

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592250

研究課題名(和文)肉腫発生におけるDNA二本鎖切断修復破綻と融合遺伝子生成

研究課題名(英文)DNA double strand break and fusion gene formation in tumorigenesis of sarcoma.

研究代表者

田仲 和宏 (Tanaka, Kazuhiro)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・客員研究員

研究者番号：10274458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ユーイング肉腫などの染色体転座を有するヒト悪性骨軟部腫瘍由来株培養細胞および手術等により得られたヒト組織標品を用いて、DNA二本鎖切断修復に関わる分子異常を検索した。その結果、染色体転座を有する肉腫細胞株においては、ほぼ同様にDNA二本鎖切断修復遺伝子の発現異常が認められることを見出した。また、DNA二本鎖切断修復因子のタンパク質レベルの発現状態、細胞内局在についてもプローチした。その結果、一部の因子の核内フォーカス形成が認められ、これらの因子の発現異常が単なる発現レベルの変化ではなく、実際のDNA二本鎖切断に応答したものであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using DNA microarray approaches, expression of the genes functioning in DNA double strand break (DSB) repair was explored in cell lines or tissue specimens derived from Ewing sarcomas and the other human soft tissue neoplasms with disease-specific chromosomal translocations. Expression of several DSB repair genes was similarly induced in these sarcoma cells. Furthermore, expression and subcellular localization of the DSB repair proteins were observed using immunocytochemistry, the results revealing an enhanced nuclear foci-formation in some DSB repair factors, which strongly suggest that the induction of the genes does reflect functional responses to DSBs occurred in cells.

研究分野：整形外科学

キーワード：肉腫 骨軟部腫瘍 染色体転座 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍の特徴として疾患特異的な染色体転座の存在が挙げられる。例えば t(11;22) はユーイング肉腫の約 90% に存在し、転座により生じた融合遺伝子産物 EWS-Flt1 が発がんに関与していると考えられている。疾患特異的な転座とその結果生じる融合遺伝子産物の意義は次第に明らかになってきており、染色体転座は悪性骨軟部腫瘍発生の重要な要因であると考えられる。また、染色体転座による発がんは造血器腫瘍でも広く認められており、腫瘍発生において大きな比重を占める極めて重要なメカニズムと考えられる。しかし、悪性骨軟部腫瘍発生の真の原因とも言うべき染色体転座が生じる分子機構は解明されていない。

染色体転座が生じるためには、まず DNA 二本鎖の切断が生ずる必要があり、染色体転座を有する悪性骨軟部腫瘍の発生においても DNA 二本鎖切断が重要な意義を持つものと考えられる。しかし、通常生体内には DNA 二本鎖切断が生じて、それを修復する機構が存在する。従って、染色体転座発生に先立ち、これらの DNA 二本鎖切断修復機構の異常が存在する可能性が示唆される。近年これらの DNA 二本鎖切断修復を司る分子群が次々に同定されてきた。しかし、悪性骨軟部腫瘍にみられる染色体転座の生成過程における DNA 二本鎖切断修復とその異常の意義については、全く解析されていなかった。我々は、本研究に先立つ研究により、ユーイング肉腫細胞株においては DNA 二本鎖切断修復因子の遺伝子発現に大きな異常がみられることを初めて見出した。これらの結果を踏まえ、本研究では、肉腫細胞における DNA 二本鎖切断修復を担う分子の構造および発現の異常の意義を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

上述のように、DNA 二本鎖切断修復を担う因子群の発現異常、ひいては、DNA 二本鎖切断修復経路の機能異常(経路間の不均衡もふくむ)が、肉腫発生の真の原因とも言える染色体転座に繋がっている可能性がある。本研究では、肉腫細胞における、DNA 二本鎖切断修復機構の分子の構造および発現の異常とその意義を解明することを目的とした。具体的には、染色体転座を有するヒト悪性骨軟部腫瘍由来株化培養細胞および手術等により得られたヒト組織標品を用いて、DNA 二本鎖切断修復に関わる分子異常を系統的に検索することとした。

