

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460480

研究課題名(和文)キメラがんタンパク TLS-CHOP による多段階がん機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Research on mechanisms of multistep tumorigenesis 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：粘液型脂肪肉腫特異的に見られる TLS-CHOP は、染色体転座に起因するキメラがん遺伝子である。この遺伝子産物は転写因子として機能し、粘液型脂肪肉腫の腫瘍発生や腫瘍増殖に関わると考えられているが、その分子メカニズムの詳細はまだ分かっていない。これまでの研究により、TLS-CHOP が、形質転換活性を持つ DOL54 の発現誘導や抗腫瘍活性を持つ IL-24 の発現抑制をすることなどが分かってきたが、本研究により、DOL54 の高発現が IL-24 の発現を抑制することにより腫瘍増殖を維持していることが判明した。さらに、新規に粘液型脂肪肉腫増殖に関わる分子群を同定しており、それらの分子機能を解析中である。

研究成果の概要(英文)：The TLS-CHOP gene specifically seen in myxoid liposarcoma is a chimeric oncogene that is derived from chromosomal translocation. The gene product functions as a transcription factor, and is thought to be involved in tumorigenesis and tumor cell growth. Its detailed molecular mechanism is, however, still unclear. Previous studies have shown that TLS-CHOP induces expression of a transforming-related protein DOL54 and represses expression of an anti-tumor cytokine IL-24. In this study, we have revealed that overexpression of DOL54 represses IL-24 expression, contributing to maintenance of tumor cell growth. Furthermore, we have identified several molecules related to growth of myxoid liposarcoma cells, and are investigating their molecular functions now at present.

研究分野：医歯薬学

キーワード：キメラ遺伝子 粘液型脂肪肉腫

1. 研究開始当初の背景

染色体転座に起因する *TLS-CHOP* キメラ遺伝子は、粘液型脂肪肉腫特異的に生じ、その遺伝子産物は腫瘍特異的な転写因子として腫瘍の発生や増殖などに重要な役割を担っていると考えられている。*TLS-CHOP* に発現誘導を受ける分子として、形質転換活性を有する downstream of liposarcoma 54 (*DOL54*) が同定されているが、*TLS-CHOP* によるがん化機構の詳細は未だ不明である。

我々はこれまで、*TLS* 遺伝子が存在する 16 番染色体と *CHOP* 遺伝子が存在する 12 番染色体の核内配置(染色体テリトリー)が脂肪分化の際に近接し、これらの染色体間で転座が起こりやすくなることを明らかにした後 (J. Cell Sci. 117: 5897-5903, 2004)、*TLS-CHOP* 特異的なモノクローナル抗体を作成し (Am. J. Surg. Pathol. 30: 351-356, 2006)、*TLS-CHOP* が抗腫瘍性サイトカイン interleukin-24 (*IL-24*)、別名 melanoma differentiation-associated gene 7 (*MDA-7*)、の発現を抑制することや (Br. J. Cancer 106: 1976-1979, 2012)、*miR-486* の発現抑制を介して腫瘍増殖・転移促進因子の plasminogen activator inhibitor 1 (*PAI-1*) の発現誘導を起こすこと (Biochem. Biophys. Res. Commun. 427: 355-360, 2012) など明らかにしてきた。従って、*TLS-CHOP* に誘導される事象として、まず、形質転換活性を持つ *DOL54* が働き、がん抑制遺伝子 *IL-24* が発現抑制され、さらに、腫瘍増殖・転移を促進する *PAI-1* の発現誘導が起こるという多段階発がん機構が想定されるが、この発がん機構における分子パスウェイの詳細は未だ不明であった。

2. 研究の目的

(1) 形質転換活性を持つ *DOL54* の発現誘導を介した腫瘍化促進メカニズムの解明

粘液型脂肪肉腫の発生において *DOL54* が重要な役割を担っていることは既に示唆されているが、腫瘍発生における具体的な *DOL54* の分子機能や、*TLS-CHOP* による発現誘導機構などは未解明であり、その解明を目指す。

(2) がん抑制遺伝子 *IL-24* の発現抑制を制御する分子パスウェイの解明

予備的な実験から、*TLS-CHOP* による *IL-24* 発現制御の分子パスウェイに介在する可能性がある分子群の候補が挙がってきている。本研究では、その候補分子群について、*TLS-CHOP* や *DOL54* との実際の関係性を検証する。

