

平成 21 年 3 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790713

研究課題名 (和文) 横紋筋肉腫におけるメチル化 DNA 領域網羅的解析による発癌機構の究明

研究課題名 (英文) Identification of methylated CpG islands using rhabdomyosarcoma DNA.

研究代表者

三沢 あき子 (MISAWA AKIKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10378755

研究成果の概要：正常骨格筋への最終分化が抑制された結果、異常増殖しているという特性を有する横紋筋肉腫の発がん機構の解明を目指し、横紋筋肉腫において特異的にメチル化されている遺伝子の同定を行った。今後、この遺伝子を標的とした分化誘導療法を含めた新規治療法の開発は、予後不良な横紋筋肉腫治療開発のブレークスルーとして、また、患者の血清 DNA を用いた同定遺伝子のメチル化解析は予後判定を含めた非侵襲的検査として、期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,500,000	0	2,500,000
2007年度	136,264	0	136,264
2008年度	863,736	259,120	1,122,856
年度			
年度			
総計	3,500,000	259,120	3,759,120

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・小児科学

キーワード: 小児がん、メチル化

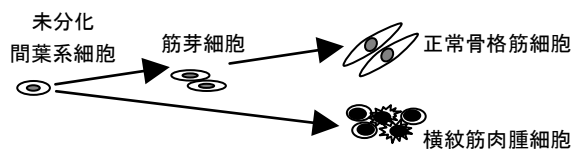
1. 研究開始当初の背景

(1) 横紋筋肉腫は小児で最も頻度の高い悪性軟部腫瘍である。病態としては、胎児の中胚葉または間葉組織に由来する悪性腫瘍であり、骨格筋の前駆細胞(骨格筋への分化を決定された未分化間葉系細胞)から発生すると考えられている。骨格筋分化制御遺伝子 *MyoD* には変異がないことが報告されており、その腫瘍細胞内には *MyoD* を発現しているにもかかわらず、なんらかの理由で骨格筋への最終分化が抑制された結果、異常増殖していると考えられていた。

(2) 予後不良の胞巣型横紋筋肉腫における腫瘍特異的キメラ遺伝子として、*PAX3-FKHR* および *PAX7-FKHR* が知られているが、この染色体転座に伴うキメラ遺伝子は、腫瘍形成の初期段階に極めて重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、完全な癌化には染色体転座のみでは不十分で、さらなる遺伝子変化の蓄積、特にキメラ遺伝子と協調して癌化を促進する遺伝子異常が必要であるが、未だ明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

- (1) 外科的治療・化学療法・放射線療法を組み合わせた集学的治療によっても横紋筋肉腫高リスク群の予後は、5年無病生存率25%未満となお不良であり、その発癌機構の究明および新規治療戦略の開発を目的として本研究を計画した。
- (2) 骨格筋への最終分化が抑制された結果、異常増殖しているという特性を有する横紋筋肉腫の発癌機構の解明を目指し、メチル化DNA領域の網羅的探索を可能にした新規手法を用いてアプローチし、横紋筋肉腫において特異的にメチル化されている遺伝子(癌抑制遺伝子および分化制御遺伝子)の同定を試みた。
- (3) 小児がんの発生前にDNAメチル化と共通する2つのキーワードである分化・発がんに関わるということに着目し、メチル化DNA領域の解析を行った。具体的には、正常骨格筋細胞に対する横紋筋肉腫細胞のメチル化状態の違いをゲノム網羅的に解析し、横紋筋肉腫において、特異的にメチル化されているDNA領域を明らかにすることを目的とした。



3. 研究の方法

このDNA上にある遺伝子をデータベースにより検索し、Bisulfite sequencing法にて確認した。

- (1) 横紋筋肉腫におけるメチル化DNA領域の網羅的解析:コントロールであるヒト正常横紋筋から抽出したDNAに比較して、ヒト横紋筋肉腫細胞株において高度にメチル化されているDNA領域を同定した。
- (2) 同定されたDNA断片上にある遺伝子のうち、5'領域のCpG islandに由来するものをデータベースサーチにより検索した。
- (3) 該当する遺伝子の5'領域のCpG islandメチル化状態を横紋筋肉腫細胞株および正常横紋筋においてBisulfite sequencing法、Methylation-specific PCR (MSP) 法およびCombined bisulfite restriction analysis (COB

