

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年～2011 年

課題番号：21591926

研究課題名（和文）悪性骨軟部腫瘍発生における DNA 二本鎖切断修復異常の意義

研究課題名（英文）Abnormal DNA double-strand break repair in human malignant soft tissue tumors

研究代表者

田仲 和宏 (TANAKA KAZUHIRO)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究センター

研究者番号：10274458

研究成果の概要（和文）：本研究は、悪性骨軟部腫瘍の特徴的な染色体転座の発生メカニズムを明らかにするために、染色体転座を有する悪性骨軟部腫瘍細胞を用いて、DNA 二本鎖切断修復に関わる分子異常を明らかにすることを目的とした。ヒトユーイング肉腫より樹立された 2 細胞株を DNA マイクロアレイにより解析したところ、DNA 二本鎖切断修復遺伝子の多くで、発現レベルの上昇が観察された。これら遺伝子の発現異常がもつ病因論的意義は現時点では明らかではないが、染色体転座の発生メカニズムを考察する上で、極めて興味深い知見といえる。

研究成果の概要（英文）：Chromosomal translocations to generate chimaeric fusion genes are a hallmark of a group of soft tissue sarcomas. Whereas the pathogenic significance of these anomalous genes has been generally established in tumours of this category, the origin of gene fusion still remains unknown. Using DNA microarrays, we observed expression of the genes participating in the DNA double-strand break repair pathways. In two cell lines established from human Ewing's sarcomas, their expression was uniformly elevated. Aberrant expression of double-strand break repair genes may be generally associated with tumourigenesis by the chimaeric fusion genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学、発がん、染色体転座、DNA 二本鎖切断修復

1. 研究開始当初の背景
悪性骨軟部腫瘍の特徴として疾患特異的な染色体転座の存在が挙げられる。例えば

t(11;22)はユーイング肉腫の約 90%に存在し、転座により生じた融合遺伝子産物 EWS-Flt1 が発がんに寄与していると考えられている。

疾患特異的な転座とその結果生じる融合遺伝子産物の意義が次第に明らかになってきており、染色体転座は悪性骨軟部腫瘍発生の重要な要因であると考えられる。また、染色体転座による発がんは造血器腫瘍でも広く認められており、腫瘍発生において大きな比重を占める極めて重要なメカニズムと考えられる。しかし、悪性骨軟部腫瘍発生の真の原因とも言うべき染色体転座が生じる分子機構は解明されていない。

染色体転座が生じるためには、まず DNA 二本鎖の切断が生ずる必要があり、染色体転座を有する悪性骨軟部腫瘍の発生においても DNA 二本鎖切断が重要な意義を持つものと考えられる。しかし、通常生体内には DNA 二本鎖切断が生じて、それを修復する機構が存在する。従って、染色体転座発生に先立ち、これらの DNA 二本鎖切断修復機構の異常が存在する可能性が示唆される。近年これらの DNA 二本鎖切断修復を司る分子群が次々に同定されてきた。しかし、悪性骨軟部腫瘍にみられる染色体転座の生成過程における DNA 二本鎖切断修復とその異常の意義については、全く解析されていない。

2. 研究の目的

上述のように、悪性骨軟部腫瘍において、DNA 二本鎖切断修復の異常が、肉腫発生の真の原因とも言える染色体転座に繋がっている可能性がある。従って本研究では、悪性骨軟部腫瘍細胞における、DNA 二本鎖切断修復を担う分子の構造および発現の異常を網羅的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においては、染色体転座を有する悪性骨軟部腫瘍細胞を用いて、DNA 二本鎖切断修復に関わる分子異常を系統的かつ網羅的に明らかにすることを目的とした。

解析する DNA 二本鎖切断修復分子は、

- A. 共通経路: MRE11, NBS1, RAD50
- B. 相同組換え経路 (Homologous recombination: HR): RAD51, RAD52, RAD54
- C. 非相同末端結合経路 (Non-homologous

end joining: NHEJ): DNA-PKcs, Ku70 Ku80

の 3 グループ計 9 分子とした。

これらの各分子について、以下の発現解析、構造解析、修復活性解析を予定した。

1) 発現解析

染色体転座を有する代表的悪性骨軟部腫瘍であるユーイング肉腫細胞株 (SK-N-MC, RD-ES, SK-ES1, WE-68, VH-64) および滑膜肉腫細胞株 (SYO-1, HS-SY-II) を用いる。これらユーイング肉腫細胞株および滑膜肉腫細胞株より total RNA を抽出し、DNA microarray 等を用い、上述の遺伝子群の発現状態を網羅的に解析する。また、異常がみられたものについては、各細胞株より細胞抽出液を調製し、蛋白質レベルの発現量を Western blotting にて定量的に解析する。さらに、蛍光抗体を用いた免疫細胞化学的手法によりフォーカス形成を観察、細胞内の各蛋白質の局在を明らかにする。