(3) *DOL54*、*IL-24*、及び *PAI-1* の各発現制御パスウェイに跨がる分子間相互作用の検討

以前の研究からは、*TLS-CHOP* の下流で腫瘍に関連する機能を持つ分子として *DOL54*、*IL-24*、*PAI-1* などがそれぞれ独立に同定されてきたが、実際には、これらの分子の機能発現や発現制御パスウェイにおいて相互作用が存在する可能性も考えられる。それを検証する。

(4) 関連分子群のノックダウンや過剰発現による腫瘍抑制効果の検討

上記の既知、及び新規同定される分子群や、その他の粘液型脂肪肉腫との関連が見込まれる分子群について、治療の標的や診断のマーカーとして利用できる可能性を持った分子を検索する。

3. 研究の方法

(1) *DOL54* の発現誘導を介した腫瘍化促進メカニズムの解明

予備的な研究により、*DOL54* の発現誘導に microRNA を含む複数の分子群が介在する新規分子パスウェイの存在が示唆されたため、本研究では、その分子群について、合成 microRNA や siRNA など培養細胞に導入した際の下流候補分子の発現解析をすることで検討した。また、*DOL54* には数種のバリエーションが存在が知られていることから、RT-PCR による PCR 産物の大きさの違いを指標に、各バリエーションの粘液型脂肪肉腫細胞における発現状況を検討することを試みた。一方、予備実験により、*DOL54* をノックダウンすると粘液型脂肪肉腫細胞の増殖が抑制されることが示唆されたため、*DOL54* は腫瘍化活性に加え、腫瘍細胞の増殖・維持にも重要な役割を果たしていると考えられる。粘液型脂肪肉腫は脂肪分化の異常な状態であると考えられているが、*DOL54* は、正常の脂肪分化過程で一過性に高発現するため、脂肪分化において重要な役割を担う可能性が示唆されている。従って、*DOL54* の腫瘍化活性は、脂肪分化の際の *DOL54* の発現制御不全に起因する可能性も考えられる。本研究ではそれらの可能性を考慮しながら、*DOL54* の発現と細胞状態との関連を解析し、*DOL54* の腫瘍化及び腫瘍細胞の維持における機能を探った。

(2) がん抑制遺伝子 *IL-24* の発現抑制を制御する分子パスウェイの解明

予備的な実験から、*TLS-CHOP* に発現誘導を受けて *IL-24* の発現を抑制する可能性がある microRNA の候補が絞り込まれてきたため、その機能を阻害する anti-miR を培養細胞に導入してみることで、目的の microRNA の確定を目指した。

(3) *DOL54*、*IL-24*、及び *PAI-1* の各発現制御パスウェイに跨がる分子間相互作用の検討

TLS-CHOP の下流分子として同定された *DOL54*、*IL-24*、*PAI-1* の3つの発現制御パスウェイ間の分子間相互作用の有無を、関連分子のノックダウンの際の発現変動の検出などにより検討した。

(4) 関連分子群のノックダウンや過剰発現による腫瘍抑制効果の検討

以前の研究により、*TLS-CHOP* や *DOL54* の siRNA、及び *miR-486* の導入により粘液型脂肪肉腫細

胞の増殖が抑制されることが判明しているが、上記項目(1)、(2)により新規に判明する TLS-CHOPの下流分子群の中にも、それらを標的とする腫瘍抑制効果があるものが存在する可能性が高いため、それらのノックダウンや機能阻害による腫瘍細胞への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) DOL54 の発現誘導を介した腫瘍化促進メカニズムの解明

TLS-CHOPによるDOL54発現誘導パスウェイに介在する可能性のある分子群については、まだ、それらが実際にDOL54発現誘導に関与していることを示す確定的な結果は得られておらず、現在も引き続き検討中である。また、粘液型脂肪肉腫で発現しているDOL54のバリエーションをRT-PCRを用いて同定する試みに関しては、おそらくDOL54の特徴的な繰り返し配列に起因するものと思われるが、適切なPCR産物が得られず、こちらも引き続き、PCRプライマーの配列やPCR条件などを様々に変えながら検討中である。一方、DOL54の機能を考える上で、DOL54をノックダウンすると粘液型脂肪肉腫細胞の増殖が阻害されることが確認された。また、その際、IL-24の発現が大幅に増加していることが判明した。さらに、粘液型脂肪肉腫細胞においてDOL54とIL-24をダブルノックダウンすると、DOL54単独のノックダウンの際の増殖抑制効果が解消された。従って、がん抑制遺伝子IL-24の発現をDOL54が抑制していることが分かった(投稿準備中)。

