

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590367

研究課題名（和文） キメラがん蛋白 TLS-CHOP の新規がん化機構の解明と臨床応用を目指した基礎研究

研究課題名（英文） Basic research for investigation of novel oncogenic mechanism by TLS-CHOP chimeric oncoprotein and its clinical application

研究代表者

及川 恒輔 (OIKAWA KOSUKE)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70348803

研究成果の概要（和文）：染色体転座に起因する *TLS-CHOP* 融合遺伝子は、粘液型脂肪肉腫特異的に発生するがん遺伝子であるが、その発がんメカニズムや腫瘍細胞における役割の詳細については不明である。本研究では、*TLS-CHOP* の機能として、癌抑制性サイトカイン MDA-7/IL-24 の抑制と、miR-486 の抑制を介した腫瘍増殖・転移促進因子 PAI-1 の発現誘導が明らかとなり、また、腫瘍化関連タンパク PRG4 を発現誘導する分子経路の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The *TLS-CHOP* fusion gene derived from chromosomal translocation is myxoid liposarcoma-specific oncogene. However, its oncogenesis mechanism and functions in tumor cells are still unclear. In this study, we have revealed that *TLS-CHOP* represses an anticancer cytokine MDA-7/IL-24 expression, and represses miR-486 that targets a tumor cell growth and metastasis activator PAI-1. In addition, a novel molecular pathway that induces expression of a tumorigenesis-related protein PRG4 has been suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍・キメラ遺伝子

1. 研究開始当初の背景

軟部腫瘍ではがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異は少ない反面、染色体転座に起因する腫瘍特異的なキメラ遺伝子が存在し、その遺伝子産物が腫瘍発生に関わる転写因子を形成する。*TLS-CHOP* は粘液型脂肪肉腫特異的な融合タンパクであり、その標的遺伝子として *Proteoglycan 4 (PRG4)* が同定されている。*PRG4* は Downstream of Liposarcoma 54

(DOL54)、Megakaryocyte Stimulating Factor (MSF)、Superficial Zone Protein (SZP)、Lubricin などの名称でも知られ、トランスフォーム活性の他にも多様な生理機能を持つ。我々はこれまで、がんに関わる遺伝子の機能の解析とその診断や治療への応用を目指した基礎研究を行ってきたが (Cancer Res. 61, 5707-5709, 2001; Cancer Res. 64, 3545-3549, 2004; Am. J. Pathol. 174, 309-316,

2009 他)、最近、*TLS-CHOP* 特異的 siRNA 処理をした粘液型脂肪肉腫由来培養細胞、及び、*TLS-CHOP* を強発現させた正常細胞由来培養細胞を、それぞれ無処理の当該細胞と比較して行なった cDNA マイクロアレイにより、*TLS-CHOP* が、多様ながん細胞に対して抗腫瘍効果を示す癌抑制性サイトカイン MDA-7/IL-24 の発現を抑制する可能性を見出した。さらに、予備的な実験において、*TLS-CHOP* siRNA と *MDA-7/IL-24* siRNA を粘液型脂肪肉腫由来培養細胞にダブルトランスフェクションすると、*TLS-CHOP* siRNA 単独処理では見られる細胞増殖抑制と細胞死誘導が回避された。従って、*TLS-CHOP* による腫瘍化には、MDA-7/IL-24 の発現抑制が重要なプロセスの 1 つであることが示唆された。また、microRNA マイクロアレイの解析結果から、このプロセスの制御に、特異的 microRNA が介在する可能性も示唆された。以上より、*TLS-CHOP* による腫瘍化機構において、PRG4 を介した腫瘍化促進プロセスと MDA-7/IL-24 発現抑制を介したがん化抑制機構を排除するプロセスの存在が強く示唆され、それらを検証すべく本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

(1) *TLS-CHOP* による MDA-7/IL-24 発現抑制機構の解明

TLS-CHOP による MDA-7/IL-24 の発現抑制が粘液型脂肪肉腫細胞の増殖に必須であることが既に示唆されていたが、本研究ではそれを実験的に確定すると共に、そのプロセスに特異的 microRNA が介在することの検証、及びその microRNA 群の同定を目指し、最終的に、*TLS-CHOP* から MDA-7/IL-24 抑制に至る分子パスウェイの詳細を解明する。

