

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890183

研究課題名（和文） がん細胞における細胞老化回避機構の解明

研究課題名（英文） Study on the Mechanisms of Escaping Senescence of Cancer Cells.

研究代表者

松延 知哉 (MATSUNOBU TOMOYA)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・研究員

研究者番号：20543416

研究成果の概要（和文）：

本研究代表の過去の研究により、Ewing 肉腫特異的 EWS-Fli1 融合タンパクが、細胞老化を抑制することが、発がんに関与していることが示唆されているが、詳細は不明であった。本研究により、①細胞老化を示唆する形態学的変化は、EWS-Fli1 発現抑制後、少なくとも 24 時間後には現れていること、② EWS-Fli1 発現抑制後 12 時間に比べ、24 時間では多くの遺伝子発現変化を来しており、細胞周期関連因子が変化していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Previously, I have reported the possible role of EWS-Fli1 chimeric protein in evasion of senescence in Ewing family tumors. In this study, to elucidate the molecular mechanism of escaping senescence of Ewing sarcoma cells mediated by EWS-Fli1, morphological and microarray analyses were performed. By 24 hours after deletion of EWS-Fli1 by siRNA, Ewing sarcoma cells displayed a flattened and enlarged morphology, which could imply a senescence-like phenotype. Microarray analysis showed that depletion of EWS-Fli1 by siRNA caused dramatic change of the mRNA expression of a large number of genes, including cell-cycle regulatory genes, in a time-dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	990,000	297,000	1,287,000
22年度	890,000	267,000	1,157,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,880,000	564,000	2,444,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：臨床外科学・整形外科

キーワード：がん、細胞老化

1. 研究開始当初の背景

Ewing ファミリー腫瘍 (*Ewing family tumors*; 以下 **EFT**) は、小児悪性腫瘍の約 2.3% を占め、若年者に好発する高悪性度の骨・軟部腫瘍で、極めて予後不良である。近年系統的化学療法が導入され 5 年生存率は改善されたが、転移再発例の予後は 30% に満たず、予後改善はほぼ限界に達している。EFT のほとん

どの症例では、11 番染色体と 22 番染色体の間で特徴的染色体相互転座が認められ、その転座の結果形成される **EWS-Fli1** 融合遺伝子が EFT の発がんの原因と考えられている。本研究代表は、EWS-Fli1 が、細胞老化を回避することが、発がんメカニズムの一つであることを見いだした。細胞老化は細胞死の一種であるが、同じ細胞死であるアポトーシスに比

べ、細胞死を引き起こすメカニズムは不明である。Ewing 肉腫に再現性よく細胞老化を誘導できる実験系を用い、解析をすすめることで、Ewing 肉腫のみならず、がん細胞一般における細胞老化回避メカニズムを証明できると予想した。

2. 研究の目的

EFT細胞がEWS-Flil発現抑制により細胞老化におちいる研究結果に基づき、(1) *EWS-Flil* により発現制御されている遺伝子をマイクロアレイシステムで同定し、細胞老化との関連を調べる、(2)細胞老化に陥った細胞を検出するマウスモデルを構築し、個体レベルで細胞老化を解析可能な実験モデルを確立する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Ewing 肉腫細胞株 WE-68 に、EWS-Flil 特異的 siRNA およびコントロール siRNA を、リポフェクション法にてトランスフェクションした。経時的に顕微鏡にて形態を観察した。

(2) WE-68 細胞にコントロール siRNA 及び EWS-Flil 特異的 siRNA トランスフェクション後 12 時間、24 時間後に RNA を回収し、マイクロアレイを施行した。コントロール siRNA、EWS-Flil 特異的 siRNA トランスフェクション後、12 時間、24 時間のサンプルをそれぞれ WE-S12、24 と WE-B12、24 とした。

《 マイクロアレイ 》

NimbleGen 社

1. 生物種： Homo sapiens(whole genome)
 2. データソース： GenBank
 3. アレイ設計概要：
 - 1) 搭載遺伝子数； 38, 108 遺伝子/マイクロアレイ
 - 2) 遺伝子あたりのプローブ数； 5 プローブ/遺伝子 (PerfectMatch プローブ 5 本)
 - 3) プローブ長； 60mer/プローブ
- 細胞株； WE-68 (p53 野生型 EFT 細胞株)

本マイクロアレイから得られた蛍光強度を元に、RMA (Robust Multi-chip Analysis) アルゴリズムによるデータ補正を行ったデータを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞形態の変化

Ewing 肉腫細胞株において強力に EWS-FLI1 発現をノックダウンすると、12 時間後から EWS-FLI1 タンパク質の発現低下を認め、すでに 24 時間後には EFT 細胞に細胞死の一種である細胞老化を示唆する細胞の大型扁平化を呈することを見いだした。