(2) がん抑制遺伝子IL-24の発現抑制を制御する分子パスウェイの解明

TLS-CHOP発現細胞と発現していない細胞間で比較したmicroRNAマイクロアレイの結果や、real time PCRによる検証、及び、コンピューターによる標的予測などから、いくつかのmiRNA群がTLS-CHOPに発現誘導され、その標的分子としてIL-24の発現が抑制されるというメカニズムが想定された。しかし、粘液型脂肪肉腫細胞にそれらの予測されたmicroRNA群の機能を阻害するanti-miRを導入しても細胞増殖の抑制が見られなかったため、それらのanti-miRによってはIL-24の発現抑制が解除されないことが示唆された。想定したmicroRNA以外にIL-24を標的とするmicroRNAが存在し、それも併せて阻害しないとIL-24の発現が上昇してこないという可能性もあるが、いずれにしても、TLS-CHOPによるIL-24発現抑制に介在するmicroRNAの確定はまだ出来ていない。一方、上記項目(1)で記述したように、IL-24の発現抑制にDOL54の発現が関与することが明らかとなった。

(3) DOL54、IL-24、及びPAI-1の各発現制御パスウェイに跨る分子間相互作用の検討

上述のように、DOL54とIL-24の発現制御については同一の分子パスウェイで行なわれていることが明らかとなったが、さらに、DOL54やPAI-1をノックダウンした際の互いの発現量の変化や、PAI-1とIL-24をダブルノックダウンした際の細胞状態を観察することで、これらの分子の発現制御パスウェイ間の相互作用の有無を検討した。その結果、現在までにDOL54とPAI-1、及びPAI-1とIL-24の間の相互作用は確定できていないが、それを示唆するデータは得られているため、引き続き検討を続けている。

(4) 関連分子群のノックダウンや過剰発現による腫瘍抑制効果の検討

上述の分子群の他にも、cDNAマイクロアレイ、microRNAマイクロアレイなどの結果などから、粘液型脂肪肉腫の腫瘍発生や腫瘍細胞増殖に関連する可能性のある分子群のリストが得られたが、その中から、miR-499-5p、SOX11 siRNA、またはSnail siRNAを粘液型脂肪肉腫細胞に導入すると増殖が抑制されることが判明した。これらの分子の粘液型脂肪肉腫における機能は未だ不明であるが、それぞれの分子は世界的に他の腫瘍との関連でも研究が行なわれており、その解明は重要である。現在精力的に解析を続けている。

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 3件)

Yujing Sun, Masako Nakanishi, Fuyuki Sato, Kosuke Oikawa, Gengyin Zhou, Yasuteru Muragaki. Trps1 deficiency inhibits the morphogenesis of secondary hair follicles via decreased Noggin expression. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有り 2015, 456: 721-726. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.039.

Aiko Shimokado, Yujing Sun, Masako Nakanishi, Fuyuki Sato, Kosuke Oikawa, Takashi Akasaka, Yasuteru Muragaki. Smad3 plays an inhibitory role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. Exp. Mol. Pathol., 査読有り 2014, 97: 458-464. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.10.005.

Yujing Sun, Gengyin Zhou, Ting Gui, Aiko Shimokado, Masako Nakanishi, Kosuke Oikawa, Fuyuki Sato, Yasuteru Muragaki. Elevated serum 1,25(OH)₂-vitamin D₃ level attenuates renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in kl/kl mice. Sci. Rep., 査読有り 2014, 4: 6563. doi: 10.1038/srep06563.

[学会発表](計 17件)

尾崎 敬, 田伏克惇, 渡邊雄也, 南條佐輝子, 張 穎哲, 中西雅子, 佐藤冬樹, 及川恒輔, 覚道健一, 村垣泰光. 甲状腺癌細胞株に対するマイクロ波効果-誘導された未知なる細胞の検討-. 第 43 回和歌山悪性腫瘍研究会. 2015 年 12 月 19 日 日本赤十字和歌山医療センター(和歌山県和歌山市)

及川恒輔, 田中正視, 尾崎 敬, 黒田雅彦, 村垣泰光. 粘液型脂肪肉腫特異的キメラ遺伝子 TLS-CHOP に制御される新規分子メカニズムの検討. 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 1 日~2015 年 12 月 4 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Kosuke Oikawa, Masakatsu Takahashi, Fuyuki Sato, Masahiko Kuroda, Yasuteru Muragaki. Identification of novel molecular pathways required for the growth of TLS-CHOP-expressing myxoid liposarcoma cells. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月 8 日~2015 年 10 月 10 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Fuyuki Sato, Ujjal Bhawal, Kosuke Oikawa, Yasuteru Muragaki. BHLH transcription factor DEC2 negatively regulates TWIST1 and VEGF under hypoxia. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月 8 日~2015 年 10 月 10 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

