

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10451

研究課題名(和文) DNA修復不均衡による染色体転座と肉腫発生

研究課題名(英文) Roles of DNA repair imbalance in chromosomal translocation in sarcomas

研究代表者

田仲 和宏 (TANAKA, KAZUHIRO)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10274458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：疾患特異的な染色体転座と、その結果生じる融合遺伝子は肉腫の発がんに寄与すると考えられている。染色体転座の発生には、DNA二本鎖切断修復系(相同組換え修復：HR、非相同組換え修復：NHEJ)の異常が関与していると考えられ、本研究ではHR及びNHEJを担う分子群の発現および機能異常を網羅的に解析することを目的とした。各種肉腫細胞における上記因子の発現をGeneChip Arrayにより解析、HRを担う中核因子であるRAD51の細胞内局在とDNA二本鎖切断修復を検討した。その結果、これまで染色体転座はNHEJにより発生すると考えられてきたが、予想に反しHR経路の活性化がみられることが観察された。

研究成果の概要(英文)：Disease specific chromosomal translocation and the resulting fusion gene are essential for the oncogenesis of sarcomas. Abnormality of DNA double strand break repair (DSBR) system, including HR and NHEJ, play important roles in formation of chromosomal translocation. The expression of the factors involved in DSBR was explored by DNA microarray analysis in sarcoma cells with disease-specific chromosomal translocations. Focus assays were also carried out to examine the expression and subcellular localization of DSBR proteins. The results indicated that the enhancement of the expression of some DSBR factors and activation of the certain DSBR pathways in sarcoma cells.

研究分野：整形外科

キーワード：肉腫 染色体転座 融合遺伝子 DNA二本鎖切断修復

1. 研究開始当初の背景

疾患特異的染色体転座 t(11;22)はユーイング肉腫の約 90%に存在し、その結果生じた融合遺伝子産物 EWS-Fli1 がユーイング肉腫の発がんに寄与すると考えられている。同様の疾患特異的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、肉腫を含めた普遍的な発がんメカニズムの一つとして極めて重要と考えられる。しかし、肉腫発がんの真の原因とも言うべき染色体転座が形成される分子機構は十分な解明がなされていない。

疾患特異的な染色体転座が生じるためには、まず特定の染色体部位における DNA 二本鎖切断 (Double Strand Break: DSB)を生じる必要がある。通常生体内には、このような DSB が生じててもそれを修復するための二つの機構、相同組換え (Homologous Recombination: HR)経路および非相同末端結合 (Non-Homologous End Joining: NHEJ)経路が存在する。前者は配列情報を正確に維持可能であるため、通常 DSB は HR により修復されていると考えられている。しかし、染色体転座を生じる肉腫細胞においては、このような正常な修復が起きておらず、誤った染色体間で HR 或いは NHEJ による修復が行われるため、結果として染色体転座が生じている。これらの異常な DNA 修復が起きるためには、これらの経路を担う様々な分子に異常が生じていると考えられる。即ち、NHEJ による修復の場合、なぜ HR は使われないのか?、また、HR による修復の場合、なぜ NHEJ は使われないのか?、そしてなぜ HR は正常に作動しないのか?、が重大な問題となる。さらに、HR による修復の場合、間違った染色体間での組換えが起きないよう、通常は DNA ミスマッチ修復(DNA mismatch repair, MMR)がこれを抑止しているが、HR により染色体転座が生じるとすれば、なぜ MMR は正常に働かないのか?、も大きな問題となる。肉腫での染色体転座の生成過程における、これらの DNA 修復諸因子の不均衡と異常についてはこれまで全く研究されていない。我々は既に、ユーイング肉腫細胞株において、HR 経路及び NHEJ 経路の因子群において、著しい遺伝子発現異常が生じていることを世界で初めて見いだしている。

2. 研究の目的

上述のように、DNA 二本鎖切断修復の 2 経路 (HR、NHEJ)および DNA ミスマッチ修復(MMR)の 3 システム間の不均衡が、肉腫発生の真の原因

である染色体転座に繋がっている可能性が考えられる。従って本研究の目的は、肉腫細胞における、HR、NHEJ および MMR を担う分子群の発現および機能異常を網羅的に解析し、DNA 修復不均衡の存在とその意義を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

