

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09576

研究課題名(和文) ユーイング肉腫特異的融合遺伝子によるRNAヘリカーゼAの機能抑制に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of RNA helicase A function on Ewing's sarcoma-specific fusion gene

研究代表者

系永 一郎 (Itonaga, Ichiro)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Ewing肉腫の原因遺伝子は、RNA代謝に関わるEWSと転写因子Fli1が融合したEWS-Fli1である。EWS-Fli1による発がんは、Fli1側の転写因子機能の異常によると考えられてきた。しかし近年、RNA helicase A (RHA) がEWS-Fli1に結合すること、さらにその結合を阻害する小分子化合物YK-4-279によりEwing肉腫細胞の増殖が抑制されることが報告されたそこで本研究では、EWS-Fli1とRHAの相互作用の詳細を解明し、RNA代謝異常によるEwing肉腫発がんメカニズムを明らかにすることを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の海外の研究により、EWS-Fli1がRHAに結合しRHAの機能を阻害すること、YK-4-279がその結合を阻害することが報告された。しかし、YK-4-279によりどのような遺伝子の発現が変化するか、またYK-4-279は融合遺伝子のどの部分に作用しているか、などの詳細については未だ不明である。YK-4-279を用いて、EWS-Fli1とRHAとの結合部位や、RHA機能阻害のメカニズムの詳細、アポトーシス誘導の分子機構が解明できる可能性がある。さらに、融合遺伝子にEWSを有する疾患群に対しての治療標的の発見に繋がる可能性もあり、本研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The causative gene for Ewing's sarcoma is EWS-Fli1, which is a fusion of EWS involved in RNA metabolism and the transcription factor Fli1. Carcinogenesis caused by EWS-Fli1 has been thought to be due to abnormalities in transcription factor function on the Fli1 side. However, in recent years, it has been reported that RNA helicase A (RHA) binds to EWS-Fli1 and that the small molecule compound YK-4-279, which inhibits the binding, suppresses the growth of Ewing sarcoma cells. The purpose of this study is to elucidate the details of the interaction between EWS-Fli1 and RHA, and to clarify the carcinogenic mechanism of Ewing sarcoma due to abnormal RNA metabolism.

研究分野：肉腫

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

融合遺伝子となることで Fli1 が異常な転写因子として作用し、標的遺伝子の発現が狂ってしまうとする考えである。過去の様々な研究においても、融合遺伝子 EWS-Fli1 が Fli1 標的遺伝子の発現パターンを変化させることが報告されている。近年の海外の研究により、EWS-Fli1 が RHA に結合し RHA の機能を阻害すること、YK-4-279 がその結合を阻害することが報告された。しかし、YK-4-279 によりどのような遺伝子の発現が変化するか、また YK-4-279 は融合遺伝子のどの部分に作用しているか、などの詳細については未だ不明である。YK-4-279 を用いて、EWS-Fli1 と RHA との結合部位や、RHA 機能阻害のメカニズムの詳細、アポトーシス誘導の分子機構が解明できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究での核心的な問いは、EWS-Fli1 による Ewing 肉腫の発がんには、RNA 代謝能を持つ EWS 側の作用による RHA の機能阻害が関与するのではないか、ということである。即ち、我々が観察してきた Ewing 肉腫細胞における mRNA の広範な異常発現は、特異的融合遺伝子によって RHA が正常機能を失うことがその根本原因ではないか、という疑問である。従って本研究では、EWS と RHA の相互作用が mRNA の異常発現の直接的原因である可能性について検証することを目的とする。融合遺伝子に EWS を有する肉腫は、Ewing 肉腫の他にも明細胞肉腫 (EWS-ATF1)、粘液型脂肪肉腫 (EWS-CHOP)、骨外性粘液型軟骨肉腫 (EWS-CHN) など多数同定されており、「2つの染色体が転座した片方に EWS が含まれる」ということは確率的に偶然ではあり得ない。これらの肉腫においては、融合遺伝子により RHA 活性が異常になることで、RNA 代謝が機能不全に陥っている可能性がある。そして結果的に microRNA や mRNA の発現異常が広範に引き起こされ、発がんにつながっていると考えられる。本研究は、Ewing 肉腫における、RHA による RNA 代謝という普遍的かつ不可欠な機能の異常の解明を目的としており、他に類をみない特色ある研究と考えられる。転写因子である Fli1 は、DNA 上に存在するプロモーターに結合し下流の遺伝子発現に影響するため、その機能異常が発がんに寄与することは理解しやすい。一方、EWS の RNA 代謝機能の異常については、殆ど研究がなされていない。本研究では、EWS-Fli1 と RHA の相互作用の機構を解明することで Ewing 肉腫における RNA 代謝異常という新たな視点からその病態を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) YK-4-279 投与による細胞増殖抑制

