

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670668

研究課題名(和文)c-Mycの異常発現によるエピジェネティクス変化が染色体転座に与える影響

研究課題名(英文)Epigenetic abnormality induced by aberrant c-Myc expression leads to the chromosomal instability.

研究代表者

糸永 一郎(ichiro, itonaga)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：10295181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：c-Mycを強制発現とその状態でのChIP-sequenceを行いながら、microRNA、cDNA array によるデータの解析・検証も実施した。染色体不安定性の有無に関して、DNA ploidy法およびarray CGH法にてゲノム分画とDNAコピー数の異常を検出し並行してmiRNAおよびcDNA arrayのdataを用いてmiRNAの異常が-c-Mycおよび染色体不安定性に關与していないか、検討をおこなった。c-myc導入線維芽細胞におけるI-SceIによるHR活性測定法、およびNHEJ assay であるrandom plasmid integration法により判別した。

研究成果の概要(英文)：By forcing c-Myc expression and performing ChIP-sequence in that state, we have analyzed and verified data by microRNA and cDNA array. Currently it is likely that let-7a, miR-16, miR-29b, miR-1294, and/or miR-2682 are involved. We demonstrated that the transfection of these two factors suppresses the expression of mRNA and protein on c-Myc, and also suppresses the progression of the cell cycle. To examine the presence or absence of chromosomal instability during the study period, we are attempting to detect abnormalities in genome fraction and in the number of DNA copies using the DNA ploidy analysis and array-CGH. Our prediction is that one of the DSB repair systems, homologous recombination or non-homologous end joining, has a greater dysfunction. We are seeking to determine this through HR activity measurement in c-myc-introduced fibroblasts by I-SceI, and random plasmid integration, which is an NHEJ assay.

研究分野：悪性腫瘍

キーワード：肉腫 染色体不安定性

### 1. 研究開始当初の背景

肉腫は癌腫と比較して発生頻度が極めて低く、その病態の詳細は未だ明らかにされていない。肉腫の特徴として、Ewing 肉腫、滑膜肉腫など疾患特異的な染色体転座により融合遺伝子を生じ発がんすることが知られている。過去の研究においては、融合遺伝子が生じた結果どのような異常が発生するのかという、転座が発生した後の下流の現象について解析されてきた。しかし、そもそもなぜ肉腫では融合遺伝子が発生するのか、という根本的疑問については全く研究されていない。染色体転座を有する腫瘍で共通に見られる c-Myc 過剰発現が染色体不安定性に果たす役割について検証することを目的とする。これまで c-Myc と染色体転座を直接的に関連付けた報告は皆無であり、c-Myc の異常発現によってヒストン修飾のエピジェネティクス変化が生じ、その結果染色体不安定性を引き起こしているという仮説を検証する。また c-Myc を強制発現とその状態での ChIP-sequence を行いながら、microRNA, cDNA array によるデータの解析・検証も実施してきた。特に c-Myc の mRNA が高発現であることに上流の因子である microRNA の発現異常が関与している可能性もあると考えた。

### 2. 研究の目的

悪性腫瘍における c-Myc の役割については数多くの報告がなされているが、染色体転座や不安定性に対する c-Myc の影響については全く解析されていない。これまでの我々の解析で、用いた染色体転座陽性の肉腫細胞株すべてに共通して c-Myc は異常高値を示していた。さらに、肉腫のみに留まらず、慢性骨髄性白血病や Burkitt リンパ腫など、染色体転座を有する血液がんの細胞株においても、c-Myc は共通して異常な発現上昇を示していた。これに対し、染色体転座を有さない骨肉腫、大腸癌、乳癌および肺癌の細胞株では、c-Myc の発現変化は認められなかった。これらの観察結果は、c-Myc 発現亢進と染色体転座の発生に何らかの関連があることを強く示唆するものである。一方、我々が見いだした染色体転座を有する悪性腫瘍群において共通して発現亢進を示す c-Myc は、iPS 細胞を生み出す山中 4 因子の 1 つである。iPS 細胞の初期化とは、細胞分化の過程を逆行させ、分化細胞が獲得した形質をリセットさせる現象であるが、ゲノムの DNA 塩基配列は一切変化しない。最近の研究から、初期化においては、ゲノムのエピジェネティクス状態が劇的に変化していることが示された。

従って、iPS 細胞の生成にも必須の因子である c-Myc の異常発現は、ゲノムのエピジェネティクスに大きな変化をもたらし、さらには染色体不安定性を引き起こす可能性が非常に高いと考えられる。我々は、そのような劇的なエピジェネティクス状態の変化の結果、ゲノムはその安定性を保持できず、染

色体転座を生じて融合遺伝子が形成されるのではないかと考えた。本研究の結果得られる成果として、染色体転座による肉腫発がんの真のメカニズムの一端が明らかになることが期待される。さらに、c-Myc の発現抑制、或いはヒストン修飾のエピジェネティクス異常を正常化することで染色体不安定性を抑制できる、全く新しいアプローチが開発できる可能性も期待できる。

