

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10971

研究課題名(和文) ユーイング肉腫特異的融合遺伝子タイプによるマイクロRNA発現制御機構に関する解析

研究課題名(英文) Analysis of aberrant microRNA expression due to the type of fusion gene in Ewing's sarcoma.

研究代表者

河野 正典 (Kawano, Masanori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30571773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は本研究において、Ewing肉腫の特異的融合遺伝子産物EWS-Fli1が、そのsubtypeによってmicroRNA(miRNA)及び標的mRNA発現にどのような影響を与えているかを解明する。切断点の異なるEWS-Fli1 type 1及びtype 2を、各々に特異的なsiRNAによりknock downした後に、有意な発現変化を示すmiRNAとその標的mRNAを網羅的に解析することで、1) Ewing肉腫の性質を普遍的に規定する因子、2) 選択的な治療標的となる因子、を同定する。本研究によりEwing肉腫の発がん機構の解明とバイオマーカーと個別化医療の開発にも繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、type別にその下流遺伝子発現がどのように変化するのかを突き止めることが可能となる。EWS-Fli1に制御されEwing肉腫のがん化に寄与する因子、type 2の予後を悪化させる特異的な因子を同定、それらの生物学的意義を検証し、臨床応用への道を拓くことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Ewing sarcoma, a typical primary bone tumor, commonly develops in children and young adults, is highly malignant and has a poor prognosis, so we are awaiting development of new treatment methods. In Ewing sarcoma, the central component of the carcinogenesis mechanism is EWS-Fli1 working as an abnormal transcription factor, which requires a completely different treatment approach to conventional cancers. We will extract factors that increase or decrease across different subtypes, while simultaneously identifying factors where the expression changes do not match between subtypes, using the miRNA and mRNA extracted after EWS-Fli1 knock down. Through this research we plan to not only elucidate the carcinogenic mechanism of Ewing sarcoma, but also identify prognostic factors by EWS-Fli1 type, which we hope will lead to discovery of biomarkers and development of individualized treatment.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：Ewing肉腫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くのがん種は遺伝子における変異の蓄積で発がんするが、Ewing 肉腫は t(11;22)(q24;q12) による EWS-Fli1 融合遺伝子形成という単一要因で発がんする。Ewing 肉腫において融合遺伝子 EWS-Fli1 の subtype により miRNA の発現がどのような影響を受けるか網羅的に解析した研究は世界的にみても行われていない。Ewing 肉腫の biology に普遍的に影響する因子と subtype 特異的な予後を規定する因子を同時に解明しようとする本研究は極めて独創的であり意義深いと考えられる。

### 2. 研究の目的

EWS-Fli1 が転写因子であること、EWS-Fli1 の break point の異なる subtype により予後に差があることに着目し、EWS-Fli1 により転写制御を受ける miRNA を同定、新たな治療標的を開発することを目的とする。そこで本研究では、EWS-Fli1 type 1 および type 2 をそれぞれ特異的に阻害する siRNA を導入し、miRNA の発現変化を網羅的に解析、各 EWS-Fli1 subtype の特異的な標的 miRNA およびその下流の標的遺伝子 mRNA を同定する。特に type 2 EWS-Fli1 に特異的な異常を示す miRNA を同定し機能を解析することで、Ewing 肉腫の予後不良因子を解明することが可能となる。

### 3. 研究の方法

1) Ewing 肉腫細胞の異なる EWS-Fli1 subtype 間で共通に発現上昇または低下する miRNA, mRNA を抽出する。同時に type 間で発現上昇もしくは低下が一致しない遺伝子も抽出する。  
2) 1) のうち、とくに予後不良といわれる type 2 で特異的に発現が変動している因子を同定する。それらの因子の発現異常を補正する miRNA mimic あるいは inhibitor oligo を細胞株に導入することで細胞周期の停止、apoptosis 抵抗性の減弱、in vivo での腫瘍増殖能の低下、などの形質の変化として認められるかを観察する。

