

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893202

研究課題名(和文)細胞周期に伴ったPAX3-FOXO1A発現量の変化とその意義の解明

研究課題名(英文)The investigation of cell-cycle dependent expression of PAX3-FOXO1A in Rhabdomyosarcoma.

研究代表者

菊地 顕(kikuchi, ken)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40453104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：横紋筋肉腫は、小児で最も頻度の高い軟部悪性腫瘍であり、その1亜型である胞巣型、特にPAX3-FOXO1を発現している腫瘍の予後は極めて不良である。我々PAX3-FOXO1の発現量をQPCR、Western blot、および免疫組織化学で確認、またPAX3-FOXO1 promoter活性をYFPで測定した。FACS sortingを用い、細胞周期特異的細胞を抽出、PAX3-FOXO1を特異的にノックダウンした後、mRNAアレイ、機能解析を行った。PAX3-FOXO1は細胞周期G2期特異的に発現量が亢進していること、G2/M特異的にチェックポイント適応遺伝子を調節していることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Rhabdomyosarcoma falls into one of two biologically distinct subgroups represented by embryonal or alveolar histology (ARMS), which harbors a PAX3-FOXO1 fusion gene and has an extremely poor prognosis. Murine ARMS primary cultures were obtained from the Myf6Cre, PAX3-FOXO1, p53 conditional mouse model of ARMS. To elucidate the dynamical function of PAX3-FOXO1, time-lapse experiments, cell cycle analysis, QPCR, western blotting, immunohistochemistry, mRNA array and in vivo transplantation experiments were performed using murine ARMS primary cell culture with or without PAX3-FOXO1 knockdown treated by irradiation, or selected for ploidy using hoechst33342 sorted cell cycle-specific cells. The expression level of PAX3-FOXO1 was discovered to be dynamic and to vary during the cell cycle in murine and human ARMS cells. PAX3-FOXO1 is enriched in G2 and triggers at transcriptional program conducive to checkpoint adaptation in genome-wide expression analysis and QPCR.

研究分野：小児固形腫瘍

キーワード：PAX3-FOXO1 胞巣型横紋筋肉腫

1. 研究開始当初の背景

我々は以前コンデショナルノックインアプローチを用い分化骨格筋細胞に *Pax3:Foxo1a* を発現させることにより、初のマウス aRMS モデル作成に成功した。*Pax3* の下流に *Lox* で挟まれた *Foxo1a* を挿入、Cre リコンビナーゼによって、*Pax3* が *Pax3:Foxo1a* に変換されるようなコンストラクトを作成し、Cre が *Myf6* で誘導されるようデザインすることで、最終分化した骨格筋でのみ *Pax3:Foxo1a* が発現するような仕組みを作成した。この腫瘍細胞では *Pax3:Foxo1a* のプロモータ活性が eYFP で簡便に測定できる (図 1)。興味深いことに、このマウス aRMS 組織での *Pax3:Foxo1a* の発現は不均一であった。このことは *Pax3:Foxo1a* が動的に制御されていることを示唆する。

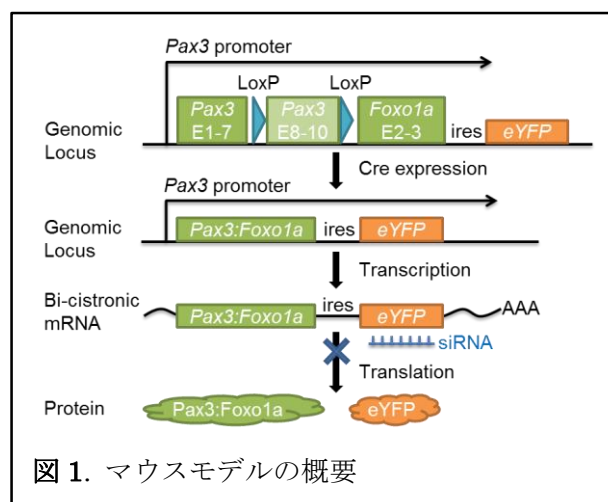
細胞は様々な細胞周期チェックポイントによって DNA ダメージを監視され、遺伝子の質が保たれている。G₁ チェックポイントでは DNA 複製前の DNA 修復が、G₂ チェックポイントでは有糸分裂前の DNA 修復が行われる。腫瘍抑制因子 p53 はもっとも有名なチェックポイント関連タンパクで、G₁ および G₂ のチェックポイントに働いているとされているが、最近 G₂ チェックポイントには必要ないとの報告もある。横紋筋肉腫は他の腫瘍と同様、p53 経路の異常が多数報告されており、その 85% が何らかの p53 機能異常を伴っている。また、我々のマウスモデルにおいても p53 機能異常がマウス ARMS の発生頻度を増やすことが分かっている。これらのことは、ARMS における G₂/M チェックポイントの重要性を示唆している。

