

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26860819  
研究課題名(和文) HMGA2がん遺伝子を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics targeting HMGA2 gene.

## 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はHMGA2遺伝子が高発現している胎児型横紋筋肉腫(以下ERMS)の細胞株におけるHMGA2の機能解析を行った。HMGA2の発現抑制によりERMS細胞株の増殖抑制、G1期細胞周期停止、筋分化の促進が生じた。次にHMGA2とDNAの結合を阻害すると予想されるnetropsinの抗腫瘍効果を検討した。3種類のERMS細胞株でIC50は、それぞれ148、158、87microMであった。ERMS細胞株の異種移植腫瘍に対し、netropsinは用量依存的に抗腫瘍効果を示した。これらの結果からHMGA2はERMS細胞株の造腫瘍性に関与しており、netropsinが抗腫瘍効果を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：HMGA2 is a high mobility group protein, acting as a transcriptional regulator. It is highly expressed in embryonal rhabdomyosarcoma (ERMS). Here, we analyzed the function of HMGA2 in ERMS. Knockdown of HMGA2 resulted in cell growth suppression, G1 phase cell cycle arrest, and muscle differentiation in the ERMS cell lines. HMGA2-expressing mouse myoblast cell lines formed larger tumors than control cells did. On the other hand, tumors induced by HMGA2-depleted ERMS cell lines were smaller than those induced by control cells. Next, we examined the effect of the HMGA2 inhibitor netropsin, which competitively inhibits DNA binding of HMGA2. The IC50s of netropsin in RD, RMS-YM and Rh18 cells were 148, 158 and 87 microM, respectively. Netropsin treatment reduced the size of xenograft tumors of ERMS cells. These results suggests HMGA2 plays an oncogenic role in ERMS cell lines, and netropsin has anti-tumor effects.

研究分野：小児がん

キーワード：横紋筋肉腫 HMGA2 netropsin がん遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1)横紋筋肉腫は小児で最も頻度の高い悪性軟部腫瘍であり、組織型は胎児型(ERMS)と胞巣型(ARMS)に大別される。近年、ERMSでは*HMGGA2* 遺伝子が高発現しており、免疫組織染色における核内 *HMGGA2* 陽性所見は ERMS に特異的であり、ARMS との鑑別に有用であることが明らかとなった。

(2)*HMGGA2* 遺伝子は、様々ながん腫、肉腫でがん遺伝子として働くことが示されており、その一方で正常組織での発現は胎児期に限られている。したがって、*HMGGA2* 遺伝子を阻害することにより、悪性腫瘍の増殖を阻害し、かつ副作用の少ない治療が可能であると予想される。

## 2. 研究の目的

(1)ERMS 細胞株における *HMGGA2* の機能解析を行う。

(2)*HMGGA2* 阻害薬である netropsin の ERMS 細胞株に対する抗腫瘍効果を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)ERMS 細胞株

ERMS 細胞株として、RD、RMS-YM、Rh18 を使用した。細胞培養は 10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地を用いた。

(2)細胞増殖能の検討

siRNA 法を用いて ERMS 細胞株の *HMGGA2* 遺伝子を抑制した後培養を行い、経時的に細胞数の測定を行った。

(3)分化能の検討

siRNA 法を用いて ERMS 細胞株の *HMGGA2* 遺伝子を抑制した後、2%ウマ血清添加 DMEM 培地による分化誘導培養を行い、筋分化の指標であるミオシン重鎖(MHC)の免疫染色を行った。

(4)細胞周期の検討

siRNA 法を用いて ERMS 細胞株の *HMGGA2* 遺伝子を抑制した後培養し、Propidium Iodide 染色を行ってフローサイトメトリー法による細胞周期の解析を行った。

(5)netropsin による増殖抑制の検討

*HMGGA2* 阻害剤である netropsin を段階的に希釈し、それぞれ ERMS 細胞株に投与し培養を行った。細胞数を計測し  $IC_{50}$  を算出した。また、ERMS 細胞株をヌードマウスに皮下移植し腫瘍を形成させた後、netropsin を 21 日間腹腔内投与した。

