

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10日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591166

研究課題名（和文） 胎児型横紋筋肉腫に認められた新規融合遺伝子の機能解析と病態解明

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of a novel fusion gene in embryonal rhabdomyosarcoma.

研究代表者 土屋 邦彦 (TSUCHIYA KUNIHICO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科小児発達医学・助教

研究者番号：90381938

研究成果の概要（和文）：我々は、胎児型横紋筋肉腫の症例に認められた複雑染色体転座を解析し、PAX3-NCOA2融合遺伝子を同定した。同遺伝子の造腫瘍性に果たす役割は未解明であり、PAX3-NCOA2 (P3N2)、PAX3-FKHR (P3F) 遺伝子を、MSCVレトロウイルス発現系を用いてマウス筋芽細胞（C2C12）に導入し、それぞれの安定発現細胞株を樹立した。P3N2発現株では細胞増殖、移動能、足場非依存性増殖、PAX3のconsensus binding siteにおける転写活性をそれぞれ促進した。P3N2は増殖を促進し、筋分化を阻害することで横紋筋肉腫の造腫瘍性に関わると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed a complex chromosomal translocation in a case of embryonal rhabdomyosarcoma (RMS) and identified the translocation as one that generates the fusion gene *PAX3-NCOA2*. Because the role of this translocation in RMS tumorigenesis is unknown, we established two types of stable mouse myoblast C2C12 cell lines expressing PAX3-NCOA2 and PAX3-FKHR, respectively. Compared to control cells, PAX3-NCOA2 cells grew faster, were more motile, were less anchorage dependent and showed greater transcriptional activation of the PAX3 consensus binding site. These results indicate that the *PAX3-NCOA2* fusion gene has a dual role in the tumorigenesis of RMS to promote the proliferation and to inhibit the myogenic differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	700,000円	210,000円	910,000円
平成23年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
平成24年度	500,000円	150,000円	650,000円
年度			
年度			
総計	2,100,000円	630,000円	2,730,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：横紋筋肉腫、融合遺伝子、LXXLL motif

1. 研究開始当初の背景

小児で最も頻度の高い軟部悪性腫瘍である横紋筋肉腫は、組織型として胞巣型と胎児型に大別される。胞巣型では、PAX3-FKHR、PAX7-FKHR の二つの融合遺伝子が同定されており、腫瘍化に寄与していることが明らかになりつつある。一方、胎児型において特定の融合遺伝子は今まで確認されていない。今回、我々は胎児型の症例で認められた複雑な染色体転座を解析し、新規融合遺伝子PAX3-NCOA2を同定した。

2. 研究の目的

レトロウイルス発現系を用いて、PAX3-NCOA2 融合遺伝子の機能解析を行い、特に PAX3-FKHR との差異、共通点について検討し、依然予後の極めて不良な PAX3-FKHR 陽性横紋筋肉腫の病態、ひいては横紋筋肉腫発生における分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

PAX3-NCOA2 (P3N2)、PAX3-FKHR (P3F) 遺伝子を、MSCV レトロウイルス発現系を用いてマウス筋芽細胞 (C2C12) に導入し、それぞれ

の安定発現細胞株を樹立し、転写活性、増殖、分化、移動能について解析を行った。また、発現アレイを用いて、各細胞株間の発現の差異を解析した。

4. 研究成果

P3N2 発現株では、コントロール株 (MSCV empty 株) と比較して、PAX3 の consensus binding site における転写活性、細胞増殖(図 1)、移動能、足場非依存性増殖を、それぞれ促進した。分化培地にて分化誘導を行ったところ、コントロール株では筋分化が誘導され、Myosin heavy chain 陽性細胞の増加を認めたが、P3N2 発現株では、Myosin heavy chain 陽性細胞をほとんど認めず、筋分化が阻害された (図 2)。P3F 発現株は P3N2 発現株に比して、より強い増殖促進や分化阻害を示した。

P3N2 は増殖を促進し、筋分化を阻害することで横紋筋肉腫の造腫瘍性に関わると考えられた。また P3N2 発現株は、P3F 発現株に比べて悪性度の低い表現型を示した。すなわち、P3N2 陽性症例は、P3F 陽性症例ほど不良な予後を呈さないことを示唆していると考えられた。

