

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09414

研究課題名(和文) ユーイング肉腫におけるマイクロRNAとDNA修復機構の治療抵抗性獲得への関与

研究課題名(英文) Involvement of microRNA and DNA repair mechanisms in the acquisition of therapeutic resistance 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：EWS-Fli1に特異的なsiRNAによるknock down(KD)後、有意な発現変化を示すmicroRNA(miRNA)とその標的mRNAを網羅的に解析することで、double strand break (DSB) 修復因子の遺伝子発現変化を検索し、それら修復因子の発現に関与するmiRNAを同定、その制御機構の解明を目的として研究を行ってきた。Ewing肉腫細胞は、miRNAの脱制御を介してDSB修復因子の遺伝子発現を亢進させることで、放射線・化学療法に対する抵抗性を獲得している可能性が高いため、治療抵抗性の原因となっている候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はDNA修復系因子を標的とする複数のmiRNAを同定した。これらのmiRNAは、siRNAによるEWS-Fli1のKDで発現が上昇することから、融合遺伝子によって抑制される一種のtumor suppressive miRNAである可能性が高い。これらのmiRNA作用機構を明らかにし、その発現異常を補正することで、治療抵抗性を生み出すDSB修復因子を減弱させ、治療への感受性を回復できる可能性がある。Ewing肉腫における治療抵抗性のメカニズム解明に加え、新規治療の標的の同定という側面からも本研究の意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have conducted research with the aim of elucidating the regulatory mechanism by identifying microRNAs (miRNAs) that are involved in the expression of double strand break (DSB) repair factors and investigating the gene expression changes of these repair factors through comprehensive analysis of miRNAs and their target mRNAs showing significant expression changes after knockdown (KD) using EWS-Fli1-specific siRNA. Ewing's sarcoma cells are likely to acquire resistance to radiation and chemotherapy by enhancing the gene expression of DSB repair factors through miRNA derepression. Therefore, we have identified candidates that may be responsible for the development of treatment resistance.

研究分野：肉腫

キーワード：Ewing肉腫

1. 研究開始当初の背景

Ewing 肉腫は一般的に放射線・化学療法に高感受性とされるが、治療に抵抗性を示す場合の予後は極めて不良である。標準治療が奏効しない場合に有効な二次治療も確立されていない。Ewing 肉腫は特異的な融合遺伝子 EWS-Fli1 により発がんするが、EWS-Fli1 は異常な転写因子としての機能を有し、下流の標的遺伝子の発現変化を引き起こすことが知られている。従って、治療抵抗性の獲得においても EWS-Fli1 が中心的な役割を果たす可能性があると考えた。一方、我々は予備実験において、EWS-Fli1 の knock down (以下、KD) により、放射線治療や抗がん剤によって生じる DNA 二本鎖切断を修復する DSB 修復系因子の発現が、ほぼ共通して低下することを見いだした。さらに、これら修復系因子の mRNA を標的とする miRNA の発現が共通して上昇していることも観察された。即ち、Ewing 肉腫における DSB 修復系因子の発現は、EWS-Fli1 融合遺伝子の支配下にある miRNA により制御されている可能性があり、その結果として治療抵抗性の獲得に繋がると考えられることから、本研究によって治療抵抗性メカニズムの解明をおこなうことが重要であると考えた。

2. 研究の目的

Ewing 肉腫は特異的な融合遺伝子 EWS-Fli1 の形成により発がんする。肉腫においては、多くの疾患特異的な融合遺伝子が同定され診断に応用されているが、Ewing 肉腫はその契機となった代表的肉腫である。Ewing 肉腫は高悪性度の腫瘍であり、放射線および化学療法に対しては高感受性であることも知られているが、治療抵抗性の場合の予後は極めて不良であり、抵抗性獲得の機序の解明と新規治療の開発が求められている。しかし、肉腫は癌腫と比較して発生頻度が極めて低いため、その病態の詳細は未だ明らかにされていない。融合遺伝子が生じた結果肉腫においてどのような異常が発生するのか、特に融合遺伝子形成により肉腫細胞がどのように治療抵抗性を獲得するのか、その詳細はこれまで研究されていない。EWS-Fli1 に対する siRNA を用いて KD を行うことで変化する microRNA および mRNA を抽出することで EWS-Fli1 による直接的な影響を受けている因子と考えることができる。我々は EWS-Fli1 を KD し未治療の細胞群と網羅的な遺伝子変化を観察することで特異的な融合遺伝子が治療抵抗性にかかわるメカニズムを検証した。

