

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20009

研究課題名(和文) 骨肉腫肺転移に関するマイクロRNAの検討

研究課題名(英文) Analysis of micro RNA related to osteosarcoma metastasis

研究代表者

當銘 保則 (Tome, Yasunori)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20547369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨肉腫細胞株143B(親株)と143B-LM4(高肺転移株)の培養細胞株からマイクロRNAを含むトータルRNA抽出し、マイクロRNAの発現を解析した。親株に比して高肺転移株でmir-143とmir-145が有意に高い発現をしていることを同定した。さらにマイクロアレイによるクラスター解析を行った結果、mir-143とmir-145に関連した下流のmRNA、TANGLMとLASP1が上昇していることを確認した。現在、高肺転移株においてTANGLMおよびLASP1をsiRNAによるノックアウトあるいは形質導入による過剰発現を行い、mir-143とmir-145の発現量の解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Total RNAs including micro RNAs were extracted from parental human osteosarcoma 143B cells and highly metastatic 143B-LM4 cells. mir-143 and mir-145 were higher expressed in 143B-LM4 cells compared to 143B cells. Moreover, DNA microarray analysis was performed using extracted RNAs. TANGLM and LASP1, which are related to mir-143 and mir-145, were highly expressed. Further analysis would be performed with 143B cells and 143B-LM4 cells regarding TANGLM and LASP1.

研究分野：整形外科, 骨・軟部腫瘍

キーワード：miRNA 骨肉腫 肺転移

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は、化学療法や手術療法の発展によって近年著しく生命予後が改善してきている疾患である。しかしながら、初診時もしくは経過中に肺転移をきたす症例も少なくなく、肺転移を有する症例ではいまだに治療成績が不良で、肺転移転移に対する機序の解明や新しい治療方法の開発は喫緊の課題である。近年、mRNA の発現を制御する 20~25 の短い塩基配列からなる非翻訳型の本鎖の RNA (マイクロ RNA) が注目され、種々の疾患やがんでマイクロ RNA の関与が報告されている。骨肉腫においてもマイクロ RNA 発現の研究が報告されているが、いまだ骨肉腫の肺転移に関わるマイクロ RNA の解析の報告は少ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨肉腫肺転移における促進もしくは抑制因子としてのマイクロ RNA の解析を行うことであり、具体的には、ヒト骨肉腫細胞株の親株と高肺転移株を対象に以下の課題について検討を行う。

1) 親株と高肺転移株とのマイクロ RNA の発現を比較検討

2) マイクロ RNA の発現解析に基づいて、その下流の mRNA やタンパク質の発現解析ならびにその分子の肺転移促進もしくは抑制効果をマウスを用いた *in vivo* での比較検討親株と高肺転移株の分子プロファイリングを解析し、肺転移の機序解明や治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

骨肉腫肺転移におけるマイクロ RNA の機能を解明するために、大学院生協力のもと、以下のことを重点的に研究を実施する。

平成 27 年度は、文献レビューにより肺転移におけるマイクロ RNA の候補を整理、分類するとともに、その結果に基づいて比較検討するマイクロ RNA を選定し、親株と高肺転移株におけるマイクロ RNA 発現の比較検討を行う。

平成 28 年度は前年度のマイクロ RNA の解析に基づいて、解析したマイクロ RNA によって制御される mRNA やその下流のタンパク質の発現を親株と高肺転移株とで比較検討を行う。またその mRNA やタンパク質の肺転移に対する影響をマウスを用いた動物実験で高肺転移株を用いて解析する。平成 29 年度は一連の研究成果をまとめ、国内外の学会発表や学術論文等で公表する。

4. 研究成果

ヒト骨肉腫細胞株 143B (親株) とこれまで先行研究で樹立した 143B-LM4 (高肺転移株) の培養細胞株からマイクロ RNA を含むトータル RNA 抽出し、マイクロ RNA の発現を解析した。その結果、親株に比して高肺転移株で mir-143 と mir-145 が有意に高い発現をし