3. 研究の方法

本研究においては、染色体転座を有するヒト悪性骨軟部腫瘍由来株化培養細胞および手術等により得られたヒト組織標品を用いて、DNA 二本鎖切断修復に関わる分子異常、DNA 二本鎖切断修復経路の機能異常を系統的に検索する。解析する DNA 二本鎖切断修復分子群は、

- A. 相同組換え経路 (Homologous Recombination, HR)
: MRE11, NBS1, RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, BRCA1, BRCA2
- B. 非相同末端結合経路 (Non Homologous End Joining, NHEJ)
: DNA-PKcs, Ku70, Ku80

の 2 グループ計 11 分子が中心となる。

これらの各分子について、以下のような系統的解析をおこなう。

- I. 発現解析
 - i) mRNA レベルの解析
 - ii) タンパク質レベルの解析
- II. 構造解析
- III. 機能解析
 - i) 分子局在の解析
 - ii) 細胞形質の解析
 - iii) 修復活性の解析

得られた結果から、DNA 二本鎖切断修復の 2 つの経路の機能状態と相互のバランスについて考察を加えることとした。

4. 研究成果

初年度の H24 年度とは H25 年度は、mRNA レベルの発現解析をマイクロアレイを用いて多角的におこなった。その結果、当初 DNA 二本鎖切断修復因子の遺伝子発現異常をみとめたユーイング肉腫細胞株に加え、染色体転座を有する他の肉腫細胞株においても、ほぼ同様な DNA 二本鎖切断修復遺伝子の発現異常が認められることを見出した。

また、DNA 二本鎖切断修復因子のタンパク質レベルの発現状態、細胞内局在についてもプローチした。その結果、一部の因子の核内フォーカス形成が認められ、これらの因子の発現異常が単なる発現レベルの変化ではなく、実際の

DNA二本鎖切断に反応したものであることが示唆された。

最終年度の H26 年度は、これまで肉腫細胞を用いて得られた mRNA レベルの発現解析結果を他の遺伝学的背景をもつ腫瘍細胞と比較した。疾患特異的な転座をもたない大腸癌、乳癌、肺癌等に由来する細胞株群ではそのような発現異常を認めないことを確認した。しかしながら、一部の大腸癌由来細胞株において、DNA 二本鎖切断修復因子発現の異常がみられることを見出した。このカテゴリーを特徴づける分子異常として DNA ミスマッチ修系の異常に着目した。現在、DNA ミスマッチ修復異常を特徴づけるマイクロサテライト配列の不安定化がユーイング肉腫細胞で観察されるか、手術等により得られたヒト組織標品を用いて解析をおこなっている。また、*in vitro* でみとめられた DNA 二本鎖切断修復因子の核内フォーカス形成が、さまざまな電離放射線照射によりどのように修飾されるか、分子異常の機能的側面についてもアプローチしている。

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 7 件)

1. Iwamoto Y and Tanaka K: The activity of the Bone and Soft Tissue Tumor Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. *Jpn J Clin Oncol* 42: 467-470,2013, DOI:10.1093/jjco/hys059
2. Kataoka K, Tanaka K, Mizusawa J, et al. A randomized phase II/III trial of perioperative chemotherapy with adriamycin plus ifosfamide vs gemcitabine plus docetaxel for high-grade soft tissue sarcoma: Japan Clinical Oncology Group study JCOG1306. *Jpn J Clin Oncol*, 44:765-769, 2014.
3. Tanaka K, Mizusawa J, Fukuda H, et al. Perioperative chemotherapy with high-dose ifosfamide and doxorubicin for high-grade soft tissue sarcomas in

the extremities: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0304. *Jpn J Clin Oncol*, 45:555-561, 2015.