及川恒輔, 田中正視, 高梨正勝, 尾崎 敬, 黒田雅彦, 村垣泰光. 粘液型脂肪肉腫特異的キメラがんタンパク TLS-CHOP の下流分子の検討. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日~2014 年 11 月 27 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Kosuke Oikawa, Masakatsu Takahashi, Masako Nakanishi, Fuyuki Sato, Masahiko Kuroda, Yasuteru Muragaki. Analysis of a novel molecular pathway induced by TLS-CHOP for myxoid liposarcoma tumorigenesis and tumor progression. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日~2014 年 9 月 27 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Fuyuki Sato, Kosuke Oikawa, Yasuteru Muragaki, Yanping Zhang. MAGED2 plays important roles in tumor cell survival. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日~2014 年 9 月 27 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

尾崎 敬, 田伏克惇, 渡邊雄也, 孫 玉静, 下角あい子, 中西雅子, 佐藤冬樹, 及川恒輔, 覚道健一, 村垣泰光. 甲状腺未分化癌細胞株に対する非熱的マイクロ波効果の検討. 第 33 回 Microwave Surgery 研

究会. 2014 年 9 月 11 日~2014 年 9 月 12 日 たかつき京都ホテル(大阪府高槻市) 及川恒輔, 丹羽麻也子, 水崎杏奈, 孫 玉静, 中西雅子, 佐藤冬樹, 尾崎 敬, 村垣泰光. 子宮頸癌関連タンパク WAPL によるエピジェネティック制御への関与. 第 82 回和歌山医学会総会. 2014 年 7 月 6 日 和歌山県立医科大学(和歌山県和歌山市) 佐藤冬樹, 中西雅子, 及川恒輔, 村垣泰光. BHLH 型転写因子 DEC1 の膵癌における EMT 機能. 第 82 回和歌山医学会総会. 2014 年 7 月 6 日 和歌山県立医科大学(和歌山県和歌山市)

及川恒輔, 伊藤俊治, 田中正視, 高梨正勝, 孫 玉静, 尾崎 敬, 黒田雅彦, 村垣泰光. 粘液型脂肪肉腫特異的キメラがんタンパク TLS-CHOP による多段階発がん機構の検討. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3 日~2013 年 12 月 6 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Kosuke Oikawa, Masakatsu Takahashi, Masahiko Kuroda, Yasuteru Muragaki. Novel molecular pathways in TLS-CHOP-dependent mechanism for myxoid liposarcoma tumorigenesis and tumor progression. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

尾崎 敬, 田伏克惇, 孫 玉静, 下角あい子, 伊藤俊治, 及川恒輔, 覚道健一, 村垣泰光. マイクロ波効果-基礎的研究-甲状腺癌細胞株に対する非熱的マイクロ波効果の検討. 第 32 回 Microwave Surgery 研究会. 2013 年 9 月 13 日~2013 年 9 月 14 日 アルカディア市ヶ谷(東京都千代田区)

及川恒輔, 伊藤俊治, 孫 玉静, 下角あい子, 尾崎 敬, 村垣泰光. 粘液型脂肪肉腫特異的キメラがんタンパク TLS-CHOP による発がんメカニズム. 第 81 回和歌山医学会総会. 2013 年 7 月 7 日 和歌山県立医科大学(和歌山県和歌山市)

尾崎 敬, Sun Yujing, 下角あい子, 伊藤俊治, 及川恒輔, 村垣泰光, 田伏克惇, 覚道健一. 甲状腺癌細胞株に対する非熱的マイクロ波効果の検討. 第 81 回和歌山医学会総会. 2013 年 7 月 7 日 和歌山県立医科大学(和歌山県和歌山市)

尾崎 敬, 覚道健一, Gui Ting, Sun Yujing, 下角あい子, 伊藤俊治, 及川恒輔, 田伏克惇, 村垣泰光. 甲状腺癌細胞株に対する非熱的マイクロ波効果の検討. 第 102 回日本病理学会総会. 2013 年 6 月 6 日~2013 年 6 月 8 日 ロイトン札幌, さっぽろ芸文館(北海道札幌市)

尾崎 敬, 覚道健一, 伊藤俊治, 及川恒輔, 村垣泰光, 木村芝生子. 甲状腺は再生する臓器か?-マウス動物実験から検討-. 第 86 回日本内分泌学会学術総会. 2013 年 4 月 25 日~2013 年 4 月 27 日 仙台国際セ

ンター(宮城県仙台市)

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