

平成21年6月17日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591742  
 研究課題名（和文） 網羅的遺伝子発現解析による骨肉腫患者の抗がん剤感受性および肺転移規定因子の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of factors determining chemosensitivity and pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma by genomic expression analysis  
 研究代表者  
 藤本 修一（FUJIMOTO SHUICHI）  
 千葉県がんセンター（研究所）・化学療法研究部・部長  
 研究者番号：70260255

## 研究成果の概要：

小児悪性骨腫瘍である骨肉腫では、抗がん剤による治療の効果が不十分であったり、肺に転移を生ずることがあり、このような症例の予後は不良である。われわれは骨肉腫患者から採取された腫瘍組織から遺伝子を抽出し、治療成功例と不成功例のそれぞれの遺伝子発現パターンを比較解析することで、骨肉腫の治癒率と関係がありそうな候補遺伝子の場所を見つけ出した。今後この中でも重要と思われる遺伝子の働きを明らかにする予定である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は骨原発悪性腫瘍では最多の疾患であり、主に小児および青年期と40歳代以降の二峰性の発症ピークをもつ。近年の多剤併用化学療法の導入や画像診断の進歩による

病巣の精細な評価により、現在では5年生存率は70-80%に達している。しかしながら、初診時転移例や化学療法低感受性例の予後は未だに不良であり、このような難治性骨肉腫患者に対する新たなコンセプトに基づく

治療法の開発が望まれている。骨肉腫患者の抗がん剤感受性および肺転移規定因子の解明はその目的に大きく寄与すると思われる。

## 2. 研究の目的

骨肉腫細胞株および腫瘍組織における遺伝子の発現パターンを通して、その病態の把握を遺伝子レベルで行うとともに、予後等の臨床的な因子と関係する遺伝子の同定を通じて、新たな治療法開発に役立つ知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨肉腫細胞株におけるがん関連遺伝子の発現パターン

骨肉腫では他の癌種と同様、がん抑制遺伝子として知られている Rb および p53 のそれぞれの pathway が腫瘍形成に深く関連していると考えられている。骨肉腫細胞株 10 種において、これまでに骨肉腫の予後と相関すると考えられているこれら二つの pathway 上の 6 つのがん関連遺伝子 (p53, MDM2, p21, p14<sup>ARF</sup>, Rb, p16<sup>INK4a</sup>) の発現パターンを、Western blot および semi-quantitative RT-PCR にて解析を行った。

### (2) 骨肉腫腫瘍検体を利用した網羅的遺伝子解析

- 研究協力者である千葉県がんセンター整形外科医師により各症例の臨床病理学的因子データが収集され、これをもとに化学療法奏効群 (予後良好群) と非奏効群 (予後不良群) のそれぞれ 8 例ずつを代表症例としてピックアップした。
- これらの症例の骨肉腫腫瘍検体は、千葉県がんセンター凍結保存委員会にて凍結保存されており、当センターの倫理審査委員会の承認を受けたうえで、これらの検体より DNA を抽出した。
- 合計 16 症例の骨肉腫腫瘍検体から抽出された DNA を用いて arrayCGH によるゲノムコピー数解析を行った。プラットフォームは Agilent Technologies 社の Whole Human

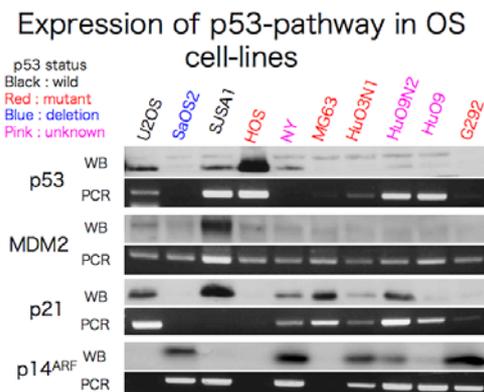
Genome oligoDNA microarray (44k) を用いた。この結果を予後良好群、予後不良群の二群間で比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 骨肉腫細胞株におけるがん関連遺伝子の発現パターン

