

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09110

研究課題名(和文)肉腫型染色体転座をつくる。-その基礎となるDNA修復過程の演繹的証明

研究課題名(英文)Chromosomal translocation and the involvement of DNA repair system in sarcoma.

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) 3,400,000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、非同源末端結合：NHEJ)の異常が関与していると考えられるが、その分子機構の詳細は明らかになっていない。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遺伝子発現レベルおよび蛋白質レベルで詳細に解析し、各種の転座陽性肉腫細胞におけるHR経路の活性化を確認した。そしてそれらの実績を踏まえ、in vitroにおける染色体転座再構成を検証できるモデル系の構築に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍における染色体転座はこれまでNHEJにより生起しているものと考えられてきたが、我々はむしろHR経路を介して生起しているのではないかと仮定し研究を進めて来た。その結果は、転座陽性肉腫細胞におけるHR経路の活性化を示唆している。HR経路を介した染色体転座は複数のDNA修復過程の異常を背景にしている可能性があるが、このようなDNA修復異常を正確にとらえ、転座の基礎となるDNA修復過程の全貌を明らかにするためには、各種DNA修復異常の意義を検証可能なモデル系を構築する必要がある。HRによる肉腫型染色体転座を再構成するin vitroモデル系を構築しようとする本研究は世界初の試みといえる。

研究成果の概要(英文)：Disease-specific chromosomal translocation and the resulting fusion genes are thought to contribute to the carcinogenesis of sarcomas. Abnormalities in the DNA double-strand break repair system (homologous recombination, HR; non-homologous end-joining, NHEJ) are thought to be involved in the development of chromosomal translocations, but the details of the molecular mechanism are still unclear. In this study, we analyzed the expression and dysfunction of the factors responsible for HR and NHEJ in detail at the gene and protein expression levels and confirmed the activation of the HR pathway in various translocation-positive sarcoma cells. Based on these achievements, we worked on the construction of a model system that can verify the in vitro chromosomal translocation 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

肉腫の特徴として、ユーイング肉腫における t(11;22)や滑膜肉腫における t(X;18)をはじめとする、疾患特異的な染色体転座の存在が挙げられる。ユーイング肉腫ではその約 90%に存在し、第 11 番染色体上の遺伝子 FLI1 と第 22 番染色体上の遺伝子 EWS との間で、異常な融合遺伝子 EWS-FLI1 が生じる。EWS-FLI1 は強力な転写因子として働き、線維芽細胞を transform する活性を有するが、EWS-FLI1 によるユーイング肉腫発症のメカニズムは不明であった。これまでに我々は、ユーイング肉腫細胞における EWS-FLI1 遺伝子発現を抑制することで細胞増殖が抑制され、細胞は G1 期に停止することを明らかにした。その際、EWS-FLI1 が直接的、間接的に G1 期から S 期への移行を制御する細胞周期制御因子群の発現を修飾することを明らかにしてきた。これらの一連の成果は、EWS-FLI1 によって細胞周期制御因子の発現に異常が起こり、細胞周期が高回転に維持されることが、ユーイング肉腫の発がんや増殖に寄与する可能性を世界で初めて示したものである。さらに我々は、これらの EWS-FLI1 標的遺伝子産物が、ユーイング肉腫に対する治療に応用できる可能性についても明らかにした。疾患特異的な染色体転座は造血器腫瘍でも広く認められており、腫瘍発生において大きな役割を演じる極めて普遍的なメカニズムと考えられる。腫瘍疾患特異的な染色体転座とその結果生じる融合遺伝子産物の意義は長年に亘り注目されてきたが、このような染色体転座そのものがどのような機序を介して生じるのかについては殆ど研究されておらず、その分子機構は依然不明である。

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) が原因となることは想像に難くない。通常生体内には、DSB が生じてもそれを修復する機構、A. 相同組換え (Homologous recombination, HR)、B. 非相同末端結合 (Non-homologous end-joining, NHEJ)、C. ミクロホモロジー介在性末端結合 (microhomology-mediated end-joining, MMEJ) の各経路が存在する。HR は配列情報を正確に維持可能であるため、通常は HR によりこれらの DSB は修復されていることが想像される。しかしながら、染色体転座を生じる肉腫細胞においては、このような修復がおこなわれず、誤った染色体間で修復がおこなわれている可能性がある。これまで、このような腫瘍に特徴的な染色体転座は、NHEJ により生起しているものと考えられてきた。異なる染色体間には配列相同性が見出せないからである。

