

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790366

研究課題名（和文） Ewing 肉腫における Dickkopf 分子の機能解析と
それを応用した治療法開発

研究課題名（英文） Analysis of Dickkopf molecule in Ewing's sarcoma

研究代表者

大喜多 肇 (Okita Hajime)

独立行政法人国立成育医療研究センター 小児血液・腫瘍研究部 室長

研究者番号：50317260

研究成果の概要（和文）：Ewing 肉腫において DKK1 は WNT による β カテニンの核内蓄積を抑制し、古典的 WNT シグナル経路を抑制すると考えられた。本分子は、xenograft モデルにおいて Ewing 肉腫の腫瘍形成を抑制するものの、細胞培養条件下では腫瘍形成や増殖の抑制は明らかではなく、血管新生等の他の要因の関与も考慮する必要があると考えられた。腫瘍抑制性の機能を有する RHO ファミリーの一分子が DKK2 によって発現低下し、腫瘍発生に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：DKK1 suppress nuclear accumulation of β -catenin induced by Wnt3a in serum starved Ewing's sarcoma cells and it is suggested that the DKK1 inhibit classical WNT signal in these cells. Although DKK1 suppress tumor formation in xenotransplantation model of Ewing's sarcoma, DKK1 added in the standard cell culture environment seems not to affect tumor formation nor proliferation. Tumor formation might be suppressed in vivo via mechanisms, like suppression of angiogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨、軟部、肉腫、Wnt、小児

1. 研究開始当初の背景

Ewing 肉腫は、小児・若年成人に好発する骨・軟部の悪性腫瘍であり、原発性骨悪性腫瘍の中では、骨肉腫に次ぐ頻度とされている。未分化な小円形細胞よりなる腫瘍で、特定の分化形質に乏しく、病理組織学的にも確定診断の困難な腫瘍の一つである。近年の分子病

理的解析より、腫瘍特異的な染色体転座 t(11;22)等によって、EWS 遺伝子と ETS ファミリー of 転写因子との融合遺伝子（EWS-FLI1、EWS-ERG、EWS-E1AF、EWS-ETV1、EWS-FEV）が形成されること、それらの産物が異常な転写因子として機能し、腫瘍発生において重要な役割を演じてい

ることが明らかとなってきた。
本腫瘍は、近年の化学療法、放射線療法、外科療法を含む集学的治療法の進歩により治療成績が向上してきたものの、転移のない限局例の5年生存率は50-70%程度、初診時に遠隔転移を有する症例の5年生存率は20%程度にとどまっており、未だに満足のものとはいえない。欧米を中心とした臨床研究による化学療法剤の組み合わせの検討により、治療成績は向上してきたが、その向上も限界となりつつある。近年では、米国においてIGF-1R antibody療法が試みられつつあるなど、分子標的療法が期待されている。**EWS-ETS**融合遺伝子が転写を調節する標的遺伝子として、**basic helix loop helix motif**を有する**Id2**をはじめとしていくつかの遺伝子が同定されている。更に、申請者らは、**Ewing**肉腫細胞、その他の小児の小円形細胞腫瘍の遺伝子発現プロファイル解析より、**Dickkopf family**分子である**DKK1**および**DKK2**が**Ewing**肉腫特異的融合遺伝子の標的遺伝子であることを明らかにした。**Dickkopf family**は、分泌性の**Wnt**シグナルのアンタゴニストで、ヒトでは**DKK1**~**DKK4**の4種類の分子が知られている。**DKK1**は、**Wnt**のco-receptorである**LRP5/6**に結合し、**Wnt**シグナルを抑制することが知られている。一方、**DKK2**は**DKK1**と構造的には類似しているが、**Wnt**抑制活性については未だに議論されている。**Ewing**肉腫の発生源地と想定される間葉系前駆細胞では、**DKK1**が高発現、**DKK2**が低発現で、**Ewing**肉腫の**DKK1**低発現、**DKK2**高発現と対照的であり、**DKK2**は**EWS-ETS**融合遺伝子によって発現が上昇する直接の標的遺伝子で、**DKK1**は**EWS-ETS**によって発現が低下するが、おそらく間接的な標的遺伝子であった。また、**DKK1**を過剰発現する**Ewing**肉腫細胞では、**SCID**マウスでの腫瘍形成が抑制されており、**DKK1**が腫瘍抑制遺伝子として機能することが示唆され、本分子が**Ewing**肉腫の分子標的治療法の候補であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、**Ewing**肉腫における**Dickkopf family**の機能を中心に解析し、その治療応用の可能性を明らかにすることを目的とした。まず、**Ewing**肉腫における**DKK1**の作用が、**Wnt**シグナルを介しているかどうかを明らかにし、また、網羅的発現解析等の手法から、**DKK1/2**が他の作用機序を持っているかどうか解析する。また、**DKK1**による腫瘍形成抑制効果が、**DKK1**が**Ewing**肉腫に発現することによる腫瘍抑制効果であるか、外部より添加された**DKK1**も**Ewing**肉腫に作用して、腫瘍形成を抑制するのか等を解析すること