ていることを同定した。さらに抽出したトータル RNA を用いてマイクロアレイによるクラスター解析を行った結果、mir-143 と mir-145 に関連した下流の mRNA、TANGLM と LASP1 が上昇していることを確認した。現在、高肺転移株において TANGLM および LASP1 を siRNA によるノックアウトあるいは形質導入による過剰発現を行い、mir-143 と mir-145 の発現量の解析を行っている。また、今後はマイクロ RNA のクラスター解析を行い、その他のマイクロ RNA の解析を行う。有意に発現の違いがみられるマイクロ RNA 候補を抽出して、その関連した下流の mRNA を同定する予定である。

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 12 件)

1. Yasunori Tome, Fuminari Uehara, Fuminori Kanaya, and Robert M. Hoffman. Comparison of "Dimensionality" of cancer cell culture with Gelfoam® histoculture and Matrigel. *Methods Mol Biol* 2018; 1760: 205-214. **査読あり**.
2. Tasuku Kiyuna, Yasunori Tome, Fuminari Uehara, Takashi Murakami, Yong Zhang, Ming Zhao, Fuminori Kanaya, and Robert M. Hoffman. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R inhibited osteosarcoma angiogenesis in the *in vivo* Gelfoam® assay visualized by color-coded imaging. *Anticancer* 2018; 38: 159-64. **査読あり**.
3. Tasuku Kiyuna, Takashi Murakami, Yasunori Tome, Kei Kawaguchi, Kentaro Igarashi, Kentaro Miyake, Fuminori Kanaya, Arun Singh, Fritz C. Eliber, Robert M. Hoffman. Analysis of stroma labeling during multiple passage of a sarcoma imagenable patient-derived orthotopic xenograft (iPDOX) in red fluorescent protein transgenic nude mice. *J Cell Biochem* 2017; doi: 10.1002/jcb.25991. **査読あり**.
4. Tasuku Kiyuna, Takashi Murakami, Yasunori Tome, Kentaro Igarashi, Kei Kawaguchi, Tara Russel, Mark Eckardt, Joseph Crompton, Arun Singh, Nicholas Bernthal, Susan Bukata, Noah Federman, Fuminori Kanaya, Fritz C. Eliber, Robert M. Hoffman. Labeling the stroma of a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model of undifferentiated pleomorphic soft-tissue sarcoma with red