Ewing 肉腫や滑膜肉腫など、疾患特異的な融合遺伝子の形成により single step で悪性化する点で、肉腫は multi step で発癌する大腸癌や乳癌などとは大きく異なっている。また、このメカニズムは肉腫のみならず、白血病やリンパ腫にも共通のものと考えられる。

### 3. 研究の方法

線維芽細胞にレンチウイルスベクターを用いて c-Myc を強制発現させる。その後 ChIP-sequence 法にて、c-myc を導入していない線維芽細胞との間で、全ゲノムのエピジェネティクス変化を比較する。特に染色体不安定性をもたらす領域の脱メチル化、脱アセチル化阻害が発生しているか否かを検討する。染色体不安定性に関与するエピジェネティクス因子として 53BP1 に注目しこれらの因子の発現が変化しているか Western blot にて検討する。さらに、染色体不安定性の有無に関して、DNA ploidy 法および array CGH 法にてゲノム分画と DNA コピ数の異常を検出することで検証した。

### 4. 研究成果

染色体不安定性に関与するエピジェネティクス因子として SIRT6, HDAC1/2 に注目し、これらの因子の発現が変化しているか Western blot にて検討する。DNA ploidy 法および array CGH 法にてゲノム分画と DNA コピ数の異常を検出することで検証する。

3) 上記のように c-Myc は microRNA の発現異常が関与している可能性もあると考えた。これまでに let-7a, miR-16, miR-29b, miR-1294, miR-2682 が関与している可能性が高い。とくに miR-1294, miR-2682 は c-Myc の上流に位置しておりこれが低発現であるために c-Myc の発現が高いと予想した。この 2 因子を transfection すると c-Myc の mRNA とタンパク発現は抑制され、さらに細胞周期の進行が抑制されることは証明できた。

### 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 7 件)

1) Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Miyazaki M, Ikeda S, Tsumura H. Dendritic cells combined with doxorubicin induces immunogenic cell death and exhibits antitumor effects for osteosarcoma. *Oncology Letters*

2016.11(3):2169-2175 (査読有り).

2 ) 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. 2016. 48(4):1531-40(査読有り).

3 ) Tanaka K, Kawano M, Itonaga I, Iwasaki T, Miyazaki M, Ikeda S, Tsumura H. Tumor suppressive microRNA-138 inhibits metastatic potential via the targeting of focal adhesion kinase in Ewing's sarcoma cells. Int J Oncol. 2016.48(3):1135-44(査読有り).

4 ) 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. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H. PLoS One. 2015 Sep 22;10(9):e0138560 (査読有り).

5 ) microRNA-93 promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Osteosarcoma cells. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Ikeda S, Iwasaki T, Tsumura H. J Exp Clin Cancer Res. 2015 Aug 5;34:76 (査読有り).

6 ) Dendritic cells combined with anti-GITR antibody produce antitumor effects in osteosarcoma. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Miyazaki M, Ikeda S, Tsumura H. Oncol Rep. 2015 Oct;34(4):1995-2001(査読有り).

7 ) Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells. Iwasaki T, Tanaka K, Kawano M, Itonaga I, Tsumura H. Int J Oncol. 2015.46(4):1543-50 (査読有り).

〔学会発表〕(計 6 件)

1 ) microRNA-93 promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Osteosarcoma cells. Annual research meeting of the Japanese orthopedic association 2015.10.22-23. M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura(Toyama, Japan).

2 )Orthopaedic Research Society in Las Vegas; 2015.3.31. " Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells " . M Kawano, K Tanaka, I Itonaga, T Iwasaki, H Tsumura.

Japan Muscular Skeletal Tumor Society Meeting 2015.7.9. (Kagawa, Takamatsu.) " microRNA-301a promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Ewing's sarcoma cells" . M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura.

3 )Annual research meeting of the Japanese orthopedic association. 2014.10.10. " microRNA-138 inhibits metastatic potential of Ewing's sarcoma cells via targeting of focal adhesion kinase " . M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura (Kagoshima, Kagoshima).

4 ) Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.2014.9.26. " Inhibition of E2F2 expression and cell proliferation of osteosarcoma cells by tumor-suppressive microRNA-let-7a " M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura (Yokohama, Kanagawa) .

5 ) Japan Muscular Skeletal Tumor Society Meeting 2014.7.17. " Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 oncogene in osteosarcoma " . M Kawano, K Tanaka, I. Itonaga, T. Iwasaki, H. Tsumura (Osaka, Osaka).

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
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

糸永 一朗 (ITONAGA ichiro )  
大分大学・医学部整形外科学・講師

研究者番号：10295181

(2)研究分担者

田仲 和宏 (TANAKA Kazuhiro)  
大分大学・医学部人工関節講座・講師  
研究者番号：10274458

(3)連携研究者

( )

研究者番号：