RA) 法により確認した。

- (4) 3の5'領域が、その遺伝子の発現に関与しているプロモーター領域であることをLuciferase assayにより確認した。
- (5) 見出された遺伝子の発現を、横紋筋肉腫細胞株および正常横紋筋において、RT-PCR法、免疫染色法およびWestern blot法により検討した。
- (6) 横紋筋肉腫細胞株を脱メチル化剤5-aza-2'-deoxycytidineで処理し、遺伝子5'領域CpG islandの脱メチル化と遺伝子発現回復の関連を検討した。
- (7) 横紋筋肉腫臨床検体において、Bisulfite sequencing法、MSP法およびCOBRA法により上記遺伝子の5'領域のCpG islandメチル化状態を検討した。
- (8) 横紋筋肉腫臨床検体において、RT-PCR法、免疫染色法およびWestern blot法により上記遺伝子の発現レベルを検討した。
- (9) 7・8の結果とGroup分類、組織型(胎児型・胞巣型)、*PAX3-FKHR*、*PAX7-FKHR*の有無およびアウトカムを含めた因子との相関を統計学的に解析した。
- (10) 血清を用いて、予後を含めた横紋筋肉腫スクリーニング検査が可能であるか、横紋筋肉腫患者の治療前血清から抽出した血清遊離DNAを用いて上記遺伝子のメチル化状態を検討した。
- (11) 見出された遺伝子のコンストラクトを複製し、横紋筋肉腫細胞株にトランスフェクトし、細胞増殖・細胞形態におよぼす影響を検討した。
- (12) (11)において細胞増殖抑制・分化誘導効果が認められれば、新規治療開発を目指して、横紋筋肉腫マウスモデルにおける脱メチル化剤5-aza-2'-deoxycytidine、およびメチル化によりサイレンシングされている遺伝子導入による抗腫瘍効果を検討中である。

4. 研究成果

- (1) 該当遺伝子の発現は横紋筋肉腫細胞株においてサイレンシングされており、脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine 処理で発現が回復することを RT-PCR 法で確認した。
- (2) 横紋筋肉腫臨床検体においても該当遺伝子の 5' 領域の CpG island が高メチル化状態であったが、組織型・Group 分類・キメラ遺伝子の有無・アウトカムを含めた因子との相関を統計学的に解析した。
- (3) 予後不良な横紋筋肉腫治療を目的として、この遺伝子を標的とした新規治療法の開発を in vivo 実験で解析中である。
- (4) 横紋筋肉腫患者の血清遊離 DNA を用いた同定遺伝子のメチル化状態を解析した。今後、サンプル数を増やし、血清 DNA を用いた予後判定を含めた非侵襲的診断的検査法および治療効果判定のモニタリング法などを確立する予定である。

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4件)

- (1) Misawa A, Tanaka S, Yagyu S, Tsuchiya K, Iehara T, Sugimoto T, Hosoi H. RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients: a prognostic marker. Br J Cancer, 100 : 399-404, 2009. 査読有
- (2) Yagyu S, Gotoh T, Iehara T, Miyachi M, Katsumi Y, Tsubai-Shimizu S, Kikuchi K, Tamura S, Tsuchiya K, Imamura T, Misawa-Furihata A, Sugimoto T, Sawada T, Hosoi H. Circulating methylated-DCR2 gene in serum as an indicator of prognosis and therapeutic efficacy in patients with MYCN nonamplified neuroblastoma. Clin Cancer Res, 14: 7011-7019, 2008. 査読有
- (3) Tsuchiya K, Hosoi H, Misawa-Furihata A, Houghton PJ, Sugimoto T. Insulin-like growth factor-I has different effects on myogenin induction and cell cycle progression in human alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma cells. Int J

Oncol, 31: 41-47, 2007. 査読有

- (4) Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas. Oncogene, 26: 7401-7413, 2007. 査読有
- (5) Hosoi H, Kakazu N, Konishi E, Tsuchihashi Y, Hada S, Amaya E, Nakabayashi Y, Misawa-Furihata A, Tabata-Maruyama H, Iehara T, Sugimoto T, Yamane H, Yamasaki M, Shiwaku K, Yanagisawa A, Ono M, Tokiwa K, Iwai N, Hashiba M, Abe T, Sawada T. A novel PAX3 rearrangement in embryonal rhabdomyosarcoma. Cancer Genet Cytogenet, 189: 98-104, 2009. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三沢あき子(MISAWA AKIKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号:10378755

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: