

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791078

研究課題名(和文) 胞巣型横紋筋肉腫に対する新規分子標的 RPS6KA1 の機能解析と治療応用

研究課題名(英文) Identification of RPS6KA1 as novel molecular target of rhabdomyosarcoma

研究代表者

宮地 充 (MIYACHI, MITSURU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40584983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000 円、(間接経費) 630,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウス筋芽細胞において横紋筋肉腫特異的融合遺伝子安定発現による遺伝子発現変化を発現アレイにて比較し、横紋筋肉腫の造腫瘍性に関与する候補遺伝子として、Rps6ka1を抽出した。横紋筋肉腫瘍検体の検討では、正常骨格筋に比べてRSK1の高発現を認めた。RSK1阻害剤であるBI-D1870は、横紋筋肉腫細胞株において増殖を抑制し、G2/M期細胞周期停止を惹起した。また、BI-D1870処理により、分化のマーカーであるMyosin Heavy Chainの発現が増加し、分化の誘導を認めた。RSK1は横紋筋肉腫に対する新規分子標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We compared the expression pattern of mouse myoblasts which express rhabdomyosarcoma-specific fusion gene and identified the candidate gene as Rps6ka1. We examined rhabdomyosarcoma tumor specimens and found that RPS6KA1 is overexpressed compared with normal human skeletal muscle. RPS6KA1 inhibitor, BI-D1870, inhibited the proliferation of rhabdomyosarcoma cells and G2/M cell cycle arrest was observed. BI-D1870 treatment induced Myosin Heavy Chain expression and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. RPS6KA1 may be a novel therapeutic target of rhabdomyosarcoma.

研究分野：医歯薬学

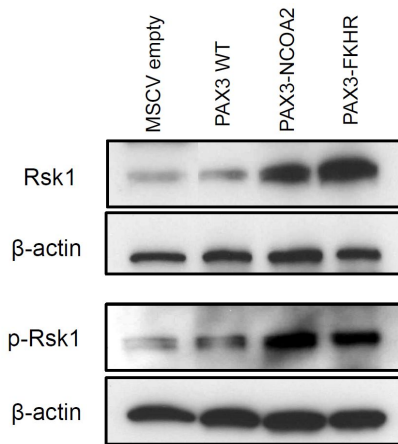
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学・小児腫瘍学

キーワード：RPS6KA1 横紋筋肉腫 分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫は小児で最も頻度の高い悪性軟部腫瘍で、二大亜型の一つである胞巣型では70%に *PAX3-FKHR* 融合遺伝子が同定され、腫瘍化に寄与している。我々は、*PAX3-FKHR* と新規融合遺伝子 *PAX3-NCOA2* の安定発現マウス筋芽細胞株を作成し、共通して発現の上昇している遺伝子として *Rps6ka1(Rsk1)* を同定した(図1)。本遺伝子は *RAS-MEK-ERK* 経路の下流に位置し、増殖能や移動能を促進し、アポトーシスを阻害するキナーゼであり、既に阻害剤が開発されている。

図1. *Rps6ka1* は横紋筋肉腫特異的融合遺伝子発現マウス筋芽細胞において、高発現する。



2. 研究の目的

本研究では依然として予後不良な *PAX3-FKHR* 陽性横紋筋肉腫における *RPS6KA1* の機能解析と *RPS6KA* 阻害剤の新規分子標的療法薬としての使用の妥当性の評価を目的とする。

3. 研究の方法

横紋筋肉腫臨床検体の *RPS6KA1* 発現の評価
横紋筋肉腫臨床検体より mRNA を抽出して、cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR 法により発現の評価を行った。発現の比較は、*GAPDH* を用いた Ct 法により行った。

RPS6KA 阻害剤による増殖、分化への影響の検討

横紋筋肉腫細胞株については、*PAX3-FKHR* 融合遺伝子陽性横紋筋肉腫細胞株として、Rh30、Rh41 を用い、融合遺伝子陰性横紋筋肉腫細胞株として、RD を用いた。

RPS6KA 阻害剤として、BI-D1870 を用いた。阻害剤処理後に、10%牛胎児血清添加 DMEM 培地により培養を行い、経時的に細胞数の計測を行った

細胞周期の解析として、阻害剤処理後に10%牛胎児血清添加 DMEM 培地で培養を行い、24 時間後の細胞を用いて、Propidium Iodide 染色を行い、フローサイトメトリーにより解析した。

また、阻害剤処理後に 2%馬血清添加 DMEM 培地により分化誘導を行い、形態的变化、Myosin Heavy Chain の発現を検討した。

4. 研究成果

横紋筋肉腫臨床検体の *RPS6KA1* 発現の評価
横紋筋肉腫臨床検体での *RPS6KA1* の発現は正常骨格筋と比較して高発現を呈した(図2)。融合遺伝子陽性横紋筋肉腫細胞株においてのみ、高発現が予想されたが、陽性細胞株と陰性細胞株ともに高発現であり、発現の違いは検出されなかった。融合遺伝子の陽性、陰性にかかわらず、*RPS6KA1* は横紋筋肉腫の治療標的となる可能性が示唆された。

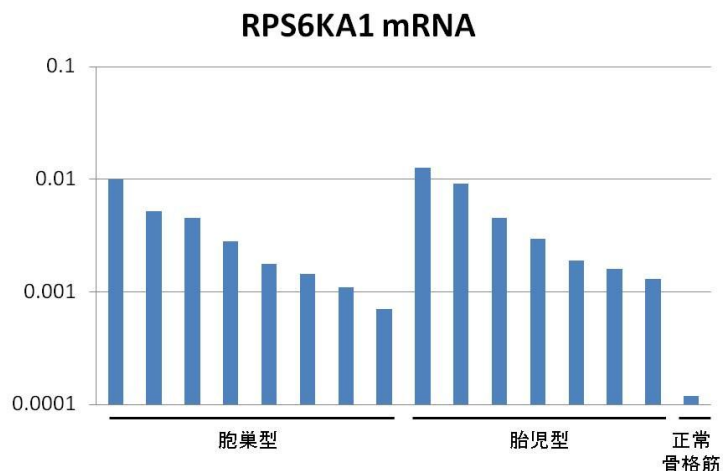
RPS6KA 阻害剤による増殖、分化への影響の検討

横紋筋肉腫臨床検体における *RPS6KA1* 高発現が明らかになったため、次に横紋筋肉腫細胞株における *RPS6KA* 阻害剤である BI-D1870 による増殖への影響を検討した。

Rh30 細胞株の増殖曲線を図3に示す。BI-D1870 の濃度が高いほど、増殖抑制が顕著となることを明らかにした。*RPS6KA1* の発現は、Rh41、Rh30、RD の順に高発現であり、増殖抑制の程度も Rh41、Rh30、RD の順に強かった。

また、BI-D1870 の IC_{50} (50%阻害濃度)は、Rh41、Rh30(図4)、RD 細胞株において、それぞれ、1.3 μ M、2.3 μ M、3.1 μ M で増殖を抑制した。 IC_{50} についても、*RPS6KA1* の発現と *RPS6KA* 阻害剤の効果は、発現と比例した結果

図2. *RPS6KA1* は横紋筋肉腫臨床検体において高発現を示す。



が得られた。

RPS6KA1 高発現細胞株においては、RPS6KA1 発現に依存して、増殖すると考えられた。

横紋筋肉腫細胞株において、RPS6KA 阻害剤により、増殖抑制を認めることを明らかにしたため、細胞周期の変化について検討を加えた。

Rh30 細胞株において、G2/M 期での細胞周期停止を認めた(図 5)。他の細胞株において

も同様の結果が得られた。

また、Rh30,Rh41 細胞株では、BI-D1870 処理により、筋分化に伴い発現を認める Myosin Heavy Chain の発現増加を認め、分化の誘導が見られた(図 6)。

BI-D1870 は横紋筋肉腫細胞株において、増殖抑制と分化促進を通して抗腫瘍効果を呈することが示唆された。

BI-D1870 については、Polo-like kinase の阻害作用も有しているため、結果の解釈に

Cell count
($\times 10^5/\text{ml}$)₄

図 3. BI-D1870 は Rh30 細胞株の増殖を濃度依存性に抑制する。

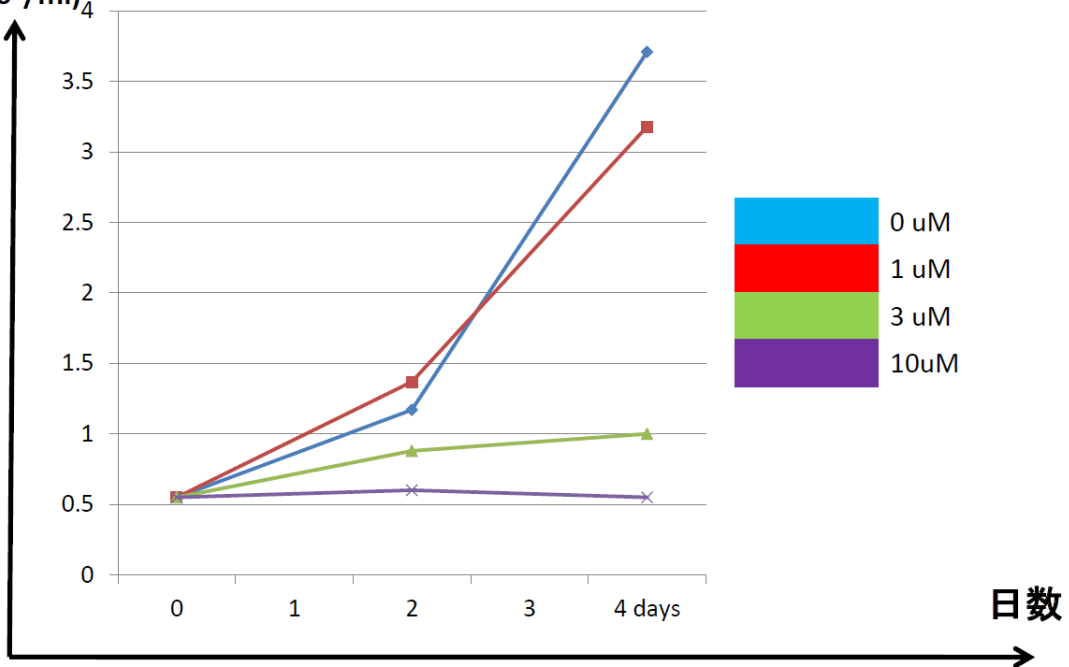


図 4. BI-D1870 は Rh30 細胞株の増殖を IC₅₀2.3 μM で抑制する。

Cell viability

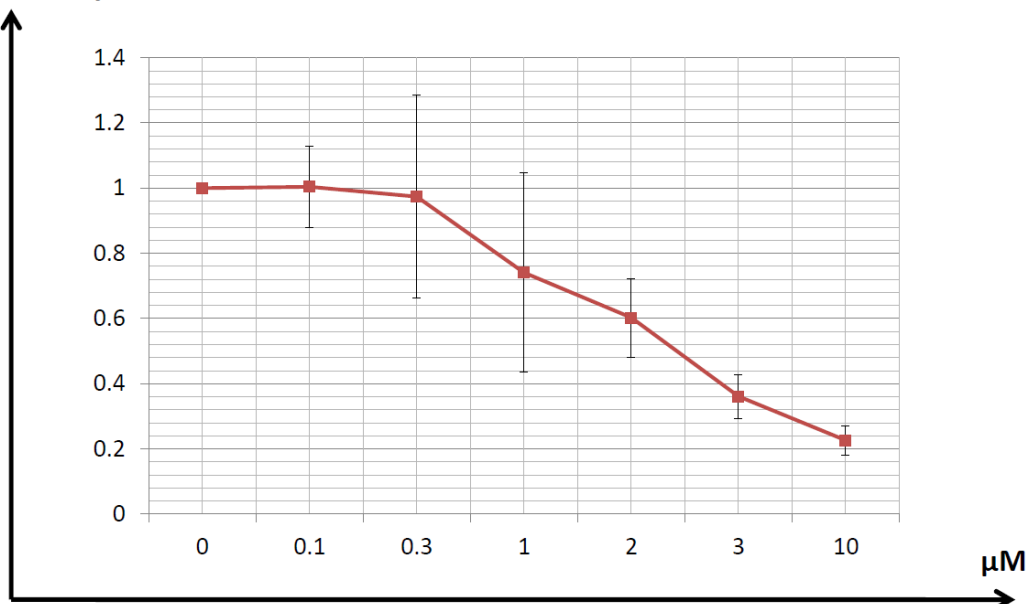


図 5. BI-D1870 は横紋筋肉腫細胞株に G2/M 期停止をきたす。

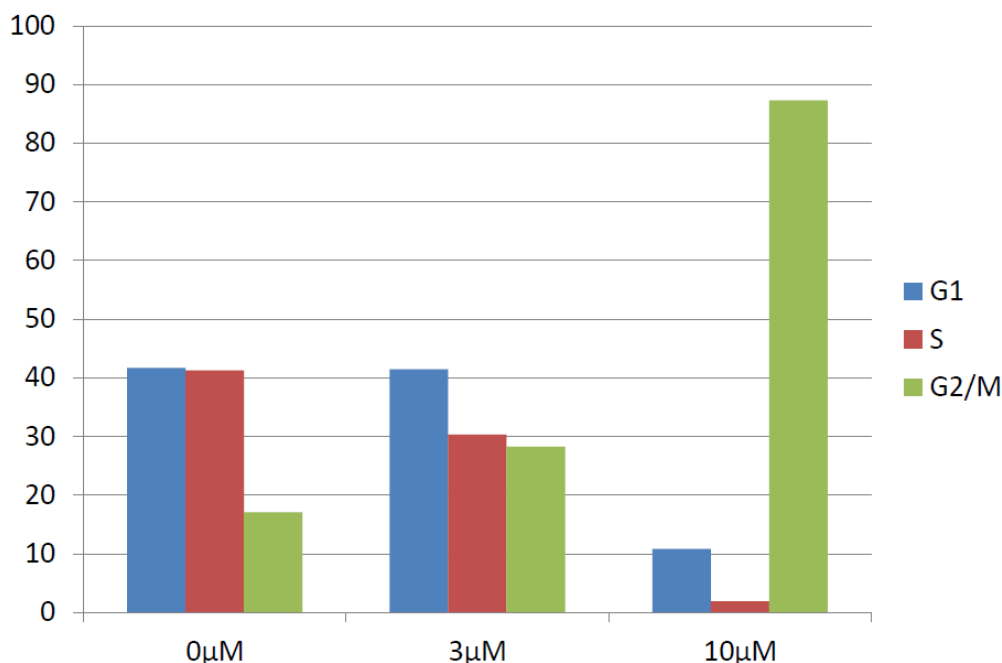
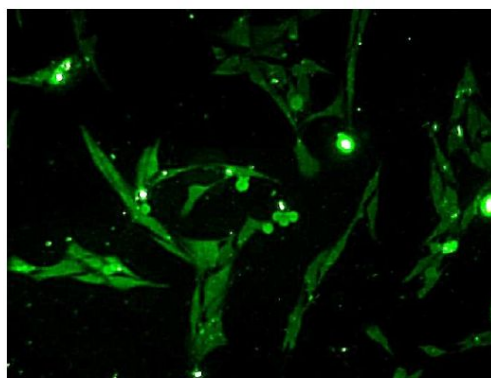
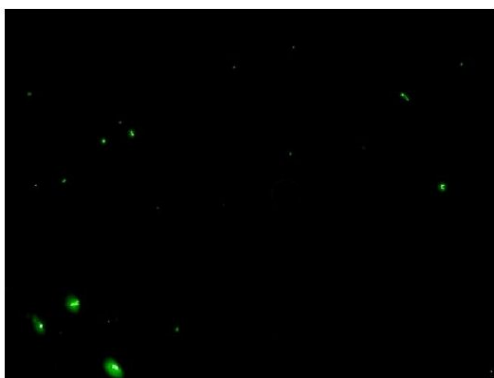


図 6. BI-D1870 は横紋筋肉腫細胞株の分化を誘導する。

DMSO

BI-D1870 (2μM)



においては、RPS6KA 以外の off-target 効果について注意が必要である。

RPS6KA1 は、RAS-ERK 経路の effector として機能し、横紋筋肉腫において、増殖や分化阻害に關与する可能性が示唆された。

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 1 件)

Yoshida H, Miyachi M, et al. PAX3-NCOA2 fusion gene has a dual role in promoting the proliferation and inhibiting the myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *Oncogene*. 2013 Nov 11. doi: 10.1038/onc.2013.491. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 1 件)

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

宮地 充 (MIYACHI MITSURU)

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: 40584983