により**DKK1**、あるいはその下流の分子が治療薬、治療標的として応用可能か解析する。**Ewing**肉腫に関する研究は、融合遺伝子とその下流の分子に関わる研究が主流であり、新規の治療標的として**IGF-R**が研究されているが、決定的な治療薬はまだ得られていない。一方、**Wnt**シグナルが様々な癌腫で腫瘍発生に関与していることが報告されているが、**Wnt**と**Ewing**肉腫の関連はあまり研究されておらず、**Wnt3a**や**DKK1**が**Ewing**肉腫細胞の神経突起形成を促すという報告があるのみである(Endo et al. 2008)。**DKK1**の腫瘍抑制分子としての報告は大腸癌などでなされている一方で、**DKK2**と腫瘍との関わりはほとんど報告されていない。**DKK1**と**DKK2**という**Dickkopf family**に属する遺伝子を解析し、それぞれが腫瘍抑制、腫瘍形成促進に機能するという仮説のもとに、**Dickkopf family**の腫瘍発生における機序を解析する。

3. 研究の方法

(1) **DKK**と**WNT**シグナル。血清非存在下のSK-ES1**Ewing**肉腫細胞に対して、recombinant **Wnt3a**(r**Wnt3a**)あるいはr**Wnt3a**とrecombinant **DKK1**を添加し、 β カテニンの免疫蛍光染色を行い細胞内局在、蓄積量の変化を解析した。また、**DKK1**、**DKK2**を導入した**UET13**細胞を用いて**DKK1**、**DKK2**条件培地を作製した。SK-ES1細胞を**DKK1**あるいは**DKK2**条件培地で培養し抗**\beta**カテニン抗体、抗リン酸化**\beta**カテニン抗体を用いたimmunoblotによりその発現量を検討した。**DKK1**、**DKK2**条件培地存在下でr**Wnt3a**添加後、抗**JNK**抗体、抗リン酸化**JNK**抗体を用いたimmunoblotにより**JNK**の発現量、リン酸化量の変化を検討した。

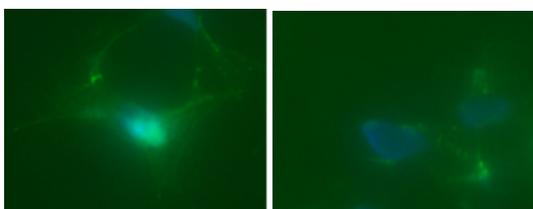
(2) **DKK1**を用いた治療法開発の検討。**DKK1**、**DKK2**条件培地をSK-ES1細胞に添加し、24, 48, 72時間培養し、MTT assayを行って増殖能を検討した。**DKK1**、**DKK2**条件培地、あるいはr**DKK1**とDMEM、軟寒天を混合し、35mm培養ディッシュ当たり5000個のSK-ES1細胞と混合し播種した。固化後、37°C、5%CO₂存在下で4週間、培養し、形成されたコロニー数を計測した。

(3) 網羅的発現解析を用いた**DKK1**、**DKK2**による腫瘍形成に係る機序の解析。SK-ES1細胞に**DKK1**あるいは**DKK2**を過剰発現する細胞(SK-ES1-**DKK1**、SK-ES1-**DKK2**)の遺伝子発現プロファイルをAffymetrix社の遺伝子発現チップGeneChip HG-U133Plus_2によって解析し、GeneSpringGXを用いて解析した。**DKK1**発現、**DKK2**発現によって、発現が変動する遺伝子群を抽出し、GSEA解析により発現量の変

化した遺伝子群を解析した。DKK1, DKK2 強制発現によって変化した遺伝子の発現を定量 PCR で確認し、一部に関しては、DKK2 抑制による発現変化も検討した。

4. 研究成果

(1) Ewing 肉腫における、DKK1 による、WNT 経路調節に関する解析。SK-ES1 細胞を rWnt3a にて刺激したところ 6 時間後に β カテニンの核への蓄積が観察された。rWnt3a と同時に rDKK1 を添加することにより β カテニンの核への蓄積は抑制され、DKK1 が WNT 古典経路を抑制することが示唆された。一方で、DKK1 による WNT の JNK-平面内細胞極性経路への効果は、DKK1 条件培地添加後の JNK および p-JNK 発現を immunoblot で検討したが、明らかな JNK, p-JNK への影響は同定できなかった。DKK1 による WNT の JNK-平面内細胞極性経路への影響は引き続き検討が必要と考えられた。