## 4. 研究成果

(1)*HMGGA2* 遺伝子は ERMS 細胞株の造腫瘍性に関与する

*HMGGA2* 遺伝子の発現を抑制した ERMS の細胞株は、コントロール株に比べて細胞増殖が低下した(図 1)。また、発現抑制群ではコントロール株に比べて MHC 細胞数が増加しており、筋分化の誘導を示した(図 2)。さらに *HMGGA2* 遺伝子の発現を抑制した群では、コントロール株に比べて、G1 期細胞周期停止を起こしている細胞の割合が増加した(図 3)。これらの結果から、*HMGGA2* 遺伝子は ERMS 細胞株の造腫瘍性に関与することが示唆された。

(2)netropsin は ERMS 細胞株に対して抗腫瘍効果を呈する

ERMS 細胞株において、*HMGGA2* 遺伝子は増殖能に関与していることが明らかになったため、*HMGGA2* 阻害剤である netropsin の増殖抑制効果を検討した。ERMS 細胞株に対する netropsin の  $IC_{50}$  は、RD、RMS-YM、Rh18 でそれぞれ 148、158、87 $\mu$ M であった(図 4)。次に、ヌードマウスに ERMS 細胞株を皮下移植し腫瘍を形成させた後、ヌードマウスに netropsin を腹腔内投与した。netropsin の投与量を 0.4mg/kg まで増量すると、腫瘍の縮小傾向がみられた(図 5)。以上の結果から、netropsin は *HMGGA2* が高発現している ERMS 細胞株に対して抗腫瘍効果を呈することが示唆された。

## 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)

[学会発表](計 1件)

大内一孝, 宮地 充, 栗原康通, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創. 融合遺伝子陰性横紋筋肉腫における *HMGGA2* の機能解析と netropsin の抗腫瘍効果の検討. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014 年 11 月 28 日~11 月 30 日; 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市).

