

機関番号：15201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590365

研究課題名 (和文)

横紋筋肉腫細胞株からの PAX ファミリー遺伝子の関与しない新規のキメラ遺伝子の同定

研究課題名 (英文)

Identification of a novel chimera gene not involving PAX family gene in rhabdomyosarcoma cell lines

研究代表者

嘉数 直樹 (KAKAZU NAOKI)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：20264757

研究成果の概要 (和文)：横紋筋肉腫では 2q35、1p36 バンドを切断点とする特異的な転座を認め、それぞれ、*PAX3*、*PAX7* 遺伝子が関与するキメラ遺伝子を形成している。我々は SKY 法によって横紋筋肉腫細胞株を解析し、多数の染色体転座を検出した。また、いずれの転座も *PAX3*、*PAX7* が関与していないことを明らかにした。次に、FISH 法により、これらの転座の切断点の局在を狭めたが、新規のキメラ遺伝子を同定するには至らなかった。今回解析した転座は、腫瘍の進展に伴い染色体が不安定になり二次的に生じた可能性も示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Rhabdomyosarcoma (RMS) is characterized by the specific chromosomal translocations involving 2q35 and 1p36 bands, which generate the *PAX3*- and *PAX7*-related chimera genes, respectively. We analyzed RMS cell lines by spectral karyotyping (SKY) and detected many chromosomal translocations, in which the *PAX3* and *PAX7* genes were not involved. We analyzed their breakpoint regions by FISH but could not identify novel chimera genes, which suggests that the translocations were secondarily caused by chromosomal instability due to the RMS development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細胞遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：横紋筋肉腫、染色体転座

1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫は小児で最も頻度の高い軟部悪性腫瘍であり、組織学的には胎児型、胞巣型の二病型に大別される。日本横紋筋肉腫研究グループ (Japan Rhabdomyosarcoma Study Group; JRSG) による 2003 年から 2007 年間の中央病理診断では、横紋筋肉腫と病理診断された 74 症例中の 40 症例 (約 54%) が胎児型、30 症例 (約 41%) が胞巣型、残り 4 症例がその他の病型であった。

胎児型と胞巣型の二大病型では、臨床的な特徴が大きく異なる。胎児型は小児期に最も多く、四肢を除いた身体の内臓部位に発生し、比較的予後は良好である。胞巣型は思春期以降に多く、体幹や四肢が好発部位であり、化学療法に反応しにくく予後不良である。また、胞巣型では約70%の症例で染色体転座として $t(2;13)(q35;q14)$ と $t(1;13)(p36;q14)$ を認めている。前者の2q35切断点、後者の1p36切断点上にはそれぞれ、*PAX3* 遺伝子、*PAX7* 遺伝子のいずれも *PAX* ファミリー遺伝子が局在している。これらの遺伝子と13q14切断点上の *FOXO1* 遺伝子が転座に伴ってキメラ遺伝子 (*PAX3-FOXO1*、*PAX7-FOXO1*) を形成していることが知られ、胞巣型横紋筋肉腫の発生に深く関与している。*PAX3-FOXO1* では *PAX3* の DNA 結合ドメインが無傷で保持されているため、正常の *PAX3* 遺伝子と同じ標的遺伝子を活性化できるが、その転写活性は正常の場合より10-100倍亢進していると報告されている。このことより、*PAX3-FOXO1* が標的遺伝子を転写し続けるため、筋芽細胞は増殖を止めず、最終分化も抑制されて胞巣型横紋筋肉腫を発生させていると考えられている。

一方、胎児型は横紋筋肉腫の病型のなかでは最大の発生頻度であるにもかかわらず、これまで原因にかかわる遺伝子はほとんど

同定されていなかった。このため、胞巣型に比べて発癌機構の解明が大きく遅れていた。

上述したように、発癌機構の解明において、癌の染色体転座の解析は重要な手がかりとなる場合がある。造血器腫瘍においては、原因となるキメラ遺伝子のほとんどは染色体転座の転座切断点上から同定され、その後の発癌機構の解明に大きく寄与した。また近年、肺癌、前立腺癌等で発癌に関与しているキメラ遺伝子が続々と同定されているが、これらは染色体転座に伴って形成されたと考えられる。このように、癌の染色体転座の解析においては、転座断片の由来だけではなく、その切断点を決定することも重要な意味を持つ。

我々は、胎児型症例で認められた複雑な染色体転座の複数の切断点を、spectral karyotyping (SKY) 法、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を駆使して解析し、2q35 と 8q13 バンドのそれぞれの切断点上に *PAX3* と *TIF2* 遺伝子が局在し、転座に伴って *PAX3-TIF2* キメラ遺伝子が形成されていることを明らかにした。この症例も含めて、これまでに胞巣型、胎児型を問わずに同定された3つのキメラ遺伝子はいずれも *PAX* ファミリー遺伝子が関与していることになるが、それらが関与していない転座も多数存在していると思われ、そこから新規のキメラ遺伝子が同定される可能性はある。