- fluorescent for rapid non-invasive imaging for drug screening. *J Cell Biochem* 2017; 118: 361-65. **査読あり** .
5. **Yasunori Tome**, Shuya Yano, Naotoshi Sugimoto, Sumiyuki Mii, Michael Bouvet, Hiroyuki Tsuchiya, Fuminori Kanaya, and Robert M. Hoffman. Use of α v integrin linked to GFP to image molecular dynamics in trafficking cancer-cell emboli. *J Cell Biochem* 2017; 118:26-30. **査読あり** .
 6. **Yasunori Tome**, Hiroaki Kimura, Naotoshi Sugimoto, Hiroyuki Tsuchiya, Fuminori Kanaya, Michael Bouvet, Robert M. Hoffman. The disintegrin, Echistatin, in combination with doxorubicin targets high-metastatic human osteosarcoma overexpressing α v 3 integrin in chick embryo and nude mouse models. *Oncotarget* 2016; doi: 10.108632/ocotarget. 13947. **査読あり** .
 7. Sumiyuki Mii, Jennifer Duong, **Yasunori Tome**, Aisada Uchugonova, Fang Liu, Yasuyuki Amoh, Norimitsu Saito, Kensei Katsuoka, Robert M. Hoffman. Nestin-expressing-hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells promote whisker sensory-nerve growth in long-term 3D-Gelfoam® histoculture. *Methods Mol Biol* 2016; 1453: 39-47. **査読あり** . 0.79
 8. **Yasunori Tome**, Fuminari Uehara, Shinji Miwa, Shuya Yano, Sumiyuki Mii, Elena V. Efimova, Hiroaki Kimura, Tsuchiya Hiroyuki, Fuminori Kanaya, and Robert M. Hoffman. Efficacy of the combination of a PARP inhibitor and UVC on cancer cells imaged by focus formation by the DNA repair-related protein 53BP-1 linked to green fluorescent protein. *Anticancer Res* 2016; 36: 3821-26. **査読あり** . 1.87
 9. **Yasunori Tome**, Shuya Yano, Naotoshi Sugimoto, Sumiyuki Mii, Fuminari Uehara, Shinji Miwa, Michael Bouvet, Hiroyuki Tsuchiya, Fuminori Kanaya, Robert M. Hoffman. Use of α v integrin linked to green fluorescent protein in osteosarcoma cell and confocal microscopy to image molecular dynamics during lung metastasis in nude mice. *Anticancer Res* 2016; 36: 3811-16. **査読あり** . 1.87
 10. **Yasunori Tome**, Hiroaki Kimura, Tasuku Kiyuna, Naotoshi Sugimoto, Hiroyuki Tsuchiya, Fuminori Kanaya, Michael Bouvet, and Robert M. Hoffman. Disintegrin targeting of an α v 3 integrin over-expressing high-metastatic human osteosarcoma inhibits cell proliferation, migration, invasion and adhesion in vitro. *Oncotarget* 2016; 7(29): 46315-20. **査読あり** . 6.35
 11. Tasuku Kiyuna, Takashi Murakami, **Yasunori Tome**, Kei Kawaguchi, Kentaro Igarashi, Yong Zhang, Ming Zhao, Yungfeng Li, Michael Bouvet, Fuminori Kanaya, Arun Singh, Sarah Dry, Fritz C. Eliber, Robert M. Hoffman. High efficacy of tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R on a doxorubicin-and dactolisib-resistant follicular dendritic-cell sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft nude mouse model. *Oncotarget* 2016; 7(22): 33046-54. **査読あり** .
 12. Fuminari Uehara, Yukihiro Hiroshima, Shinji Miwa, **Yasunori Tome**, Shuya Yano, Mako Yamamoto, Yasunori Matsumoto, Hiroki Maehara, Kazuhiro Tanaka, Michael Bouvet, Fuminori Kanaya, Robert M. Hoffman. Fluorescence-guided surgery of retroperitoneal-implanted human fibrosarcoma in nude mice delays or eliminates tumor recurrence and increases revival compared to bright-light surgery. *PLoS One* 2015; 10 (2): e0116865. **査読あり** .
- [学会発表](計 5件)
1. 19th International Society of Limb Salvage General Meeting 2017, Kanazawa, JAPAN. **Yasunori Tome**, Hiroki Maehara, Tasuku Kiyuna, Hiromichi Oshiro, and Fuminori Kanaya. Management of local recurrences and distant metastases of soft-tissue sarcoma.
 2. 19th International Society of Limb Salvage General Meeting 2017, Kanazawa, JAPAN. **Yasunori Tome**, Hiroki Maehara, Tasuku Kiyuna, Hiromichi Oshiro, and Fuminori Kanaya. The mid-term outcome following the frozen autograft treated with liquid nitrogen for bone and soft-tissue sarcomas. **Oral symposium**
 3. 11th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society 2016, Singapore, Singapore. **Yasunori Tome**, Hiroki Maehara, Tasuku Kiyuna, and Fuminori Kanaya. Cannulated hydroxyapatite pins for solitary bone cysts.
 4. 11th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society 2016, Singapore,

Singapore. Yasunori Tome, Hiroki Maehara, Tasuku Kiyuna, and Fuminori Kanaya. Reconstruction with tumor-bearing frozen autograft for femoral musculoskeletal tumor resection. **Oral symposium**

5. 18th International Society of Limb Salvage General Meeting 2015, Orlando, FL, USA. Yasunori Tome, Fuminari Uehara, Hiroki Maehara, Hiroyuki Tsuchiya, Robert M. Hoffman, and Fuminori Kanaya. Imaging the interaction of v integrin-GFP in osteosarcoma cells with RFP-expressing host stromal cells in nude mice.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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 當銘保則
(Tome Yasunori)
琉球大学医学研究科准教授
研究者番号：20547369

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者

・喜友名 翼
(Kiyuna Tasuku)
琉球大学医学研究科 大学院生

・大城 裕理
(Oshiro Hiromichi)
琉球大学医学研究科 大学院生