2. 研究の目的

横紋筋肉腫 (RMS) は小児で最も多い軟部肉腫である。RMS 全体としての予後は改善を認めるが、二大組織亜型の一つである胞巣型横紋筋肉腫 (ARMS)、特にその特異的キメラ遺伝子 *PAX3-FOXO1A* (*PAX3-FKHR*) の発現を認めるものの

予後は依然不良であり、その生存率は 40 年間改善を認めない。我々はこの *PAX3-FOXO1A* に着目し横紋筋肉腫の病態解明を行ってきた。今回の研究の目的は *PAX3-FOXO1A* が細胞周期に伴った動的な発現量の変化を示すことに注目しその機能解明を行うことである。具体的な目的は、

1. 細胞周期に伴った PAX3-FOXO1A 発現の変化を確認する。
2. 細胞周期に伴った PAX3-FOXO1A 機能の変化を、G₂/M チェックポイントに着目して確認する。



3. 研究の方法

- (1) 細胞周期に伴った PAX3-FOXO1A 発現の変化を確認する。

PAX3-FOXO1A 発現の変化が普遍的、確実なものであることを示すために、いくつかのマウス、人 aRMS 細胞を用い以下の手技を用い観察する。

A) QPCR、Western blot

B) eYFP 活性タイムラプス撮影

- (2) 細胞周期に伴った PAX3-FOXO1A 機能の変化を、G₂/M チェックポイントに着目して確認する。PAX3-FOXO1A 機能の変化が普遍的、確実なものであることを示すために、in vivo を含む以下の手技を用い観察する。

A) 免疫染色

- B) FACS による細胞周期およびアポトーシス解析
 C) マウス同所性移植

4. 研究成果

(1) マウス ARMS 細胞において PAX3-FOXO1 プロモータ活性は細胞周期に伴って変化した (図 2)。

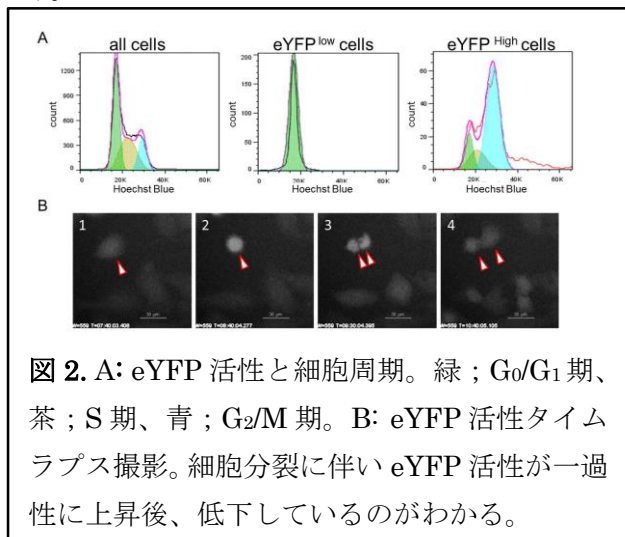


図 2. A: eYFP 活性と細胞周期。緑 ; G₀/G₁ 期、茶 ; S 期、青 ; G₂/M 期。B: eYFP 活性タイムラプス撮影。細胞分裂に伴い eYFP 活性が一過性に上昇後、低下しているのがわかる。