(2) マイクロアレイ解析

【siRNA トランスフェクション後 12 時間の遺伝子発現の変化】

サンプル「WE-S12」および「WE-B12」の 2 データ間の比較を行った結果、相関係数は

$$\cdot R = 0.988512949593681$$

となった。

次に、遺伝子レベルの発現強度から、2 サンプル間でそれぞれ 1.5 倍以上、2.0 倍以上、4.0 倍以上、8 倍以上の変化を示す遺伝子を抽出した(「増」「減」は、「WE-S12」に対して、発現が増減している遺伝子数を表す)。また、図 2 は下記にて抽出された遺伝子を図 1 に重ね合わせた図である。

12時間後	総遺伝子数	発現増加	発現減少
変化無し	61		
1.5倍未満	35805	18767	17038
1.5倍以上/2.0倍未満	2070	1081	989
2.0倍以上/4.0倍未満	171	55	116
4.0倍以上/8.0倍未満	1	1	0
8倍以上	0	0	0

Scatter Plot

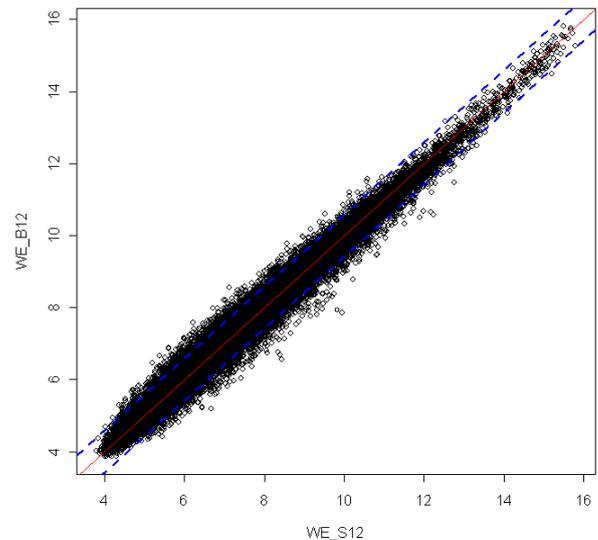


図 1： 遺伝子レベルでのスカッタープロット図

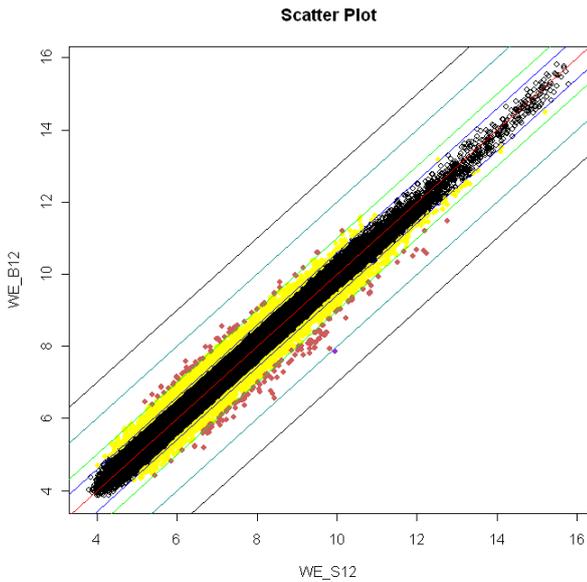


図 2: FoldChange により抽出された遺伝子のスクアッタープロット図。赤実線: $y=x$ 。他の実線は赤実線から外側に向かって、1.5 倍、2.0 倍、4.0 倍、8.0 倍

【 siRNA トランスフェクション後 24 時間の遺伝子発現の変化 】
 サンプル「WE-S24」および「WE-B24」の 2 データ間の比較を行った結果、相関係数は
 ・ $R = 0.966414692386252$
 であった。

次に、遺伝子レベルの発現強度から、2 サンプル間でそれぞれ 1.5 倍以上、2.0 倍以上、4.0 倍以上、8 倍以上の変化を示す遺伝子を抽出した。（「増」「減」は、「WE-S24」に対して、発現が増減している遺伝子数である）。また、図 4 は下記にて抽出された遺伝子を図 3 に重ね合わせた図である。

24時間後	総遺伝子数	発現増加	発現減少
変化無し	37		
1.5倍未満	29447	16528	12919
1.5倍以上/2.0倍未満	6205	3466	2739
2.0倍以上/4.0倍未満	2294	698	1596
4.0倍以上/8.0倍未満	118	5	113
8倍以上	7	0	7