## 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

図 1. *HMGA2* の発現抑制により、細胞増殖能は低下する。

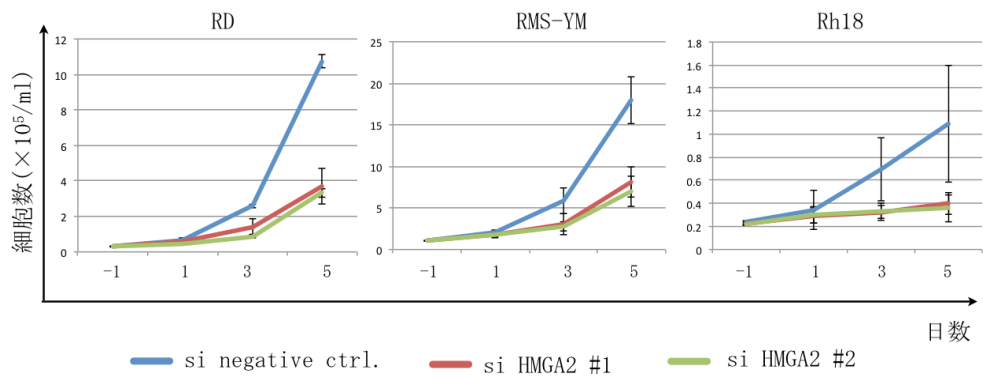


図 2. *HMGA2* の発現抑制により、筋分化が促進される。

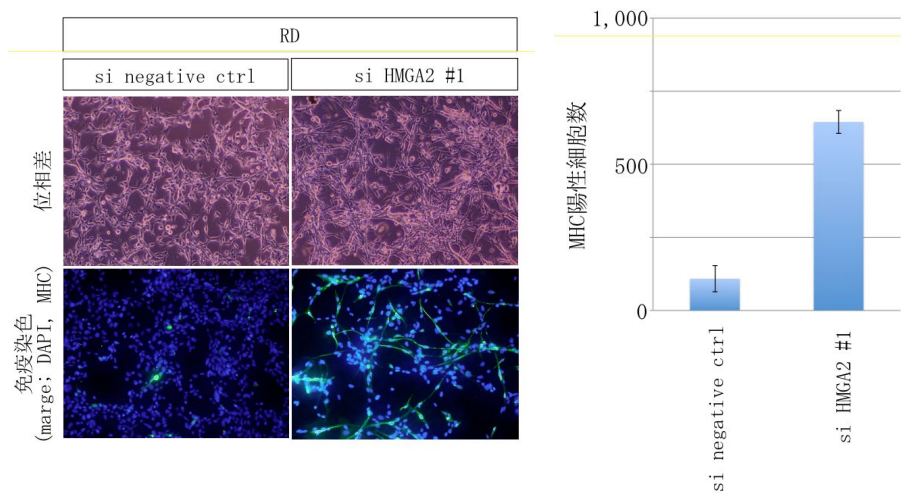


図 3. *HMGA2* の発現抑制により、G1 期細胞周期停止が生じる。

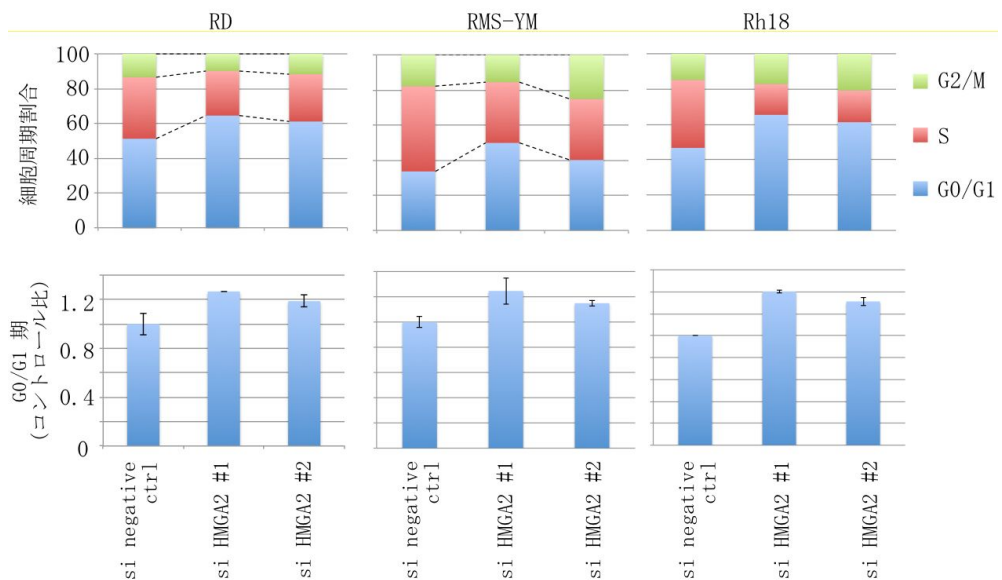


図 4. netropsin は濃度依存性に ERMS 細胞株の増殖を抑制する。

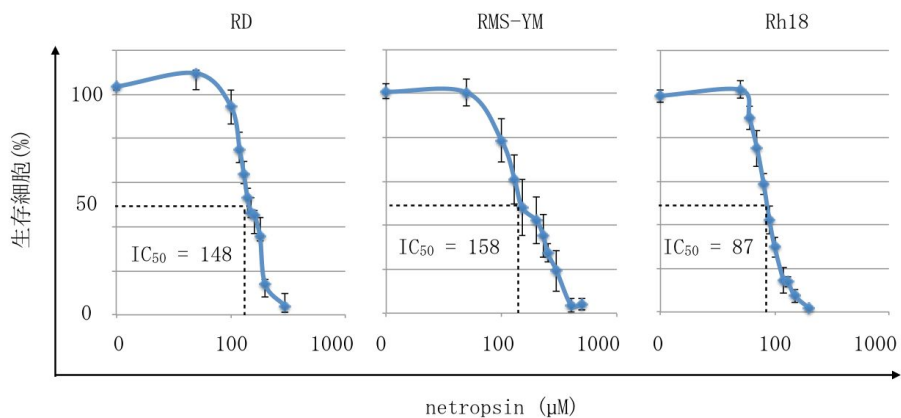


図 5. netropsin は濃度依存的に ERMS 細胞株腫瘍に対して抗腫瘍効果を示す。