Ewing 肉腫細胞株 4 種 (SK-ES-1, RDES, SK-N-MC, SCCH) と骨肉腫細胞株 2 種 (MG-63, Saos2) に YK-4-279 (Chemscene Inc, CAS:1037184-44-3) を投与した。

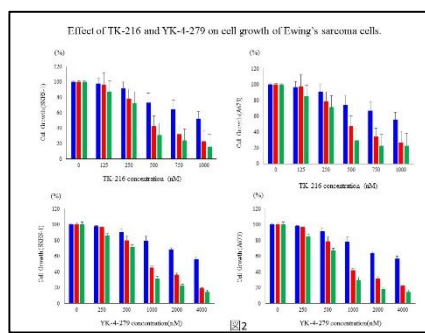
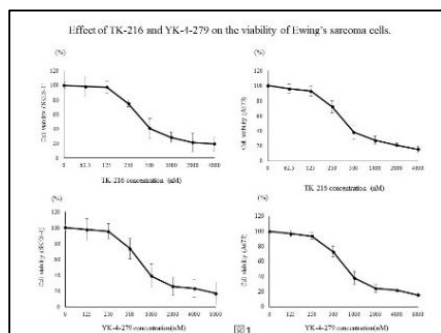
#### 2) YK-4-279 による細胞増殖抑制のメカニズム

増殖能を観察した細胞群を回収し Annexin V/PI 染色および WB にてアポトーシスが誘導されていることを確認する。

3) EWS-Fli1 における YK-4-279 の結合部位を解析する。ヒト線維芽細胞株からの YK-4-279 投与前後の細胞抽出液を用い、anti-RHA antibody (ab26271, Abcam) による免疫沈降 (IP) を行い、回収した蛋白質を anti-EWS antibody (#11910, CST) でプロット (IB) する。次に、同じ細胞抽出液を用い anti-EWS antibody による IP、anti-RHA antibody に IB を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) Ewing 肉腫に対する TK-216 と YK-4-279 の細胞増殖抑制効果



SKES-1 と A673 に対する TK-216 (以下、TK)、YK-4-279 (以下、YK) の細胞増殖抑制効果を検証した (図1)。TK は 500 nM から、YK は 1000 nM より細胞増殖が有意に低下した。

下した。

2) 濃度、反応時間依存性に効果があるか調査した。TK は 500 nM を 48 時間以上で、YK は 1000 nM を 48 時間反応させると細胞増殖が有意に低下した。以降の解析では TK: 500 nM, YK: 1000 nM を至適濃度とし検証を行った。

3) 至適濃度におけるアポトーシス関連タンパクである PARP、cleaved PARP、caspase 3、cleaved caspase 3 の発現をウエスタンブロット法で確認した。どちらも cleaved PARP、caspase 3 の高発現をみとめ、アポトーシス誘導が確認できた (図 3)。

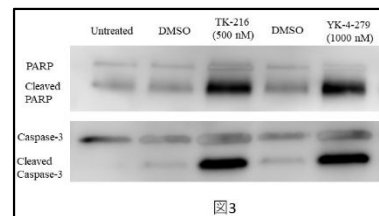


図 3

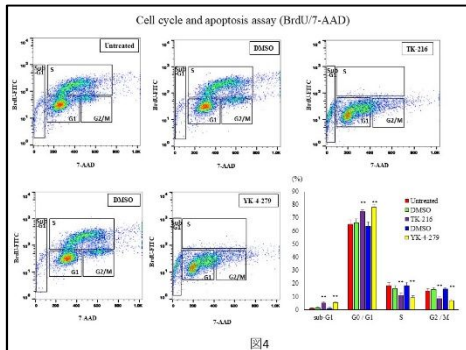


図 4

4) 細胞周期の変化を確認した。未治療および negative control 群と比較して治療群において G1 fraction の増加と S, G2/M 期の低下を認めた (図 4)。アポトーシス誘導と同時に細胞周期遅延が発生していた。至適濃度における細胞増殖の低下はアポトーシスおよび細胞周期遅延の両方によってもたらされており、TK-216 YK-4-279 いずれも抗腫瘍効果を有していることが明らかとなった。

5) TK-216, YK-4-279 の抗腫瘍効果は示されたが、次に解決すべき課題としてこの 2 剤の作用機序についてである。RHA は融合遺伝子の構成要素である EWS と Fli-1 のどちらと結合しているのであろうか。EWS, Fli-1, RHA それぞれのタンパクを個別に発現させ RHA は EWS と Fli-1 のどちらと結合しているかを検証した。EWS-Fli1, EWS, Fli1, RHA それぞれの発現ベクターから Open Reading Frame (ORF) をサブクローニングした。プライマー設計の際、pENTR-SD-TOPO vector へ移行するように設計した (図 5)。