一方我々は、本申請に先立つ研究において、ユーイング肉腫細胞株では、HR 経路を構成する遺伝子群が著しく高発現していることを世界に先駆けて見出している。実際には、A) 転座は HR により生じていないか? という疑問が生じる。しかしながら、このような異なる染色体間での HR を想定する上では、B) なぜ MMR は働かないのか?、C) なぜ NHEJ は使われないのか? といった大きな疑問も生じる。通常 HR による修復の場合、まちがった染色体間で組換えが起きないよう、DNA ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair, MMR) がこれを抑止している。HR により染色体転座が生じる際、なぜ配列間に存在する非相同性は無視されるのか疑問となる。また、このような「高いハードル」を乗り越えてでも HR 経路が利用される理由は何か。より容易な修復であり、活性も高い NHEJ 経路はなぜ使われないのか疑問となる。肉腫型染色体転座が生起する過程においては、これらの DNA 修復機構を構成する特定の分子の異常が背景にあることが想像されるが、転座陽性肉腫細胞における DNA 修復諸因子の異常についてはこれまで全く研究されていない。

2. 研究の目的

本研究では、このような肉腫型染色体転座の基礎となる分子機構の詳細を明らかにするために、HR により肉腫型染色体転座を再構成する *in vitro* モデル系を構築することを目指す。転座 *in vitro* モデル系が構築されれば、転座が生起する過程に対する促進・抑制効果を指標に、転座の基礎となる DNA 修復諸因子の異常が同定できる。普遍的な発がんメカニズムのひとつである染色体転座の分子機構の解明が期待される。上記したように、腫瘍で見られる染色体転座はこれまで、NHEJ により生起しているものと考えられてきた。しかし、この NHEJ モデルでは、これらの転座が通常相互転座である点を説明しにくい。一般に相互転座の中間過程は HR に特徴的な Holliday 構造で説明されるが、染色体間には高い配列相同性が見出せない点疑問として残っていた。一方、以前より切断近傍に比較的配列相同性の高い SINE 型レトロポゾンの 1 種、Alu 配列の存在も指摘されていた。これらの知見から我々は、腫瘍に特徴的な染色体転座はむしろ HR 経路を介して生起しているのではないかと仮定し、これまで研究を進めて来た。既に得られているいくつかの知見は HR による機序を示唆しているだけでなく、我々のこれまでの観察も転座陽性肉腫細胞における HR 経路の活性化を示唆している。

しかし HR 経路にその原因をもとめる上では、上記したような疑問点も浮上してくる。HR 経路を介した染色体転座は複数の DNA 修復過程の異常を背景にしてはじめて可能となっている可能性がある。このような DNA 修復異常を正確にとらえ、転座の基礎となる DNA 修復過程の全貌を明らかにするためには、各種 DNA 修復異常の意義を検証可能なモデル系を構築する必要がある。HR による可能性を追求する研究は現在、国内外を見ても極めて少数派である

が、HR による肉腫型染色体転座を再構成する in vitro モデル系を構築しようとする研究は世界初の試みといえる。本研究は、腫瘍細胞における分子異常を後方視的(a posteriori)に観察する帰納的研究とは対極的に、モデル系を用いて原因を演繹的(a priori)に証明しようとする研究であり、アプローチを「コペルニクス的」に転換するものである。HR による転座生成機序を演繹的に明らかにしようとする研究といえる。

3. 研究の方法

(1) DNA 修復異常の網羅的解析

モデル系が作成されても、検証する DNA 修復異常の候補が明らかでなければ、分子機構の詳細は明らかにできない。肉腫より樹立された各種株化培養細胞において、引き続き網羅的な遺伝子発現解析および詳細な染色体(核型、構造異常)解析を行う。

(2) 肉腫型染色体転座 in vitro モデル系の構築

これまでも、染色体 DNA に integrate されたトランスジーン構造を利用して、HR 反応を観察可能な優れたシステムが報告されている。また近年、配列特異的エンドヌクレアーゼを活用したゲノム編集技術が大きく進歩した。本研究では両者を活用する。具体的には、2 遺伝子座に HR を利用してトランスジーン構造を導入することで、両遺伝子座において a) 鎖切断を任意に誘導でき、b) ‘壊れた’ 蛍光タンパク質遺伝子が、c) ‘正しい’ ドナー修復配列との間の HR により復旧し、発光(G 蛍光)することにより HR 反応が検出可能な系を構築する。さらに、d) 薬剤マーカー遺伝子を利用してクローンを選択した後、鎖切断を誘導し、培養を行う。2 つのトランスジーンに置かれた e) 独立した蛍光タンパク質遺伝子(R 蛍光)により、転座に際し、G+R の merged 蛍光を検出、転座生成が確認される基本系が構築されれば、マーカー蛍光タンパク質遺伝子の配列異常の程度を 短い欠失から、塩基ミスマッチを含む配列へ、あるいは Alu 配列(実際に 2 遺伝子座に存在するリピート配列を R 蛍光のみにより検出)へと、段階を追って系を改変し、HR 反応の変化を観察する。

4. 研究成果

これまで染色体転座は NHEJ により生起していると考えられてきたが、我々の研究により、転座陽性肉腫細胞において HR 経路の活性化がみられることが観察されている。本研究では、HR により肉腫型染色体転座を再構成する in vitro モデル系を構築し、転座の基礎となる DNA 修復過程の詳細を演繹的に証明することを目的とした。

