胞において Z-VAD-FMK が全ての caspase を阻害することができず, caspase 3/7 は ActD により誘導される TC-135 細胞死に部分的にのみ関与していると考えられた。
  - 8) EWS/Fli-1 siRNA は TC-135 細胞の EWS/Fli-1 蛋白の発現を有意に抑制し, その後投与された ActD による PARP 蛋白の分解を有意に促進させた。すなわち EWS/Fli-1 は, apoptosis に関与する様々な細胞死シグナルを抑制していることが判明した。
  - 9) ActD は TC-135 細胞の ERK および Akt のリン酸化を促した。Akt のリン酸化は ActD 投与 3 時間後から開始し, ERK のリン酸化は投与 9 時間後より開始していた。ActD に U0126 や LY294002 を併用投与することで, TC-135 の細胞死誘導効率が上昇し, ActD 単独投与での IC50 が

- 18.91ng/ml だったのに対し, U0126 併用時は 5.79ng/ml, LY294002 併用時は 4.83ng/ml, U0126 および LY294002 併用時は 3.34ng/ml であった。ActD 単独投与に比し, LY294002 併用時は約 2 倍の PARP 蛋白が分解された。これに対し, U0126 併用時には, やや PARP 蛋白の分解量はわずかであった。以上より TC-135 細胞において MEK/ERK 経路は PI3K/Akt 経路よりも細胞生存と apoptosis の抑制において重要であることが判明した。
- 10) ActD 投与群 (0.045mg/kg, 0.225mg/kg とともに) は, vehicle 群に比し有意に腫瘍増大を抑制した。U0126 と LY294002 の併用投与は, ActD の腫瘍増大抑制作用を有意に増強した。

#### 【考察・結論】

ユーイング肉腫細胞 TC135 において, EWS-Fli1 のノックダウンによって EWS-Fli1 のみならず Aurora A や B の mRNA とタンパク質の両方ともに減少し, Aurora A および B の転写が EWS-Fli1 によって調節されていることが示された。Aurora A および B プロモーターの部分欠失遺伝子や Ets 結合部位の変異体を用いた実験, クロマチン免疫沈降法によって, EWS-Fli1 は Aurora A, および B のそれぞれ-84 から-81bp, -71 から-68bp の DNA 配列に結合して転写を活性化することが明らかになった。Aurora A に関しては, 他の Ets ファミリー転写因子 Ets2, E4TF1 が EWS-Fli1 と同じ-84 から-81 の DNA 配列を介して転写を活性化するが, Aurora B に関しては, Ets ファミリー転写因子として初めて EWS-Fli1 が-71 から-68bp に結合することを明らかにした。ユーイング肉腫細胞において, EWS-Fli1 により直接 Aurora A および B キナーゼの転写活性化が起こり, その発癌過程で重要な役割を果たすと考えられた。

加えて, Ewing 肉腫に対する ActD の抗腫瘍効果は, U0126 と LY294002 の併用投与により増強できることが示された。ユーイング肉腫の分子標的治療薬として, U0126 や LY294002 の有用性を示唆するものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yamamoto T, Ohno T, Wakahara K et al. Simultaneous inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase

pathways augment the sensitivity to actinomycin D in Ewing sarcoma. J Cancer Res. Clin. Oncol. 2009 Feb e-published (査読有)

2. Wakahara K., Ohno T. Kimura M. et al. EWS-Fli1 Up-Regulates Expression of the Aurora A and Aurora B Kinases Mol.Cancer Res.6:1937-1945,2008 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. Wakahara K., Ohno T. Kimura M. et al. EWS /Fli1 Fusion Gene Upregulate Aurora A Transcriptional Activity In Ewing's Tumor. 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. March 4, 2008. San Francisco, CA, USA
2. Ohno T, Oshima K, Shimizu K et al. Surgical outcome of giant cell tumor of bone. SICOT 24th Triennial World Congress. August 28, 2008. Hong Kong, China.
3. Yamamoto T, Ohno T, Shimizu K et al. Simultaneous inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways augment the sensitivity to actinomycin D in Ewing sarcoma. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. February 23, 2009. Las Vegas, Nevada, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大野 貴敏 (OONO TAKATOSHI)  
岐阜大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：60281052

### (2) 研究分担者

木村正志 (KIMURA MASASHI)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40260575

### (3) 連携研究者