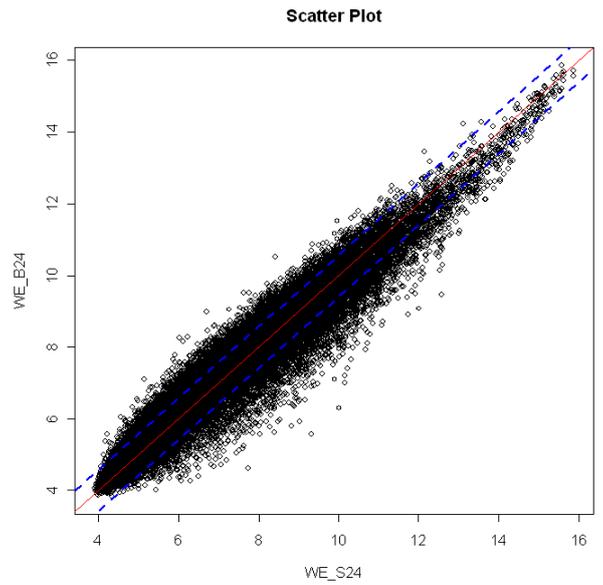


図 3: 遺伝子レベルでのスクアッタープロット図

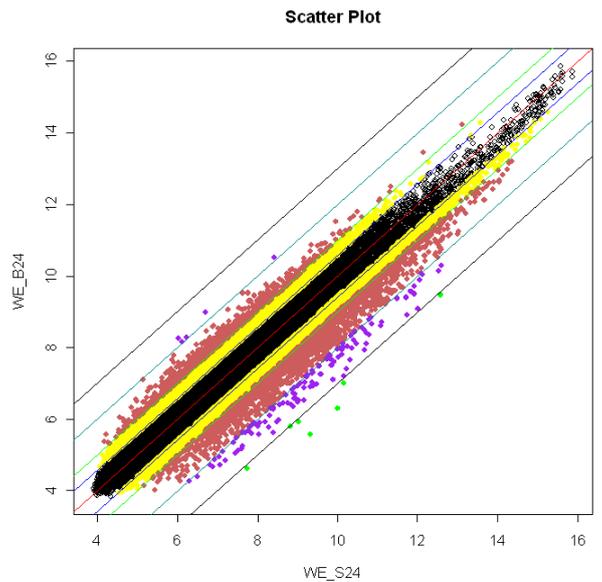


図 4: FoldChange により抽出された遺伝子のスクアッタープロット図。赤実線: $y=x$ 。他の実線は赤実線から外側に向かって、1.5 倍、2.0 倍、4.0 倍、8.0 倍

以上の結果から、EWS-Flil1 発現抑制により影響される遺伝子は早期から発現変化を来していることがわかった。これまでに、細胞老化の表現系は、細胞老化刺激を加えて数日から現れるとされていたが、数時間後から始まっている可能性がある。特に、EWS-Flil1 発現抑制後 24 時間で 8 倍以上変化が見られた遺伝子の中には、細胞周期関連因子や転写調節因子が含まれていることは注目すべき

点である。過去の研究で EWS-Flil 融合タンパクが異常な転写因子として働き、細胞周期に異常を来すことが明らかとなっており、今後これらの因子と細胞老化との関連を解析する予定である。

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 2 件)

・松延知哉、松本嘉寛、中谷文彦、他. 融合遺伝子 EWS-FLI1 Ewing 肉腫の分子標的治療の可能性. 整形外科. 61 巻、8 号 : 727-731, 2010 査読無し

・松田秀一、播戸谷勝三、芳田辰也、松本嘉寛、松延知哉、岩本幸英. 腫瘍用人工関節置換術後の深部感染に対する一期的再置換術. 整形外科. 61 巻、8 号 : 932-935, 2010 査読無し

[学会発表] (計 3 件)

・Tomoya Matsunobu, et al. Mice deficient of the TGF- β type I receptor ALK5 in the sclerotome develop severe spinal scoliosis with spina bifida. The American society for bone and mineral research 31st annual meeting. Sept. 2009, Denver, Colorado, USA

・Tomoya Matsunobu, et al. ALK5, a TGF-beta type I Receptor, Regulates Osteoblast-Dependent Osteoclast Maturation and is Required for Cartilage Matrix Remodeling. The American society for bone and mineral research 32nd annual meeting. Oct. 2010, Toronto, ON, Canada

・松延知哉、他. TGF- β I 型受容体 ALK5 は、骨芽細胞依存的に破骨細胞分化を制御し、軟骨マトリックス分解に必要である. 第 24 回日本軟骨代謝学会. 2011 年 3 月、福岡

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

松延 知哉 (MATSUNOBU TOMOYA)

独立行政法人国立がん研究センター

研究者番号 : 2 0 5 4 3 4 1 6

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