代表的転座陽性肉腫としてユーイング肉腫細胞株を用い、HR および NHEJ の両経路の遺伝子発現を網羅的に解析した。すなわち、ヒト初代培養肺線維芽細胞 MRC-5 およびヒト間葉系幹細胞株 hMSC を正常対照とし、これまでの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-11)、ヒト横紋筋肉腫細胞株(NRS1)に加え、ヒトユーイング肉腫細胞株(WE68、SK-N-MC)、他の染色体転座を有する白血病および悪性リンパ腫細胞株(K562、Raji、Daudi)における上記 DNA 修復系分子群の発現状態を Affymetrix 社製 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて網羅的に解析した。

また、ユーイング肉腫細胞株 WE68 および RD-ES における詳細な核型解析を実施した。さらに HR および NHEJ 両経路の構成因子の蛋白レベルの発現解析も行った。

その結果、HR 経路の活性化が確認されたのみならず、転座陽性肉腫における NHEJ 経路の不活性化を示唆する結果が得られた。これらの実績を踏まえ、in vitro における染色体転座再構成を検証できるモデル系の構築に取り組んだ。この活性化した HR 経路の意義を検証するためのモデル系の確立までには至らなかったが、今後も引き続き 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

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12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 Tanaka Kazuhiro, Kawano Masanori, Iwasaki Tatsuya, Itonaga Ichiro, Tsumura Hiroshi	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 1~9
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 Kazuhiro, Kawano Masanori, Iwasaki Tatsuya, Itonaga Ichiro, Tsumura Hiroshi	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 1~18
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 -
1. 著者名 Nagano Akihito, Tanaka Kazuhiro, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Osteosarcoma in patients over 50 years of age: Multi-institutional retrospective analysis of 104 patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 319~323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2019.04.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Kazuhiro, Mizusawa Junki, Naka Norifumi, Kawai Akira, et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 Ten-year follow-up results of perioperative chemotherapy with doxorubicin and ifosfamide for high-grade soft-tissue sarcoma of the extremities: Japan Clinical Oncology Group study JCOG0304	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-6114-2	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 Urakawa Hiroshi, Mizusawa Junki, Tanaka Kazuhiro, Eba Junko, Hiraga Hiroaki, Kawai Akira, Nishida Yoshihiro, Hosaka Masami, Iwamoto Yukihide, Fukuda Haruhiko, Ozaki Toshifumi	4. 巻 49
2. 論文標題 A randomized phase III trial of denosumab before curettage for giant cell tumor of bone: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1610	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 379 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyz004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Kazuhiro, Tsumura Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system for soft tissue sarcoma of the trunk and extremity: in search of a better staging system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/atm.2019.01.31	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 Matsuda Shogo, Tanaka Kazuhiro, Kawano Masanori, Iwasaki Tatsuya, Itonaga Ichiro, Tsumura Hiroshi	4. 巻 99
2. 論文標題 Long-term disease control by trabectedin in a patient with dedifferentiated liposarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000018689	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 Masanori, Tanaka Kazuhiro, Itonaga Ichiro, Iwasaki Tatsuya, Tsumura Hiroshi	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 International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Kazuhiro, Ogawa Gakuto, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Prospective comparison of various radiological response criteria and pathological response to preoperative chemotherapy and survival in operable high-grade soft tissue sarcomas in the Japan Clinical Oncology Group study JCOG0304	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-018-1462-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawano Masanori, Tanaka Kazuhiro, Itonaga Ichiro, Iwasaki Tatsuya, Tsumura Hiroshi	4. 巻 16
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 Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 1~11
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urakawa Hiroshi, Yonemoto Tsukasa, Tanaka Kazuhiro, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Clinical outcome of primary giant cell tumor of bone after curettage with or without perioperative denosumab in Japan: from a questionnaire for JCOG 1610 study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-018-1459-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 He B., Chiba Y., Li H., de Vega S., Tanaka K., Yoshizaki K., Ishijima M., Yuasa K., Ishikawa M., Rhodes C., Sakai K., Zhang P., Fukumoto S., Zhou X., Yamada Y.	4. 巻 98
2. 論文標題 Identification of the Novel Tooth-Specific Transcription Factor AmeloD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 234~241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034518808254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tanaka K, Mizusawa J, et al.
2. 発表標題 10-year follow-up results of perioperative chemotherapy with doxorubicin (DXR) and ifosfamide (IFM) for high-grade soft tissue sarcomas (STS) in the extremities: Japan Clinical Oncology Group study JCOG0304.
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎達也、田仲和宏、他
2. 発表標題 Ewing肉腫細胞におけるmiR-20bによるTGFBR2発現抑制と腫瘍増殖能の解析
3. 学会等名 第52回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2019年

〔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	織田 信弥 (Oda Shinya) (40333372)	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・室長 (87102)	

	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 協力者	中津 可道 (Nakatsu Yoshimichi) (00207820)	九州大学・大学院医学研究院・准教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	吉田 光明 (Yoshida Mituaki) (60182789)	弘前大学・保健学研究科・客員研究員 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関