2. 研究の目的

横紋筋肉腫細胞株において染色体解析を行い、*PAX* ファミリー遺伝子の関与していない染色体転座を明らかにする。さらに、その転座の切断点を細胞遺伝学的・分子生物学的に解析し、新規のキメラ遺伝子を同定し、横紋筋肉腫発生の分子機構の一端を解明する。

3. 研究の方法

染色体転座の切断点の決定は、従来は G バンド法で行われていた。しかし、この方法は精度が高くなく、転座切断点のみならず、転座断片の由来染色体の同定においてしばしば誤りを生じた。今回の研究では、より精確に切断点を同定するために SKY 法を用いた。

SKY 法とは、ヒトの 24 種類（常染色体：1 番～22 番；性染色体：X, Y）の染色体のペインティングプローブを用いた FISH 技術によって、全染色体をその種類ごとに異なるシグナルの色調で自動識別し核型解析（カリオタイプング）する方法のことである。この方法により、染色体異常、特に異なる染色体間の転座を精確に検出できる。ただし、SKY 法だけでは転座断片の由来染色体は決定できても、転座切断点の同定までは困難である。そこで、SKY 法による解析の際に、染色体の対比染色に用いる DAPI による蛍光も同時に取り込む。DAPI 蛍光の反転像は G バンド像と極めて近似しており、SKY 像と DAPI 反転像を比較することで、切断点を精確に決定することが可能と考えた。具体的には、SKY 像で異なる染色体間の転座を検出し、同時に、その切断点を色調の境目として明瞭に同定する。その上で、横に並べた同じ転座染色体の G バンド近似像において切断点を mapping し、位置を精確に決定するのである。

上記の方法で、複数の横紋筋肉腫細胞株の中期染色体を解析し、*PAX3* の局在する 2q35 バンド、*PAX7* の局在する 1p36 バンド以外の転座切断点を探す。切断点が 2q35 バンド、1p36 バンドであっても必ずしも、その切断点上に *PAX3*、*PAX7* が局在しているとは限らないので、それぞれの遺伝子をプローブとする FISH 法で確認する。もし、両遺伝子とも局在していない切断点であれば、その領域を FISH

法によって狭めていく。プローブとしては、染色体上での位置がヒトゲノム解析で明らかになっている bacterial artificial chromosome (BAC) クローンを用いる。これらのクローンから DNA を抽出して蛍光色素で直接標識する。ある程度、切断点領域が狭まった段階で、その領域内にキメラ遺伝子の候補となるような遺伝子がないか調べる。存在すれば、その遺伝子をプローブとする FISH 解析や Southern blot 解析で、再構成の有無を検討する。再構成が認められれば、分子生物学的手法により、キメラの相手遺伝子を同定する。

4. 研究成果

横紋筋肉腫細胞株 4 株（すべて胎児型）を SKY 法によって解析した。いずれにおいても複雑な核型を示し、異なる染色体間の転座をそれぞれ 4、5、12、17 個検出した。さらに、これらの転座について切断点の位置を解析したところ、うち 2 株では、2q35 バンド、1p36 バンド、13q14 バンドいずれにも切断点は認められなかった。残り 2 株ではそれぞれ、1p36 バンド、13q14 バンドを切断点とする染色体転座を検出したが、FISH 解析でそれぞれの切断点上に *PAX7* 遺伝子、*FOXO1* 遺伝子は局在していないことを確認した。したがって、4 株とも転座によって PAX ファミリー遺伝子の関与しない新規のキメラ遺伝子を形成し腫瘍発生に関与していることが示唆された。そこで、4 株において検出された染色体転座について、順次その切断点を FISH 法で解析した。具体的には切断点バンドに局在する多数の BAC クローンを選び、DNA を抽出してプローブとし、FISH 解析によって step-by-step で切断点を狭めていった。

その結果、今回の研究期間内で解析した転座については、その切断点領域には有力な

候補遺伝子の存在は明らかにならず、横紋筋肉腫発生後に染色体が不安定になり二次的に生じた異常である可能性も示唆された。

本研究の対象になった胎児型横紋筋肉腫細胞株 1 株において、癌遺伝子 *MDM2* が数 10 コピー以上に高度に増幅していることを以前に明らかにしていた。その後、この細胞株が分子標的治療薬としての *MDM2* 阻害薬の作用機構の解析や薬効評価に有用であることが示された。このことから、今回検出した横紋筋肉腫の染色体異常のさらなる解析は、発癌機構の解明のみならず、分子標的治療薬の効果判定等の臨床方面にも役立つと考えられた。

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 1 件)

① Miyachi M, Kakazu N, Yagyu S, Katsumi Y, Tsubai-Shimizu S, Kikuchi K, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H. Restoration of p53 pathway by Nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. Clin Cancer Res 15: 4077-4084, 2009. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嘉数 直樹 (KAKAZU NAOKI)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：20264757