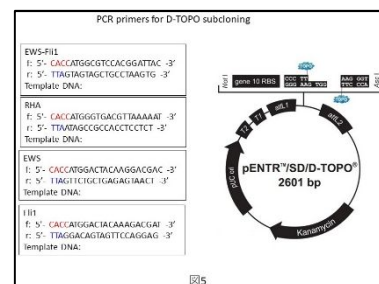


図 5

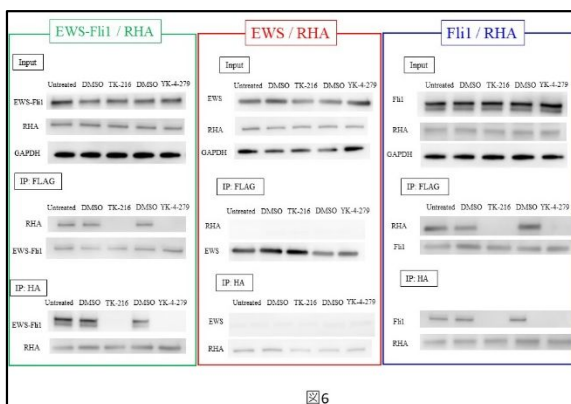


図 6

このベクターを用いてヒト線維芽細胞株 (MRC5) へ導入し上記タンパクを強制発現した。MRC5 からの TK-216 投与前後の細胞抽出液を用い、anti-RHA antibody (ab26271, Abcam) による免疫沈降 (IP) を行い、回収した蛋白質を anti-EWS antibody (#11910, CST) でプロット (IB) した。未治療群は RHA 抗体で IP 後に EWS が検出されたのに対し、TK-216 反応後は EWS が検出されなかった。同様に、未治療細胞のタンパク抽出液を用いて EWS 抗体で IP した群は RHA が検出されたが、TK-216 反応後は RHA のバンドが検出されなかった (図 6)。おなじタンパク抽出液を用いて RHA と Fli-1 の結合を確かめたが、anti-RHA antibody, anti-Fli-1 antibody (#, CST) で IP 後にお互いバンドは検出できなかった (図 7)。以上より RHA は EWS 側と反応し、かつ TK-216 にてその結合が阻害されていることが示された。

されなかった (図 6)。おなじタンパク抽出液を用いて RHA と Fli-1 の結合を確かめたが、anti-RHA antibody, anti-Fli-1 antibody (#, CST) で IP 後にお互いバンドは検出できなかった (図 7)。以上より RHA は EWS 側と反応し、かつ TK-216 にてその結合が阻害されていることが示された。

本研究で明らかとなったことは、Ewing 肉腫細胞株において TK-216 と YK-4-279 はその細胞増殖活性を低下させ細胞周期の遅延およびアポトーシスを誘導しているということであった。さらに RHA が EWS-Fli1 が結合することで RHA の機能が低下しているというこれまでの研究結果を支持するものとなった。RHA は正常細胞にとって RNA 代謝という極めて基本的で不可欠な機能であり Ewing 肉腫のみならず

明細胞肉腫 (EWS-ATF1)、粘液型脂肪肉腫 (EWS-CHOP)、骨外性粘液型軟骨肉腫 (EWS-CHN) など EWS を含む融合遺伝子を有する悪性腫瘍細胞の生態解明におおきな意味をもつものと考えられる。

TK-216 に関しては Ewing 肉腫に対し 16200 Phase I study とし臨床試験への道が開けてきている。従来分子標的治療薬と異なり核内転写因子を標的とした新しい概念であるが、作用機序についてのさらなる機序解明は他の悪性腫瘍へ適応できる可能性もあり非常に大きな意義があると思われる。

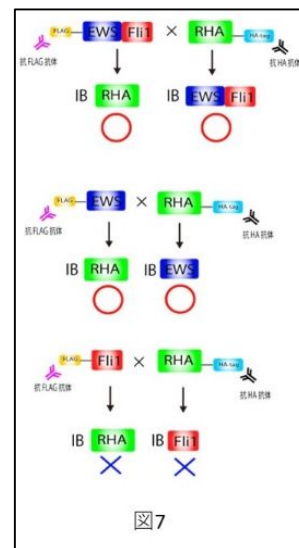


図 7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Kubota Y, Tanaka K, Tsumura H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of the signal cross talk via CCL26 in the tumor microenvironment in osteosarcoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97153-2.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野正典
2. 発表標題 Ewing 肉腫細胞における miR-152 における CDK5R1発現と腫瘍増殖能の解析
3. 学会等名 日本サルコーマ治療研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野正典
2. 発表標題 Ewing肉腫細胞におけるFbxw7によるMyc発現調節と腫瘍増殖能の解析
3. 学会等名 第36回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野正典
2. 発表標題 Ewing 肉腫細胞における skp2 による p27 発現抑制と腫瘍増殖能の解析
3. 学会等名 第54回 日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2021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	河野 正典  (Kawano Masanori)  (30571773)	大分大学・医学部・助教    (17501)	

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
---------	---------