(2) PRG4 による発がん機構の解明

PRG4 には複数のスプライシングバリエントの存在が知られているため、腫瘍と各バリエントとの機能的関係性を明らかにする。さらに、PRG4 による発がんメカニズムの詳細について、PRG4 を強発現させた際の培養細胞の細胞状態の詳細な解析や、PRG4 の細胞内局在及び他の細胞増殖に関わる分子との相互作用などの解析を通じて解明する。

3. 研究の方法

(1) *TLS-CHOP* による特異的 microRNA の発現制御を介した癌抑制性サイトカイン MDA-7/IL-24 の発現抑制機構の解明

① 粘液型脂肪肉腫発生機構に関わる microRNA の同定

microRNA マイクロアレイとコンピュータの標的予測の結果から、既に、*TLS-CHOP* に発現誘導されて MDA-7/IL-24 を発現抑制する microRNA の候補群が選別されている。本研究細目では、目的の microRNA の同定を目指し、

それらの各候補 microRNA の機能を特異的に阻害する microRNA knockdown probe を用いて MDA-7/IL-24 の発現量の変化を検討した。②MDA-7/IL-24 が粘液型脂肪肉腫に抗腫瘍効果を持つことの確認

MDA-7/IL-24 が多様ながんに対して抗腫瘍効果を持つことは既に良く知られた事実であるが、粘液型脂肪肉腫に対する効果は未確定である。我々の実験結果からその効果は強く示唆されるものの、直接的な証拠を得るには至っていない。従って、本研究細目では、MDA-7/IL-24 発現ベクターを作成し、粘液型脂肪肉腫由来培養細胞にトランスフェクションすることによりその抗腫瘍効果を確認することを目指した。

(2) *TLS-CHOP* に発現誘導される腫瘍化関連タンパク PRG4 のがん化促進機構の解明

① がん化に関わる PRG4 バリエントの決定

PRG4 は複数のバリエントを持ち、それらの使い分けと翻訳後修飾によって多彩な生理活性を示す。そこで本研究では、実際に腫瘍化能に関与するバリエントを決定する目的で、各バリエントの発現ベクター作成を試みた。

② PRG4 を介したがん化メカニズムの解析

PRG4 は、脂肪分化過程において一過性に高発現することから、脂肪分化における重要な役割が示唆されている。また、我々の予備実験で、特異的 siRNA による PRG4 ノックダウンが粘液型脂肪肉腫由来培養細胞の劇的な増殖抑制をもたらした。従って本研究細目では、PRG4 のがん化における実際の機能の検討を想定した。

4. 研究成果

(1) *TLS-CHOP* による特異的 microRNA の発現制御を介した癌抑制性サイトカイン MDA-7/IL-24 の発現抑制機構の解明

① 粘液型脂肪肉腫発生機構に関わる microRNA の同定

期待される候補として 2 種類の microRNA を選定し、それらの特異的 knockdown probe の単独及び二重トランスフェクションを粘液型脂肪肉腫由来培養細胞に対して行ない、MDA-7/IL-24 の発現量の変化を検討したが、今のところ有意な変化は見られていない。これには、knockdown probe の効率の問題や、他の MDA-7/IL-24 発現抑制に有効な microRNA の存在などの可能性も考えられるので、引き続き検討中である。一方、MDA-7/IL-24 への効果とは別に、*TLS-CHOP* が miR-486 の発現抑制を介して、腫瘍の増殖・転移促進因子として機能する PAI-1 の発現誘導を行なうことが判明し、原著論文として報告した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012, 427: 355-360)。

② MDA-7/IL-24 が粘液型脂肪肉腫に抗腫瘍効果を持つことの確認

MDA-7/IL-24 発現ベクターを作成し、粘液型

脂肪肉腫由来培養細胞にトランスフェクションしたところ、MDA-7/IL-24 の高発現による細胞増殖阻害効果が確認できた。TLS-CHOP が MDA-7/IL-24 の発現抑制することも併せて、原著論文として報告した (Br. J. Cancer 2012, 106: 1976-1979)。