(2) マウス ARMS 細胞、ヒト ARMS 細胞において PAX3-FOXO1 は G₂ 期特異的に高発現していた (図 3)。

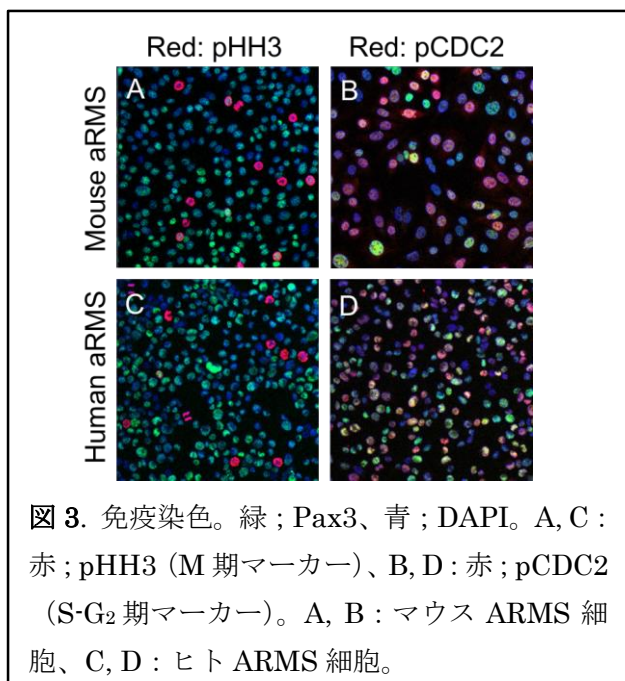


図 3. 免疫染色。緑 ; Pax3、青 ; DAPI。A, C : 赤 ; pHH3 (M 期マーカー)、B, D : 赤 ; pCDC2 (S-G₂ 期マーカー)。A, B : マウス ARMS 細胞、C, D : ヒト ARMS 細胞。

(3) PAX3-FOXO1 は G₂/M 期に多くの G₂/M チェックポイント適応遺伝子の発現を誘導していた (図 4)。

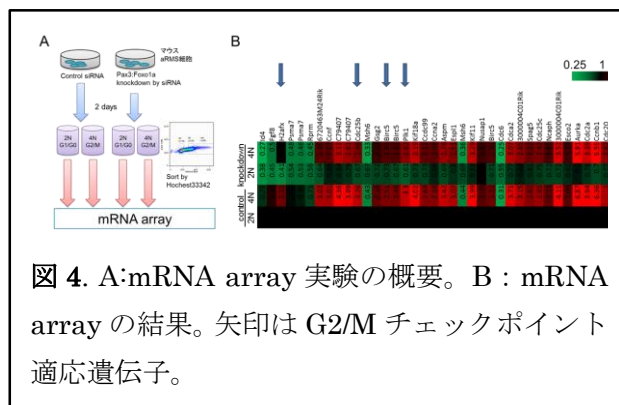


図 4. A: mRNA array 実験の概要。B: mRNA array の結果。矢印は G₂/M チェックポイント適応遺伝子。

(4) PAX3-FOXO1 は、放射線照射によって誘導された二本鎖 DNA 切断があるにもかかわらず、細胞周期を進行させた (図 5)。

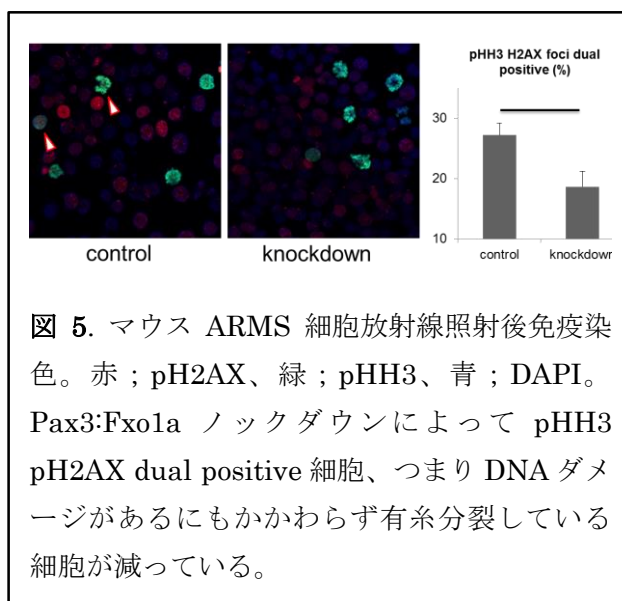


図 5. マウス ARMS 細胞放射線照射後免疫染色。赤 ; pH2AX、緑 ; pHH3、青 ; DAPI。Pax3:Fxo1a ノックダウンによって pHH3 pH2AX dual positive 細胞、つまり DNA ダメージがあるにもかかわらず有糸分裂している細胞が減っている。

