

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290040

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた骨肉腫発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of Osteosarcomagenesis using Genetically-Modified Mouse Models

研究代表者

伊藤 公成 (ITO, Kosei)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：00332726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫は代表的なヒト希少がんで、極めて解析が遅れている間葉系細胞由来の悪性腫瘍である。がん抑制遺伝子p53の不活性化が引き金になることが知られていて、骨芽細胞特異的p53遺伝子欠損マウス(p53f/f-Sp7Cre)は、ヒト骨肉腫の動物モデルとして広く利用されている。このマウスモデルおよびヒト骨肉腫臨床検体を用いた解析から、p53の不活性化に始まる骨肉腫の発症過程において発現が亢進するRUNX3/Runx3が、代表的ながん遺伝子の発現を異常に誘導させていることが判明した。RUNX3が「がん遺伝子」として関与する骨肉腫発症・進展の新規分子メカニズムの存在が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Inactivation of p53 is frequently reported in sporadic osteosarcoma (OS) in human. In mouse, an osteoblast-specific p53-knockout line (p53f/f-Sp7/0sxCre) has the high incidence of OS, and the pathological characteristics closely resemble human OS. In this study, we found that Runx3 is markedly upregulated in OS developed in p53f/f-Sp7Cre mice (p53-null OS). Runx3-knockdown suppressed tumorigenicity of p53-null OS cells in nude mice and osteoblast-specific Runx3-knockout increased OS-free survival rate of p53f/f-Sp7Cre mice, clearly showing the oncogenic function of Runx3 in p53-deficient osteosarcomagenesis. Runx3 was found to upregulate target genes which are known to possess oncogenic functions in the absence of p53. These results reveal a novel molecular basis of p53-deficient osteosarcomagenesis in which Runx3 is involved as an oncogene.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Runx3 p53 骨肉腫 Runx転写因子ファミリー

1. 研究開始当初の背景

代表的なヒト「希少がん」である骨肉腫は、これまで研究対象として扱われる機会が少なく、極めて解析が遅れている間葉系細胞由来の悪性腫瘍である。骨肉腫は小児をはじめ若年層に多く、生存できても四肢の切除手術など、若くして失うものの影響は大きい。そして残念なことに、いまだ手術以外に有効な治療法が確立されているとは言えない状況である。一刻も早い骨肉腫克服に向けて、緊急性の高い研究課題である。

2. 研究の目的

一般に骨肉腫発症の主要因と考えられているのが、p53 遺伝子の異常である。p53 はほとんどすべてのヒトがんにおいて「がん抑制遺伝子」として機能することが知られているが、骨肉腫においてはその不活性化の頻度がきわめて高い。骨芽細胞特異的 p53 遺伝子欠損マウスはほぼ 100% の個体で骨肉腫を発症し、その発症した骨肉腫の病理学的性状がヒト骨肉腫に酷似していることから、ヒト骨肉腫の動物モデルとして広く利用されている。よって、骨芽細胞特異的 p53 遺伝子欠損マウス ($p53^{fl/fl}Sp7Cre$; 骨芽細胞特異的転写因子 Sp7/Osterix の陽性細胞で p53 遺伝子の特異的に欠損させたマウス) に発症した骨肉腫を詳細に解析することにより、ヒト骨肉腫の発症・進展にかかわる分子機構をマウス生体レベルで解明できると考えた。

これまで広くヒトがんの発症に関与することが示唆されてきた転写因子 RUNX ファミリー遺伝子 (RUNX1, RUNX2, RUNX3) であるが、研究代表者は、特に RUNX3 のヒトがんにおける「がん抑制遺伝子」としての機能を解析し報告してきた。しかし近年は、その RUNX3 を含め RUNX ファミリー遺伝子の「がん遺伝子」としての機能が注目を集めている。さらに RUNX 転写因子の機能は骨関連間葉系細胞の増殖と分化に必須であることは周知であり、p53 の機能的相互作用も報告されている。果たして骨肉腫においては、RUNX ファミリー遺伝子は「がん遺伝子」として働くのか、それとも「がん抑制遺伝子」なのか？

本研究では、p53 欠損骨肉腫発症マウスモデルを用いて、Runx ファミリー遺伝子とその骨肉腫の発症にどのようにかかわっているのかを明ら

かにし、それを手掛かりに、骨肉腫発症のベースとなる分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) $p53^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスに発症した骨肉腫において、Runx1, 2, 3 の発現様式を確認した。

(2) $p53^{fl/fl}Sp7Cre$ に Runx1, 2, 3 のコンディショナルノックアウトマウスを掛け合わせ、マウスレベルで骨肉腫発症過程を観察した。

(3) ヒト骨肉腫細胞株、臨床検体において、RUNX1, RUNX2, RUNX3 の発現様式を確認した。加えて NIH データベースで公開されている情報を解析した。

(4) $p53^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスに発症した骨肉腫から樹立した骨肉腫細胞を用いて、Runx ファミリー遺伝子のターゲットとなる因子を検索した。マイクロアレイ解析および ChIP-Sequence 法を用いた。

4. 研究成果

(1) $p53^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスに発症した骨肉腫において、Runx1, Runx2, Runx3 の発現を Western blot およびリアルタイム PCR により比較検討した。Runx1 の発現量には顕著な増減は見られず、Runx2 と Runx3 の発現量は増加していたが、特に Runx3 の発現量の増加は顕著だった。 $p53^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスに発症した骨肉腫組織をバラバラにし、腫瘍細胞をクローン化して細胞株をいくつか樹立すると、Runx3 の発現量にばらつきが出たが、Runx3 の発現が低いものは、担癌実験 (Xenograft) を行うと、ヌードマウス皮下で腫瘍を形成できず、Runx3 の発現の高いものは、大きな腫瘍 (原発骨肉腫に性状が酷似した骨肉腫) を形成した。