(2) TLS-CHOP に発現誘導される腫瘍化関連タンパク PRG4 のがん化促進機構の解明

①がん化に関わる PRG4 バリエントの決定

がん化に関わるバリエントを決定するためには、各バリエントをそれぞれ細胞内で発現させてみてその影響を検討する必要がある、そのためには発現ベクターの作成が必要となる。PRG4 遺伝子は、その塩基配列に特徴的な長い繰り返し配列を含み、また、コード領域の全長は 4000 bp を超える。このことの影響の程度は不明だが、当初全長を 1 度の PCR で取得しようとしたものの、その増幅断片は得られなかった。そこで、全長を 3 分割して PCR を行ない、それぞれの cDNA 増幅断片を取得後、制限酵素サイトを利用してそれらを接続し、全長を取得する方法を採用した。しかし、一部の cDNA 断片は得られたものの、長い繰り返し配列を含む cDNA 断片は未だに得られておらず、さらに PCR 条件や使用する Taq ポリメラーゼを変えること等で検討を続けている。

②PRG4 を介したがん化メカニズムの解析

PRG4 のがん化メカニズムの解析には、上記研究細目による PRG4 発現ベクターの完成が必須であるため、本項目の本来の計画は全く進んでいない。一方、マウスの細胞を用いた研究から、特異的な転写制御因子群が PRG4 の発現を制御する分子パスウェイを構成することが分かって来たが (伊藤ら、未発表データ)、一方、microRNA マイクロアレイとコンピュータの標的予測の結果から、TLS-CHOP によって発現抑制される microRNA 群の中に、この PRG4 発現誘導分子パスウェイの最上流の転写因子を標的とする可能性があるものが複数種見出された。従って、TLS-CHOP による新たな分子パスウェイの存在が強く示唆され、さらに検討を続けている。

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 10 件)

- ① N. Borjigin, S. Ohno, W. Wu, M. Tanaka, R. Suzuki, K. Fujita, M. Takanashi, K. Oikawa, T. Goto, T. Motoi, T. Kosaka, K. Yamamoto, M. Kuroda. TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有

2012, 427: 355-360. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.063.

- ② T. Gui, G. Zhou, Y. Sun, A. Shimokado, S. Itoh, K. Oikawa, Y. Muragaki. MicroRNAs that target Ca²⁺ transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification. Lab. Invest., 査読有 2012, 92: 1250-1259. doi: 10.1038/labinvest.2012.85.

- ③ K. Oikawa, M. Tanaka, S. Itoh, M. Takanashi, T. Ozaki, Y. Muragaki, M. Kuroda. A novel oncogenic pathway by TLS-CHOP involving repression of MDA-7/IL-24 expression. Br. J. Cancer, 査読有 2012, 106: 1976-1979. doi: 10.1038/bjc.2012.199.

- ④ M. Xu, M. Takanashi, K. Oikawa, H. Nishi, K. Isaka, T. Yoshimoto, J. Ohyashiki, M. Kuroda. Identification of a novel role of Septin 10 in paclitaxel-resistance in cancers through a functional genomics screen. Cancer Sci., 査読有 2012, 103: 821-827. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02221.x.

- ⑤ Y. Hirai, Y. Muragaki, S. Itoh, K. Oikawa, M. Juri, T. Kondo, Y. Okamura. Fibulin-5 Protein is reduced in the lung of patients with spontaneous pneumothorax who are under 25 years old. Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg., 査読有 2012, 18: 200-205. doi.org/10.5761/atcs.oa.11.01758.

- ⑥ S. Kanno, T. Gui, S. Itoh, Z. Gai, Y. Sun, K. Oikawa, M. Yoshida, Y. Muragaki. Aberrant expression of the P2 promoter-specific transcript Runx1 in epiphyseal cartilage of Trps1-null mice. Exp. Mol. Pathol., 査読有 2011, 90: 143-148. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.11.010.

- ⑦ M. Kawakatsu, S. Kanno, T. Gui, Z. Gai, S. Itoh, H. Tanishima, K. Oikawa, Y. Muragaki. Loss of Smad3 gives rise to poor soft callus formation and accelerates early fracture healing. Exp. Mol. Pathol., 査読有 2011, 90: 107-115. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.10.011.

- ⑧ R. Nishioka, S. Itoh, T. Gui, Z. Gai, K. Oikawa, M. Kawai, M. Tani, H. Yamaue, Y. Muragaki. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo. Exp. Mol. Pathol., 査読有 2010, 89: 149-157. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.05.008.