3. 研究の方法

- (1) Ewing 肉腫細胞株 4 種 (A673, SKNMC, RDES, SKES-1) に対し未治療細胞群 (Untreated) と EWS-Fli1 siRNA を用いた KD 群を作成した。それぞれの細胞から total RNA を抽出し microRNA array, cDNA array による解析を行い変化した遺伝子群を解析した。
- (2) 修復因子 mRNA を標的とする miRNA mimic (mirVana miRNA mimic, Life Tech) を導入後、RT-PCR およびウェスタンブロット法による標的 mRNA および蛋白の発現を確認した。
- (3) Mimic oligo および siRNA を導入後の細胞に DSB を誘発する抗がん剤トポイソメラーゼ阻害剤を投与し、細胞周期およびアポトーシス誘導の変化を観察した。
- (4) 蛍光免疫染色により、untreated 群と mimic oligo 処理後に細胞について Rad51 と Apoptosis 誘導の指標として AnnexinV の発現を調査した。

4. 研究成果

(1) Ewing 肉腫細胞株に EWS-Fli1 特異的な siRNA を導入した細胞と untreated を比較した。microRNA array (図 1)、cDNA array (図 2) にて 4 種の細胞で共通して KD 後に miR-183 が上昇し BRCA1 が低下していた。

また Plot 解析 (図 3) でも同様の結果となったことから、EWS-Fli1 によって miR-183 が低下することで BRCA1 が恒常的に発現している可能性が明らかとなった。

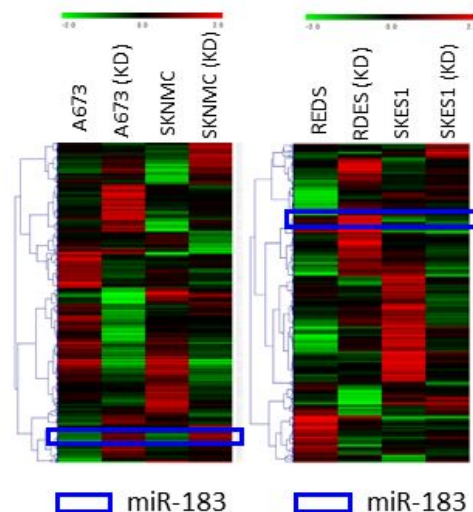


図 1

(2) 我々は BRCA1 が修復因子として治療抵抗性を引き起こしていると考えた。そこで miR-183 oligonucleotide mimic (5'-UAUGGCACUGG UAGAAUUCACU -3')を導入し target となる BRCA1 の mRNA を PCR で、またタンパク発現を Western blot で調べた (図 4)。いずれも miR-183 を導入すると BRCA1 が低下した。

(3) miR-183 による BRCA1 低

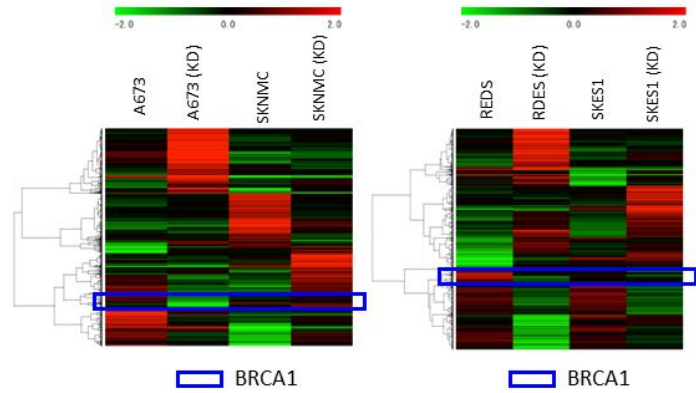


図 2

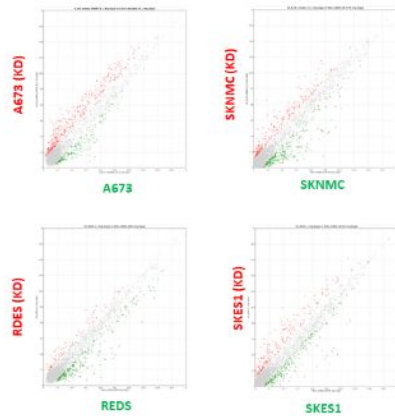


図 3

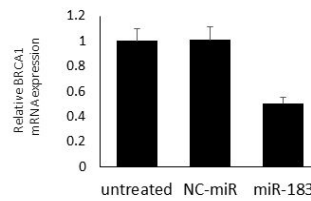


図 4

下により修復系機構が低下すれば抗がん剤の感受性が向上するはずである。BrdU 取り込みによる細胞周期およびアポトーシス抵抗性における変化を観察した。

miR-183+Topoisomerase の両者を組み合わせると細胞周期の遅延およびアポトーシス細胞が大きく上昇した (図 5)。

(4) 蛍光免疫染色で BRCA1 による誘導を受ける修復因子である Rad51 およびアポトーシスの指標となる AnnexinV を染色し miR-183 の影響を調査した (図 6)。