2) 構造解析

ユーイング肉腫細胞株および滑膜肉腫細胞株より genomic DNA を抽出し、発現異常がみとめられた DNA 二本鎖切断修復遺伝子座について、genomic PCR により、コピー数の変化、塩基配列変化の有無について解析する。

3) 修復活性解析

B. 相同組換え経路(HR)

各種ユーイング肉腫細胞株および滑膜肉腫細胞株を用い、HR における修復活性について、

- (1) 電離放射線照射に対する感受性測定系
- (2) トポイソメラーゼ II 阻害剤に対する感受性測定系
- (3) ネオカセット導入プラスミド修復活性測定系

により解析する。

C. 非相同末端結合経路(NHEJ)

NHEJ における修復活性については、

- (1) 電離放射線照射に対する感受性測定系

- (2) プラスミドを用いた末端結合活性測定系により解析する。

4. 研究成果

初年度は、ユーイング肉腫細胞株 SK-N-MC、WE-68 細胞より total RNA を抽出し、正常ヒト初代培養線維芽細胞 MRC-5 を対照とした DNA マイクロアレイ解析を行った。さらに平成 22 年度は、同様な染色体転座が観察される典型例として、慢性骨髄性白血病細胞株 K-562 について、末梢単核球を対照として同様な解析をおこなった。その結果、DNA 二本鎖切断修復遺伝子の多くで、発現異常、とくに発現レベルの上昇が観察された。これら遺伝子の発現レベルの上昇がもつ病因論的意義は現時点では明らかではないが、疾患特異的な染色体転座を有する 2 つの独立した疾患において、共通な発現異常がみとめられたことは、染色体転座の発生メカニズムを考察する上で、極めて興味深い知見といえる。現在、このような特徴が疾患に普遍的な現象なのか、実際の臨床検体を用いて、免疫組織化学などによる検証を開始した。また、平行して培養細胞を用いた解析をすすめるため、SK-N-MC、WE-68 細胞における DNA 二本鎖切断修復遺伝子発現を免疫細胞化学により観察している。

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 5 件)

- 1) Tanaka K, Kawamoto H, Saito I, Yoshimura K, Fukuda H, Iwamoto Y: Preoperative and postoperative chemotherapy with ifosfamide and adriamycin for adult high-grade soft tissue sarcomas in the extremities: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0304. Jpn J Clin Oncol 39: 271-273, 2009 (査読有)
- 2) Iwamoto Y, Tanaka K, Isu K, Kawai A, Tatezaki S, Ishii T, Kushida K, Beppu Y,

Yamawaki S:

A multi-institutional phase II study of neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma (NECO study) in Japan: NECO-93J and NECO-95J.

J Orthoped Sci 14: 397-404, 2009

(査読有)

- 3) 田仲和宏: 非円形細胞軟部肉腫に対する化学療法 整形外科 61 : 821-825, 2010 (査読無)
- 4) 田仲和宏: 軟部腫瘍 がん治療レクチャー 1: 153-156, 2010 (査読無)
- 5) 田仲和宏: 悪性軟部腫瘍における化学療法の意義 癌と化学療法 39: 378-380, 2012 (査読無)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 田仲和宏、岩本幸英: 骨肉腫治療の未来 第 82 回日本整形外科学会学術総会 (2009 年 5 月 14 日、福岡)
- 2) 田仲和宏: 軟部肉腫の治療 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2009 年 11 月 5 日、横浜)
- 3) 平賀博明、田仲和宏、井樋栄二、米本司、比留間徹、大野貴敏、中山富貴、尾崎敏文、永田見生、岩本幸英: 骨肉腫の臨床試験への挑戦 第 84 回日本整形外科学会学術総会 (2011 年 5 月 12 日、横浜)
- 4) 田仲和宏、平賀博明、井須和男、岩本幸英: JCOG 骨軟部腫瘍グループにおける多施設共同臨床試験の実践体制 第 44 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2011 年 7 月 14 日、京都)

[図書] (計 1 件)

- 1) 田仲和宏: 骨腫瘍は集学治療だがどうしてこんなに

複雑なのか？

EBM 癌化学療法・分子標的治療法
584-588, 2010(中外医学社)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ia-nkcc.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田仲 和宏 (TANAKA KAZUHIRO)

独立行政法人国立病院機構九州がんセン
ター臨床研究センター・客員研究員

研究者番号：10274458