(2) $p53^{fl/fl}Runx3^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスを作出し、 $p53^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスと骨肉腫の発症を比較した。 $p53^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスと比較して、 $p53^{fl/fl}Runx3^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスの寿命は延び、骨肉腫の発症も極めて効果的に抑制された。生後 1 年の時点での骨肉腫発症率は $p53^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスで 76%、 $p53^{fl/fl}Runx3^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスではたったの 7.7%、最終的に前者はほぼ 100% 発症するのに比べ、後者は 44% の個体でのみ発症し、半数以上が発症しなかった。同時に $p53^{fl/fl}Runx1^{fl/fl}Sp7Cre$ と $p53^{fl/fl}Runx2^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスを作出したが、 $p53^{fl/fl}Runx1^{fl/fl}Sp7Cre$ マウスの骨肉腫発症率は

p53^{fl/fl}Sp7Cre マウスと変わらなかった。また *p53^{fl/fl}Runx2^{fl/+}Sp7Cre* マウスの生後1年までの生存率はきわめて低く、比較が不可能であった。これら一連の解析結果から、ヒトでもマウスでも骨肉腫の発症には Runx3 の oncogenic な機能が必須で、その機能障害が骨肉腫制圧に有効であることが判明した。骨肉腫の抑制には、Runx3 の量を抑えることが重要であるが、Runx3 をゼロにしてしまうと(すなわち *p53^{fl/fl}Runx3^{fl/fl}Sp7Cre* マウスは)、逆に骨分化の異常で早期に死亡することも判明した。(実際、骨芽細胞および骨肉腫細胞で Runx3 タンパク量がゼロということはないため、*p53^{fl/fl}Runx3^{fl/fl}Sp7Cre* マウスは Artificial と考えられ、解析対象から除外した。)

(3) ヒト骨芽細胞をコントロールにし、13 種類のヒト骨肉腫細胞株において RUNX1, RUNX2, RUNX3 の発現を Western blot により比較検討した。RUNX1 の発現量には顕著な増減は見られず、RUNX2 の発現量はその細胞株のもつ骨分化(石灰化)能に比例して増加していた。ところが、RUNX3 は、ヒト骨芽細胞における発現レベル(コントロールレベル)に比べて、骨肉腫細胞で顕著に亢進しており、その発現量はその骨肉腫細胞株の持つヌードマウス皮下における造腫瘍能にきれいに比例した。さらに、ヒト骨肉腫臨床献体 40 症例を検討したところ、その90%以上の検体において、RUNX3 の発現はコントロールレベルの数倍から数十倍亢進していた。

(4) *p53^{fl/fl}Sp7Cre* マウスに発症した骨肉腫から樹立した細胞株を用いて、発現亢進が顕著であった Runx3 のターゲット因子を検索した。Runx3 をノックダウンした細胞とコントロール細胞を比較したところ、代表的ながん遺伝子の複数がマイクロアレイ解析から同定された。実際それらの遺伝子領域に Runx3 が結合しているかどうかを検討するため、ChIP-Sequence 法を用いて確認した。結果 *p53* 遺伝子が不活性化されているときに、Runx3 は強く結合し、*p53* が存在しているときには(正常細胞では)、ほとんど結合が見られないことが判明した。

以上の結果より、*p53* 不活性化に始まる骨肉腫の発症過程においては、発現量が亢進される Runx3 が代表的ながん遺伝子の発現を特異的に異常亢進させることにより、骨肉腫の発症と進展に深く関与することが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. Chuang LSH, **Kosei Ito**, Ito Y. Roles of RUNX in solid tumors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 962, 299-320 (2017) (査読有)
2. Jiang Q, Qin X, Kawane T, Komori H, Matsuo Y, Taniuchi I, **Kosei Ito**, Izumi S, Komori T. Cbfb2 isoform dominates more potent Cbfb1 and is required for skeletal development. *Journal of Bone and Mineral Research* 31(7), 1391-1404 (2016) (査読有)
3. Nagatake T, Fukuyama S, Sato S, Okura H, Tachibana M, Taniuchi I, **Kosei Ito**, Shimojima M, Matsumoto N, Suzuki H, Kunisawa J, Kiyono H. Central role of core binding factor $\beta 2$ in mucosa-associated lymphoid tissue organogenesis in mouse. *PLOS ONE* 10(5): e0127460 (2015) (査読有)
4. Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi H, Taniuchi I, **Kosei Ito**, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori T. Cbfb regulates bone development by stabilizing Runx family proteins. *Journal of Bone and Mineral Research* 30(4), 706-714 (2015) (査読有)
5. Ju X, Ishikawa T, Naka K, **Kosei Ito**, Ito Y, Oshima M. Context-dependent activation of Wnt signaling by tumor suppressor RUNX3 in gastric cancer cells. *Cancer Science* 105, 418-424 (2014) (査読有)
6. **Kosei Ito**, Maruyama Z, Sakai A, Izumi S, Moriishi T, Yoshida CA, Miyazaki T, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of *Cdk6* and *Ccnd1* in chondrocytes inhibited chondrocyte maturation and caused *p53*-dependent apoptosis without enhancing proliferation. *Oncogene* 33, 1862-1871 (2014) (査読有)

[学会発表](計1件)

1. 伊藤公成、RUNX3の「がん遺伝子」「がん抑制遺伝子」としての機能. 第13回原研研究集会, 長崎大学(長崎県・長崎市), 2014年

1月22日

〔その他〕

ホームページ：

[http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/m
bb/member.html](http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/m
bb/member.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

伊藤 公成 (ITO, Kosei)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授

研究者番号：00332726