miR-183 を導入すると Rad51 が低下し apoptosis 細胞が増加した。BRCA1 が損なわれることで修復遺伝子である Rad51 の誘導が阻害され結果としてアポトーシスが発生していることが推察された。

以上より、miR183 は BRCA1 を阻害することを通じて Tumor suppressive miR の役割を果たしており、さらに EWS-Fli1 はこの miR-183 を抑制することで修復機構を活性化させ治療抵抗性を獲得していることが明らかとなった。

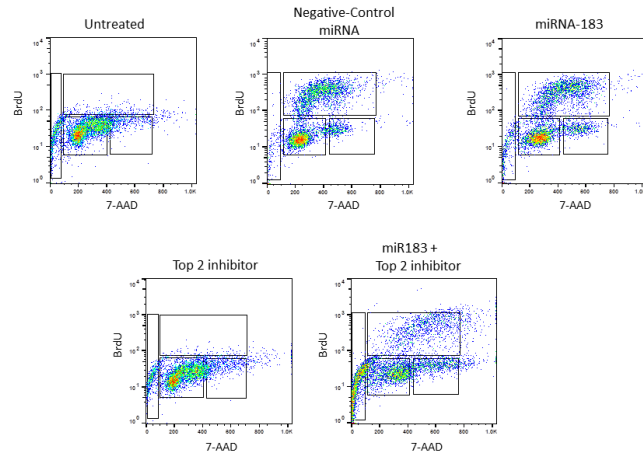
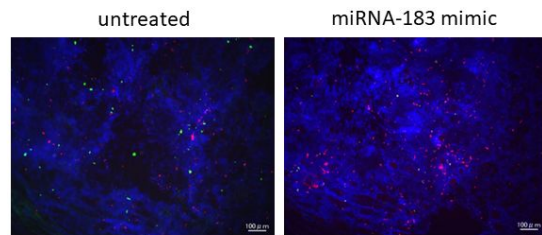


図 5



■ : RAD51 ■ : Cleaved PARP (Apoptosis cell)

図 6

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 0件）

1. 著者名 Masanori Kawano	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 Scientific Reports	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 Kubota Y, Tanaka K, Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Tsumura H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Surrogacy analysis of intermediate end-points for overall survival in randomized controlled trials of rhabdomyosarcoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-23944-w.	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 K, Suzuki K, Miyashita K, Wakasa K, Kawano M, Nakatsu Y, Tsumura H, Yoshida MA, Oda S.	4. 巻 12
2. 論文標題 誌論文]（計 5 件）(2) Activation of recombinational repair in Ewing sarcoma cells carrying EWS-FLI1 fusion gene by chromosome translocation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19164-x.	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 Nishida M, Terabayashi T, Matsuoka S, Okuma T, Adachi S, Tomo T, Kawano M, Tanaka K, Tsumura H, Anai H, Ishizaki T, Nishida Y, Hanada K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Mechanism of action of non-camptothecin inhibitor Genz-644282 in topoisomerase I inhibition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03920-w.	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 K, Machida R, Kawai A, Kawano M, Morii T, Hatano H, Toguchida J, Okuma T, Takeyama M, Takenaka S, Akisue T, Furuta T, Emori M, Hiruma T, Outani H, Yamamoto T, Kataoka T, Fukuda H, Ozaki T, Iwamoto Y.	4. 巻 127
2. 論文標題 Perioperative Adriamycin plus ifosfamide vs. gemcitabine plus docetaxel for high-risk soft tissue sarcomas: randomised, phase II/III study JC0G1306.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Br J Cancer.	6. 最初と最後の頁 1487-1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-022-01912-5.	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55回 日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
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 miR-152 における CDK5R1発現と腫瘍増殖能の解析
3. 学会等名 第5回 日本サルコーム治療研究会学術集会
4. 発表年 2022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	田中 和宏 (Tanaka Kazuhiro) (10274458)	大分大学・医学部・教授 (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
---------	---------