- ⑨ Z. Gai, G. Zhou, T. Gui, S. Itoh, K. Oikawa, K. Uetani, Y. Muragaki. Trps1 haploinsufficiency promotes renal fibrosis by increasing Arkadia expression. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 査読有 2010, 21: 1468-1476. doi: 10.1681/ASN.2009121201.
- ⑩ M. Shigoka, A. Tsuchida, T. Matsudo, Y. Nagakawa, H. Saito, Y. Suzuki, T. Aoki, Y. Murakami, H. Toyoda, T. Kumada, R. Bartenschlager, N. Kato, M. Ikeda, T. Takashina, M. Tanaka, R. Suzuki, K. Oikawa, M. Takanashi, M. Kuroda. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol. Int.*, 査読有 2010, 60: 351-357. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02526.x.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 及川恒輔, 粘液型脂肪肉腫特異的キメラがんタンパク TLS-CHOP が関わる多段階発がん機構の探究, 和歌山悪性腫瘍研究会, 2012年12月15日, 和歌山ビッグ愛(和歌山県)
- ② 及川恒輔, Wapl regulates HP1 expression and levels of various histone H3 tail modifications. 日本分子生物学会年会, 2012年12月12日, マリンメッセ福岡(福岡県)
- ③ 及川恒輔, TLS-CHOP represses expression of the antitumor cytokine MDA-7/IL24 in myxoid liposarcoma. 日本癌学会学術総会, 2012年09月20日, さっぽろ芸文館(北海道)
- ④ 及川恒輔, A novel oncogenic mechanism of the chimeric oncoprotein TLS-CHOP mediated by a tumor suppressor protein MDA-7/IL24. 日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑤ 孫 玉静, Expression of PRG4 variant C specifically functions in tumor formation and development of myxoid liposarcoma. 日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑥ 伊藤俊治, Gdf5/Trps1 signaling regulates Prg4 expression in the superficial cells of the articular cartilage. 日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑦ 及川恒輔, 粘液型脂肪肉腫における分子治療の可能性を探る. 日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2011年12月1日, ダイワロイネットホテル和歌山(和歌山県)
- ⑧ 及川恒輔, Analysis of the novel molecular function of the cohesin-associated protein Wapl. 日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋国際会議場(愛知県)
- ⑨ 及川恒輔, コヒーシン制御タンパク Wapl の新しい機能の検討. 和歌山医学会総会, 2011年7月10日, 和歌山県立医科大学(和歌山県)
- ⑩ 孫 玉静, 粘液型脂肪肉腫における PRG4 の機能の検討. 和歌山医学会総会, 2011年7月10日, 和歌山県立医科大学(和歌山県)
- ⑪ 伊藤俊治, 指節間関節形成における軟骨原基表層細胞の役割. 和歌山医学会総会, 2011年7月10日, 和歌山県立医科大学(和歌山県)
- ⑫ 桂 婷, カルシウム輸送体をターゲットにするマイクロ RNA はリンで誘導される. 和歌山医学会総会, 2011年7月10日, 和歌山県立医科大学(和歌山県)
- ⑬ 及川恒輔, The PRG4 variants associated with sarcoma development have a potential to be therapeutic targets. 日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ⑭ 伊藤俊治, Gdf5/Trps1 は関節形成軟骨細胞の分化を調節する. 日本分子生物学会年会日本生化学会大会合同大会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ⑮ 及川恒輔, 粘液型脂肪肉腫におけるキメラタンパク TLS-CHOP による腫瘍化機構の検討. 和歌山医学会総会, 2010年7月11日, 和歌山県立医科大学(和歌山県)
- ⑯ 伊藤俊治, Prg4 は Gdf5/Trps1 の支配下に指節間関節形成に関与する. 和歌山医学会総会, 2010年7月11日, 和歌山県立医科大学(和歌山県)
- ⑰ 蓋 志博, 腎発生期における尿管芽の枝分かれと集合管形成の調節分子機構. 和歌山医学会総会, 2010年7月11日, 和歌山県立医科大学(和歌山県)
- ⑱ 桂 婷, klotho マウスにおける血管石灰化と血中リン濃度との関連性について. 和歌山医学会総会, 2010年7月11日, 和歌山県立医科大学(和歌山県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 恒輔 (OIKAWA KOSUKE)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70348803

(2) 研究分担者

村垣 泰光 (MURAGAKI YASUTERU)

和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40190904

(3) 連携研究者
()

研究者番号：