### 4. 研究成果

1) Ewing 肉腫細胞株 4 種の miRNA と下流の mRNA 発現を microarray 法(Affymetrix)にて網羅的に解析した。特異的融合遺伝子のタイプ別に type 1 (Exon 7 of EWS / Exon 6 of Fli-1) および type 2 (Exon 7 of EWS / Exon 5 of Fli-1) の配列を元に EWS-Fli1 type 1 (SKNMC, WE68) と type 2 (SKES1, RDES) に特異的な siRNA (siEFBP1 および siEFBP2) を作成した。それぞれを導入後、EWS-Fli1 type 1 および type 2 の発現が特異的に knock down できていることを、定量的 PCR およびウェスタンブロットにて確認した。各 type に特異的 siRNA 導入後の cDNA array 解析では 1) 相同組み換え (Homologous recombination; HR)、2) 非相同末端結合 (Non-Homologous End Joining; NHEJ) という異なる 2 つの経路が備わっている。HR では MRE11, NBS1, RAD50/51/52/54, BRCA1/2, XRCC 2/3 等、NHEJ では Ku70/80, DNA-PKcs, XRCC4, LIG4 の発現が亢進していた。さらに DSB 修復経路 HR および NHEJ のみならず、ミスマッチ修復、ヌクレオチド除去修復、メチルトランスフェラーゼなど他の DNA 修復因子についても発現亢進を確認できた。EWS-Fli1 に特異的な siRNA (以下 siRNA) を作成、それぞれを Ewing 肉腫細胞に導入し、EWS-Fli1 knock down (KD) した。その細胞を用い、と同一の手法にて miRNA および mRNA の発現変化を解析した。その結果、siRNA 導入による KD 後、4 種の細胞株にてほぼ全ての DSB 修復因子の遺伝子発現が低下していた (図 1)。

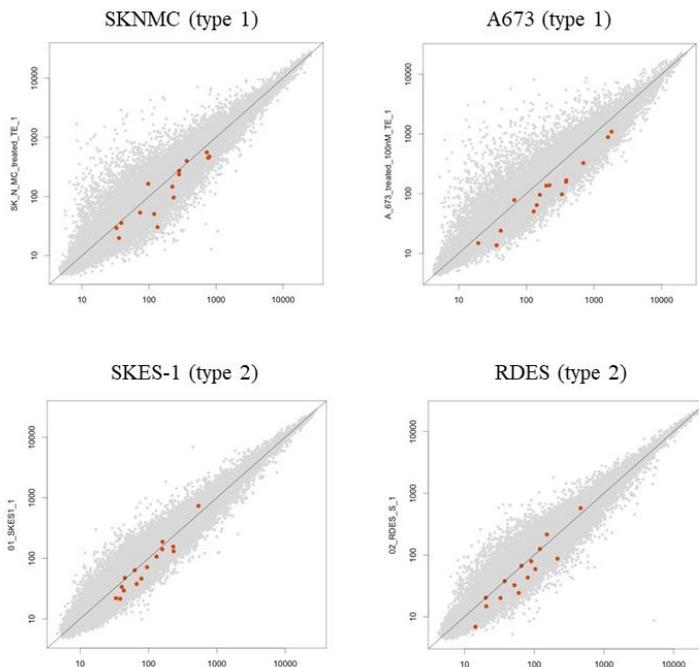


図 1

2) 我々は修復系遺伝子の指標として RAD51 とその機能を抑制する 53BP1 の発現について、その発現を制御するある microRNA を同定した。この microRNA は siEFBP1 および siEFBP2 導入にて上昇していたことから、通常の Ewing 肉腫においては抑制されている Tumor Suppressive miR

と位置付けることができる。我々はこの microRNA の mimic oligonucleotide を作成し細胞に導入することで修復系遺伝子である RAD51 と 53BP1 の動態および抗癌剤に対する抵抗性を確認することにした。RAD51 の発現は一次抗体として抗 RAD51 抗体 (Abcam; ab133534)、二次抗体として Anti-Rabbit AlexaFluoro488 (Invitrogen) を用いて検出した。Untreated および Control-siRNA 導入群の細胞は RAD51 発現が多く認めるが、microRNA mimic と RAD51-siRNA において発現の低下を確認した (図 2)。

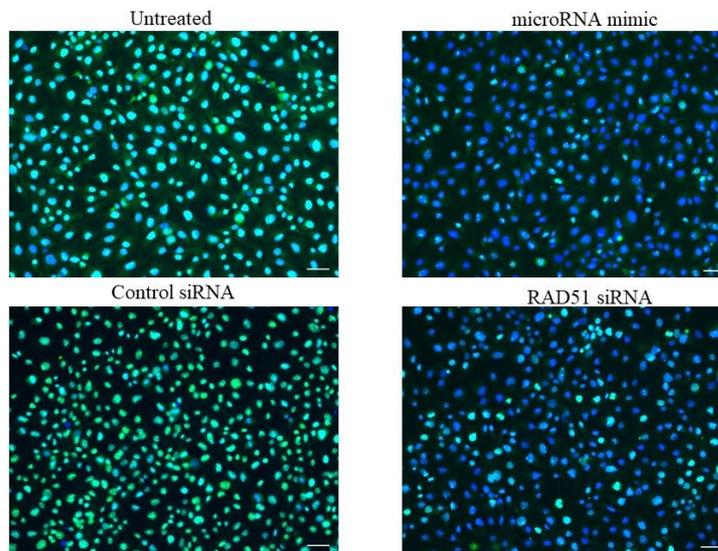


図 2

次に 53BP1 の発現を調査した。53BP1 の検出は一次抗体として抗 53BP1 抗体 (Abcam; ab175933)、二次抗体は Anti-Rabbit Alexa Fluoro594 (Invitrogen) を用いて検出した。Untreated および Control-siRNA 導入群の細胞は 53BP1 発現に対し、microRNA mimic と RAD51-siRNA において発現の上昇を確認した (図 3)。