4. Iwasaki T, Tanaka K, Kawano M, et al. Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells. *Int J Oncol*, 46:1543-1550, 2015.
5. 田仲和宏: 軟部腫瘍の化学療法. 関節外科 32: 870-877, 2013
6. 田仲和宏: 整形外科における臨床試験のデザインのあり方. 臨床整形外科 49: 1017-1024, 2013
7. Wakasa K, Kawabata R, Nakao S, Hattori H, Taguchi K, Uchida J, Yamanaka T, Maehara Y, Fukushima M, Oda S: Dynamic Modulation of Thymidylate Synthase Gene Expression and Fluorouracil Sensitivity in Human Colorectal Cancer Cells. *PLOS ONE* 10(4) 2015 e0123076, DOI:10.1371/journal.pone.0123076

[学会発表](計 11 件)

1. Tanaka K, Hasegawa T, Mizusawa J, et al. Prognostic factors for high-grade soft tissue sarcomas (STS) in the extremities treated by perioperative chemotherapy with ifosfamide (IFO) and adriamycin (ADM). 2014 Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. May 30-June 3, 2014, Chicago, USA
2. Tanaka K. Multicenter clinical trials for sarcomas in Bone and Soft Tissue Tumor Study Group (BSTTSG) of Japan Clinical Oncology Group (JCOG): Difficulties and future direction. The 1st International Symposium on Recent Global Advances in Cancer Research. February 12-13, 2015, Tokyo, Japan

3. Tanaka K, Kataoka K, Mizusawa J, et al. A randomized phase II/III study, comparing pre- and postoperative chemotherapy Adriamycin+Ifosfamide (AI) versus Gemcitabine+Docetaxel (GD) for operable high grade soft tissue sarcomas (STS) in extremity or trunk : JCOG1306 study. 2015 Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. May 29-June 2, 2015, Chicago, USA
4. 田仲和宏: Ewing 肉腫細胞における DNA 二本鎖切断修復因子の発現異常. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 09 月 19 日 札幌
5. 田仲和宏: 骨軟部腫瘍の最新の治療戦略. 大分県整形外科医会 2012 年 10 月 13 日 大分
6. 田仲和宏, 他: JCOG 骨軟部腫瘍グループの歩み. 第 50 回日本癌治療学会学術集会 2012 年 10 月 25-27 日 横浜
7. 田仲和宏, 他: 悪性骨軟部腫瘍に対する GEM+DOC 療法 第 86 回日本整形外科学会学術総会 2013 年 5 月 23-26 日 広島
8. 田仲和宏, 他: JCOG 主導での骨・軟部腫瘍治療薬の開発. 第 51 回日本癌治療学会学術集会 2013 年 10 月 24-26 日 京都
9. 田仲和宏, 他: 高悪性度軟部肉腫に対する補助化学療法の臨床試験 (JCOG0304) における予後因子解析. 第 52 回日本癌治療学会学術集会 2014 年 8 月 28-30 日 横浜
10. 織田信弥: マイクロサテライト不安定性をもたらす DNA ポリメラーゼ校正機能異常. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3 日 横浜
11. 織田信弥: ヒト子宮体癌にみられるマイクロサテライト不安定性の異なる 2 つのモード. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 27 日 横浜

〔図書〕(計 2 件)

1. 田仲和宏: 軟部肉腫の化学療法. 軟部腫瘍診療ガイドライン 2012, 日本整形外科学

会監修、日本整形外科学会ガイドライン委員会・軟部腫瘍診療ガイドライン策定委員会編、南江堂、pp85-93、2012

2. 田仲和宏: 軟部肉腫(非円形細胞肉腫). 肉腫化学療法マスターコース、川井章編、南山堂、pp35-44、2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 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

田仲 和宏 (TANAKA KAZUHIRO)
 研究者番号：10274458

(2) 研究分担者

織田 信弥 (ODA SHINYA)
 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究センター・腫瘍遺伝学研究室長
 研究者番号：40333372