本研究においては、染色体転座を有するヒト肉腫細胞株および手術等により得られたヒト組織標品を用いて、以下の DNA 修復系を構成する分子の発現および機能異常を網羅的に解析する。

- A. 相同組換え経路 (Homologous Recombination, HR)
 - : MRE11, NBS1, RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, BRCA1, BRCA2
- B. 非相同末端結合経路 (Non Homologous End Joining, NHEJ)
 - : DNA-PKcs, Ku70, Ku80
- C. ミスマッチ修復 (Mismatch repair, MMR)
 - : MSH2, MSH3, MLH1, PMS2, EXO1

これらの各分子について、以下のような系統的解析をおこなう。

- I. 発現解析
 - i) mRNA レベルの解析
 - ii) タンパク質レベルの解析
- II. 機能解析
 - i) 分子局在の解析
 - ii) 細胞形質の解析
 - iii) 修復活性の解析

得られた結果から、各 DNA 修復系の機能状態と相互の均衡について考察を加えることとした。

4. 研究成果

初年度である H27 年度は、ヒト初代培養肺線維芽細胞 MRC-5 を正常対照として、ヒトユーイング肉腫細胞株 (RD-ES, SK-ES1, SCCH196)、ヒト滑膜肉腫細胞株 (HS-SY-II)、ヒト横紋筋肉腫細胞株 (NRS1) における上記 DNA 修復系分子群の発現状態を Affymetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて網羅的に解析した。H28 年度においては、DNA 二本鎖切断修復にお

ける相同組換え修復を担う中核因子であるRAD51の各種細胞株における発現をウエスタンブロットで確認し、さらにfocus assayのシステム構築によりRAD51の細胞内局在が評価できるシステムを確立した。ヒトユーイング肉腫細胞株(WE-68、SK-N-MC)におけるDNA修復分子群の遺伝子発現状態をAffymetrix社GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いて網羅的に解析した。最終年度のH29年度においては、これまでの成果を踏まえ、染色体転座を有する肉腫細胞株におけるRAD51、53BP1の細胞内局在とDNA二本鎖切断修復のkineticsを評価した。

本研究の結果、これまで染色体転座はNHEJにより発生すると考えられてきたが、予想に反しHR経路の活性化がみられることが観察された。また、MMR系因子の発現上昇も認められた。今後は、この活性化したHR経路の意義を検証するため、in vitroのHR assay系を確立し、HR経路因子の機能的異常についての解析を行いたいと考えている。

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11件、全て査読あり)

1. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H: microRNA-181c prevents apoptosis by targeting of FAS receptor in Ewing's sarcoma cells. *Cancer Cell International* In press.
2. Araki N, Tanaka K, et al. (他23名4番目): Factors associated with the decision of operative procedure for proximal femoral bone metastasis: questionnaire survey to institutions participating the Bone and Soft Tissue Tumor Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. *J Orthop Sci* 22: 938-945, 2017
3. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H: microRNA-20b promotes cell proliferation via targeting of TGF-receptor II and up-regulates MYC expression in Ewing's sarcoma cells. *Int J Oncol* 51:1482-1450, 2017
4. Tanaka K, Hasegawa T, Nojima T, Oda Y, Mizusawa J, Fukuda H, Iwamoto Y: Prospective evaluation of Ki-67 system in histological grading of soft tissue sarcomas in the Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0304. *World J Surg Oncol* 14:110, doi:10.1186/s12957-016-0869-6. 2016
5. Tanaka K, et al. (他6名1番目): Tumor suppressive microRNA-138 inhibits metastatic potential via the targeting of focal adhesion kinase in Ewing's sarcoma cells. *Int J Oncol* 48:1135-1144, 2016
6. Kawano M, Tanaka K, et al. (他5名2番目): Dendrotic cells combined with immunogenic cell death induced by doxorubicin exhibits antitumor effects in osteosarcoma. *Oncol Lett* 11:2169-2175, 2016
7. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H: MicroRNA-301a promotes cell proliferation via PTEN targeting in Ewing's sarcoma cells. *Int J Oncol* 48:1531-1540, 2016
8. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Miyazaki M, Ikeda S, Tsumura H: Dendrotic cells combined with anti-GITR antibody produce antitumor effects in osteosarcoma. *Oncol Rep* 34:1995-2001, 2015
9. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Ikeda S,