(左) Wnt3a。(右) Wnt3a+DKK1。

(2) DKK1, DKK2 による腫瘍形成、増殖に対する効果の解析。DKK1 過剰発現 SK-ES1 細胞では、xenograft 上の腫瘍形成が抑制されることから DKK1, DKK2 が Ewing 肉腫の細胞増殖・腫瘍形成・細胞死に与える影響を解析した。まず、UET13 細胞に DKK1, DKK2 を発現させて条件培地を作製した。DKK1, DKK2 条件培地により SK-ES1 細胞の明らかな細胞死誘導効果はみられなかったため、MTT assay を行って増殖能を検討したところ、DKK1 で軽度の細胞増殖の亢進が観察された。次に、DKK1, DKK2 条件培地を用い、SK-ES1 細胞のコロニー形成試験を行ったところ、DKK1 条件培地ではコロニー形成能に変化はなく逆に DKK2 条件培地でコロニー形成能が低下していた。DKK1 条件培地では、明らかなコロニー形成能抑制が見られなかったため、更に rDKK1 を用いてコロニー形成試験を行ったが、こちらも DKK1 による腫瘍形成抑制効果は認めなかった。さらに DKK1, DKK2 を過剰発現する SK-ES1 細胞を用いたコロニー形成試験においても明らかな腫瘍形成促進あるいは抑制効果は認められず、DKK1 による腫瘍抑制効果は、xenograft のような in vivo の系のみ限定されていた。以上より、通常の細胞培養条件下では、DKK1 による腫瘍形成抑制効果、増殖抑制効果は、明らかなものは観察されず、in vivo での環境が必要と考えられた。本研究開始以降に

DKK の血管内皮へ与える効果も報告されており、DKK が血管新生を促進あるいは抑制する可能性も考慮すべきと考えられた。

(3) DKK1/DKK2 過剰発現による Ewing 肉腫の遺伝子発現に与える影響。DKK1 あるいは DKK2 を過剰発現する SK-ES1 細胞の網羅的遺伝子発現解析の結果、DKK1 によって変化する遺伝子群、DKK2 によって変化する遺伝子群を同定した。そのうち DKK1 過剰発現により R an binding protein 1 の family、Small chemokine 等が上昇しており、DKK2 過剰発現により、cell adhesion に関連する分子の発現の変動が観察された。DKK2 によって発現低下する分子の中には、腫瘍抑制性に機能する RH 0 ファミリーの一分子があり、DKK2 抑制により同分子の発現が回復し、DKK2 発現による腫瘍化に関与している可能性が示唆された。

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 3 件)

① 陳基明, 牧本敦, 横山良平, 角美奈子, 尾崎敏文, 石井猛, 川井章, 山田健志, 田地野崇宏, 石田剛, 大喜多肇, 川本博, 浅見恵子, 麦島秀雄. Ewing 肉腫. 小児外科. 査読無, 43(11), 2011, 1229-1233.

② Miyagawa Y, Okita H, Hiroyama M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A, Kiyokawa N. A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. Tissue Eng Part A. 査読有, 17, 2011, 513-21.

③ 石田剛, 大喜多肇, 長谷川匡, 秦順一, Ewing 肉腫の病理診断上の問題点. 日本整形外科学会雑誌, 査読無, 84, 2010, 1126-1131

〔学会発表〕(計 4 件)

① 大喜多肇, 秋元信吾, 宮川世志幸, 近森穰, 藤本純一郎, 小林健一郎, 秦順一, 清河信敬. ユーイング肉腫ファミリー腫瘍における EWS/ETS 融合遺伝子の標的遺伝子 DKK1/DKK2 の腫瘍形成における役割. 第 101 回日本病理学会総会, 平成 24 年 4 月 26 日, 東京.

② 大喜多肇, 近森穰, 宮川世志幸, 秋元信吾, 小林健一郎, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. ユーイング肉腫ファミリー腫瘍における

Dickkopf ファミリー分子の発現制御とその意義, 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成 23 年 11 月 26 日, 前橋.

③Okita H, Iijima K, Fujimoto J, Kiyokawa N, Dietary bioflavonoids induce apoptosis in Ewing sarcoma cells. 第 70 回日本癌学会学術総会, 平成 23 年 10 月 5 日, 名古屋.

④上野瞳, 大喜多肇, 清河信敬, 小児腎肉腫における DNA メチル化解析. 第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 14 日, 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大喜多 肇 (Okita Hajime)

研究者番号 : 50317260

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号 :