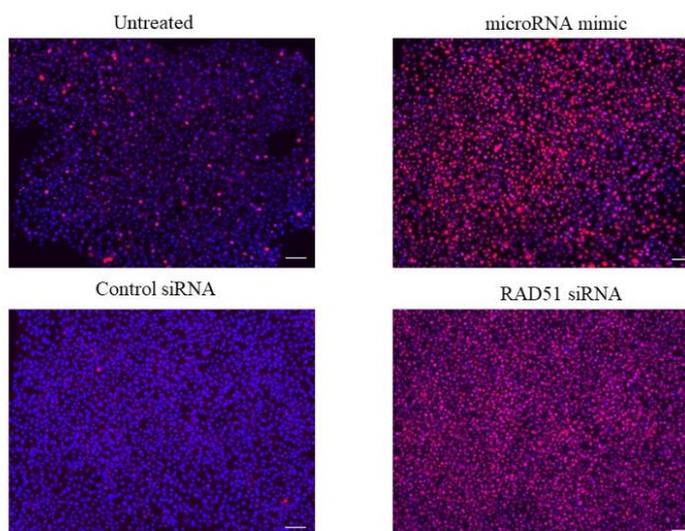


図 3

二本鎖切断修復酵素であるトポイソメラーゼ阻害剤を投与しアポトーシス状態への変化を TUNEL assay (TaKaRa; MK500 In situ Apoptosis Detection Kit) 観察した。Untreated の細胞群においては TOPO 阻害剤投与群と比較して microRNA 導入後の細胞に TOPO 阻害剤投与した群では明らかにアポトーシスが増加していた (図 4)。つまり、microRNA mimic を導入することで RAD51 の発現が低下しアポトーシス抵抗性が減弱したことが示唆された。

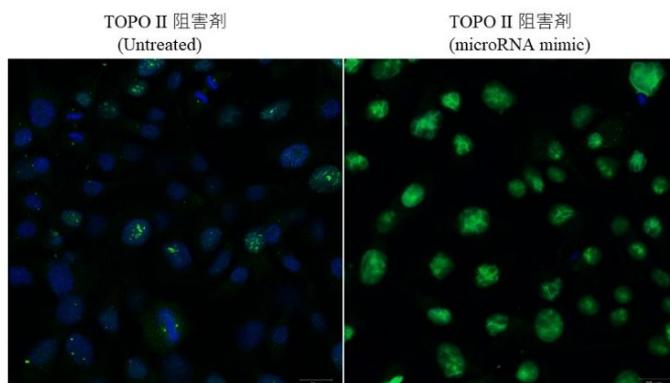


図 4

Ewing 肉腫においては RAD51 をはじめとする DNA2 本鎖切断修復因子の発現が活発になっており、その要因は特異的融合遺伝子によってもたらされると思われる。そのメカニズムを仲介する因子として microRNA の異常が関与していることも考えられる。今回の結果は Ewing 肉腫の特異的融合遺伝子が microRNA の発現異常をもたらすことが大きな原因となっている側面も明らかにした。とくに RNA 代謝をつかさどる EWS 側の関与は今後も継続して機能を解析しなければならない課題であると思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H.	4. 巻 18
2. 論文標題 MicroRNA-181c prevents apoptosis by targeting of FAS receptor in Ewing's sarcoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Cell Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12935-018-0536-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H.	4. 巻 51(6)
2. 論文標題 MicroRNA-20b promotes cell proliferation via targeting of TGF- receptor II and upregulates MYC expression in Ewing's sarcoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 1842-1850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2017.4155.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Interaction between human osteosarcoma and mesenchymal stem cells via an interleukin-8 signaling loop in the tumor microenvironment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Commun Signal.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12964-018-0225-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka K, Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Tsumura H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Surrogacy of intermediate endpoints for overall survival in randomized controlled trials of first-line treatment for advanced soft tissue sarcoma in the pre- and post-pazopanib era: a meta-analytic evaluation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-019-5268-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka K, Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Tsumura H.	4. 巻 14
2. 論文標題 A meta-analysis of randomized controlled trials that compare standard doxorubicin with other first-line chemotherapies for advanced/metastatic soft tissue sarcomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210671.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田仲 和宏  (Tanaka Kazuhiro)  (10274458)	大分大学・医学部・准教授     (17501)	