Iwasaki T, Tsumura H: microRNA-93 promotes cell proliferation via targeting of PTEN in osteosarcoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 34:76, doi:10.1186/s13046-015-0192-z. 2015

10. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H: c-MYC represses tumor-suppressive microRNAs, let-7a, miR-16 and miR-29b, and induces cyclin D2-mediated cell proliferation in Ewing's sarcoma cell line. *Plos One* 10(9):e0138560. doi: 10.1371/journal.pone.0138560. 2015
11. Wakasa K, Kawabata R, Nakao S, Hattori H, Taguchi K, Uchida J, Yamanaka T, Maehara Y, Fukushima M, Oda S: Dynamic modulation of thymidylate synthase gene expression and fluorouracil sensitivity in human colorectal cancer cells. *PLoS One* 10: e0123076. doi: 10.1371/journal.pone.0123076. 2015

(学会発表) (計 13 件)

1. Tanaka K. Sarcoma treatment and research in Japan. *Global Sarcoma Treatment and Research Symposium*. February 22, 2018, Tokyo, Japan.
2. 田仲和宏. 骨肉腫に対する化学療法. 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会、2017 年 11 月 9-11 日、松山.
3. 河野正典, 田仲和宏, 糸永一郎, 岩崎達也, 津村弘. 骨肉腫の微小環境における IL-8 signal の意義. 第 50 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年 10 月 26-27 日、宜野湾.
4. 田仲和宏. 限局性肉腫の治療方針. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2017 年 7 月 27-29 日、神戸.
5. 田仲和宏. 軟部肉腫に対する化学療法と手術療法. 第 50 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2017 年 7 月 13-14 日、東京.
6. 河野正典, 田仲和宏, 糸永一郎, 岩崎達也, 津村弘. 骨肉腫細胞における 17-DMAG による MET 発現抑制と腫瘍増殖能の解析. 第 50 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2017 年 7 月 13-14 日、東京.
7. 河野正典, 田仲和宏, 糸永一郎, 岩崎達也, 津村弘. ヒト骨肉腫細胞株の微小環境における IL-8 の意義. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年 10 月 13-14 日、福岡.
8. 河野正典, 田仲和宏, 糸永一郎, 岩崎達也, 津村弘. 骨肉腫細胞における miR-93 による PTEN 発現抑制と腫瘍増殖能の解析. 第 49 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2016 年 7 月 14-15 日、東京.
9. 田仲和宏, 津村弘, 岩本幸英. 補助化学療法は切除縁を縮小できるか. 第 89 回日本整形外科学会学術総会、2016 年 5 月 12-15 日、横浜.
10. 平賀博明, 田仲和宏, 他. 骨軟部腫瘍領域でのエビデンス構築に向けた日本臨床腫瘍研究グループの取り組み. 第 89 回日本整形外科学会学術総会、2016 年 5 月 12-15 日、横浜.
11. 河野正典, 田仲和宏, 糸永一郎, 岩崎達也, 津村弘. 骨肉腫細胞における miR-93 による PTEN 発現抑制と腫瘍増殖能の解析. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、2015 年 10 月 22-23 日、富山.
12. 田仲和宏, 津村弘, 岩本幸英. 本邦における軟部肉腫に対する臨床試験. 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2015 年 7 月 16-18 日、札幌.
13. 河野正典, 田仲和宏, 他. Ewing 肉腫細胞における miR-301a による PTEN 発現抑制と腫瘍増殖能の解析. 第 48 回日本整形外科

学会骨・軟部腫瘍学術集会、2015 年 7 月
9-10 日、高松.

〔図書〕(計 1 件)

田仲和宏: 悪性骨軟部腫瘍の化学療法
今日の整形外科治療指針第 7 版、土屋弘行、
紺野慎一、田中康仁、田中栄、松田秀一編、
医学書院、pp179-182、2016.

〔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 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
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

田仲 和宏(TANAKA KAZUHIRO)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号:10274458

(2)研究分担者

織田 信弥(ODA SHINYA)
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・腫瘍遺伝学研究室長
研究者番号: 40333372