図1

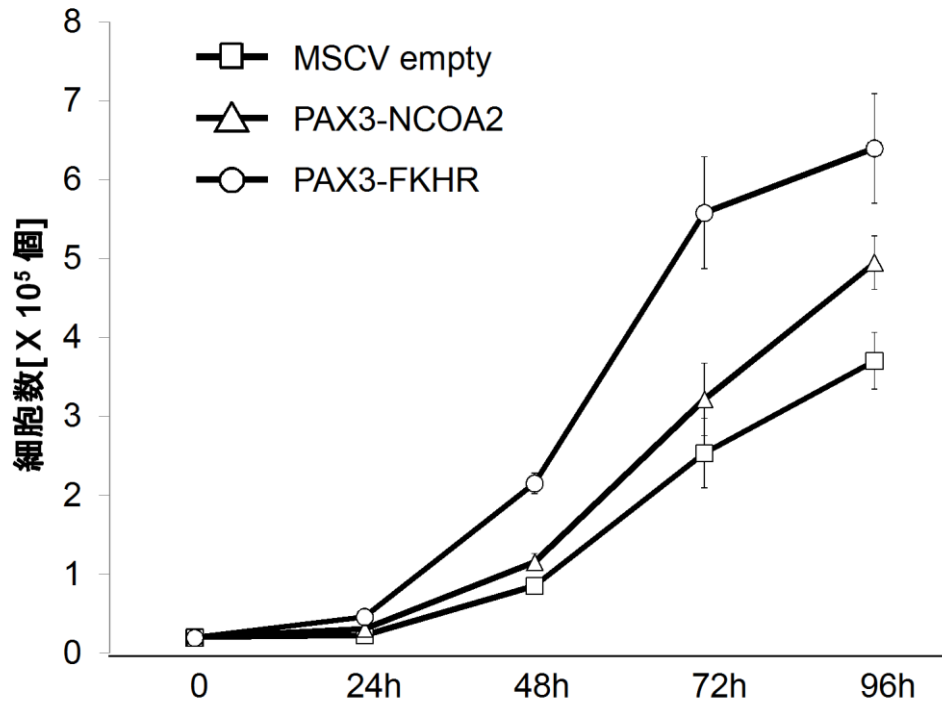
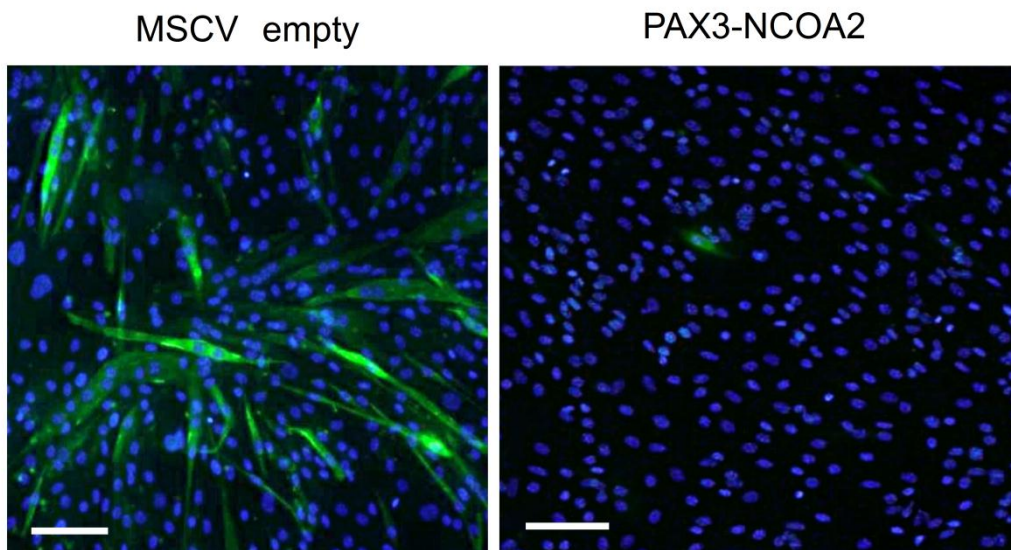


図2



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4件)

①Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential

diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Sep 10;400(1):89-93.

②Yagy S, Iehara T, Tsuchiya K, Hosoi H, et al. Preoperative analysis of 11q loss using circulating tumor-released DNA in serum: a novel diagnostic tool for therapy stratification of neuroblastoma. Cancer Lett. 2011 Oct 28;309(2):185-9.

③Katsumi Y, Iehara T, Tsuchiya K, Hosoi H, et al. Sensitivity of malignant rhabdoid tumor cell lines to PD 0332991 is inversely correlated with p16 expression. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Sep 16;413(1):62-8.

④Fujiki A, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Quantitative RT-PCR analysis of the MOZ-CBP fusion transcript in therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13). J Pediatr Hematol Oncol. 2012 Jul;34(5):402-5.

[学会発表] (計 3 件)

Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Dual role of *PAX3-NCOA2* in tumorigenesis of rhabdomyosarcoma. 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 2011. 4. 2-6; Orlando, U. S. A.

吉田秀樹, 宮地 充, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創. 新規融合遺伝子 PAX3-NCOA2 は横紋筋肉腫の造腫瘍性を促進し、分化を阻害する. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012 年 11 月 30 日~12 月 2 日; 横浜.

坂本謙一, 宮地 充, 大内一孝, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創. p90 ribosomal S6 kinase 1 は横紋筋肉腫における新規分子標的となり得る. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012 年 11 月 30 日~12 月 2 日; 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 邦彦 (TSUCHIYA KUNIHICO)
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児
発達医学・助教
研究者番号 : 90381938

(2) 研究分担者

細井 創 (HOSOI HAJIME)
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児
発達医学・教授
研究者番号 : 20238744

家原 知子 (IEHARA TOMOKO)
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児
発達医学・講師
研究者番号 : 20285266