(5) In vivo において、ストレスのかからない状態では PAX3-FOXO1 ノックダウンでの腫瘍生着率に違いは認めなかったが、放射線照射後ではノックダウンした細胞の生着率、増殖率の低下を認めた (図 6)。

近年、PAX3-FOXO1 は ARMS 特異的腫瘍マーカーとしてだけではなく、異常活性化された転写因子として、その下流の標的分子やシグナル伝達についての研究が進んでいる。いままでにも PAX3-

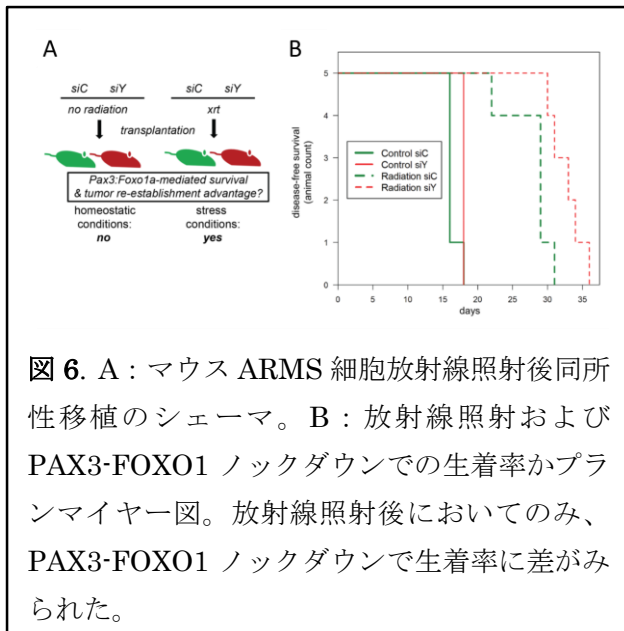


図 6. A : マウス ARMS 細胞放射線照射後同所性移植のシエマ。B : 放射線照射および PAX3-FOXO1 ノックダウンでの生着率かプランマイヤー図。放射線照射後においてのみ、PAX3-FOXO1 ノックダウンで生着率に差がみられた。

FOXO1 導入前後での網羅的 mRNA 解析や Chip-seq の報告があるが、今回我々は細胞周期 G2/M 細胞のみを抽出し、それを用いマイクロアレイを行うことで、今までは多くの G0/G1 期細胞に埋もれて見えてこなかった G2/M チェックポイント遺伝子の動きを明らかにすることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. Kikuchi K, Hettmer S, Aslam MI, Michalek JE, Laub W, Wilky BA, Loeb DM, Rubin BP, Wagers AJ, Keller C. Cell-cycle dependent expression of a translocation-mediated fusion oncogene mediates checkpoint adaptation in rhabdomyosarcoma. PLoS Genet. 2014 Jan;10(1): e1004107.

doi: 10.1371/journal.pgen.1004107. 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. 菊地 颯, Hettmer S, Wagers AJ, Rubin BP, Keller C, 細井 創. Effects of PAX 3 -FOXO 1 in alveolar rhabdomyosarcoma. 第 118 回日本小児科学会学術集会. 2015/4/17-4/19. 大阪

2. Kikuchi K, Hettmer S, Aslam MI, Michalek JE, Laub W, Wilky BA, Loeb DM, Rubin BP, Wagers AJ, Keller C, Hosoi Hajime. Cell-cycle

dependent expression of a translocation-mediated fusion oncogene mediates checkpoint adaptation in rhabdomyosarcoma. 第 56 回日本小児血液がん学会学術集会. 2014/11/28-11/30. 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 颯 (KIKUCHI, Ken)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 40453104