骨肉腫細胞株 10 種における p53 および p53 pathway 上のがん関連遺伝子である MDM2, p21, p14<sup>ARF</sup> の発現パターンを、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで検索した。その結果、p53 および MDM2 のタンパク質レベルにおける高発現はそれぞれ 10 種中 4 例、1 例に認められた。また p53 により誘導される p21 は 10 種中 6 例に高発現を認めたが、興味深いことに p14<sup>ARF</sup> のタンパク質レベルでの発現パターンと p21 の発現パターンは逆相関する傾向が認められた。骨肉腫においては、p14<sup>ARF</sup> が MDM2 の持つ p53 を分解する働きを抑制することにより p53 発現を活性化させ、その結果 p21 の発現が上昇するという p53 pathway に異常が生ずることによってがん化するというメカニズムが考えられた (図 1)。

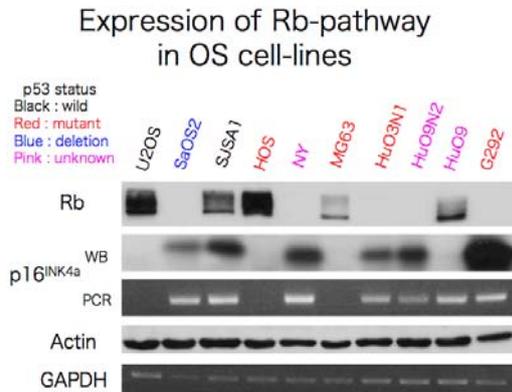
(図 1) 骨肉腫細胞株における p53 pathway



Rb および p16<sup>INK4a</sup> という Rb pathway の 2 遺伝子の発現パターンを調べてみると、Rb のタンパク質レベルにおける高発現株は 10 種中 5 種、p16<sup>INK4a</sup> の発現上昇は 6 種に見られた (図 2)。通常正常細胞では p16<sup>INK4a</sup> の発現は非常に低いことが知られており、骨肉腫において

は p16<sup>INK4a</sup> の関与が重要である可能性が示唆された。

(図 2) 骨肉腫細胞株における Rb pathway



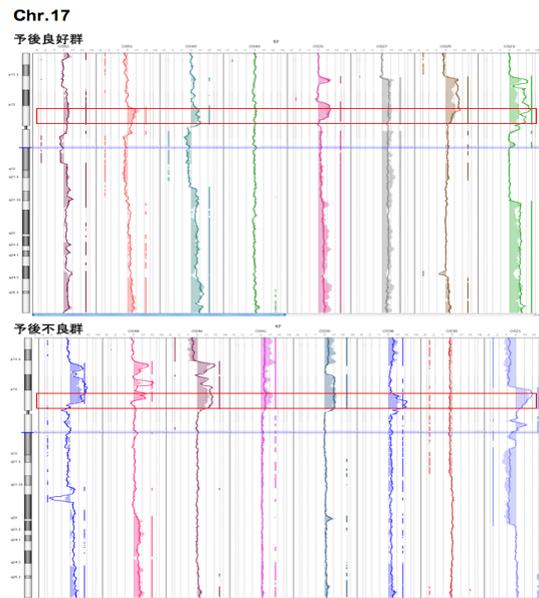
## (2) 骨肉腫腫瘍検体を利用した網羅的遺伝子解析

・今回千葉県がんセンターで治療を受けた骨肉腫患者（同一化学療法プロトコルで治療を受け、全例広範切除術が施行され、さらに統一された方法で化学療法効果判定を二人以上の病理医によって受けている）をその転帰および化学療法効果判定をもとに二群に分けた（予後良好群と不良群）。予後良好群および予後不良群の各 8 例づつから抽出された DNA を用い、arrayCGH によるゲノムコピー数解析を行った。

骨肉腫症例 16 例全例を俯瞰して骨肉腫に特異的な増幅領域を検索したところ、1q22 (7/16 症例), 6p21 (6/16 症例), 12q13 (4/16 症例), 17p12 (14/16 症例) が認められた。特に 17p12 では約 88%の症例に同領域の増幅が見られ (図 3)、また予後良好群および不良群ともに 7/8 例に認められた。

次に予後良好群または予後不良群において特異的に増幅を認めた領域は、1q22 (予後良好群において 5/8 症例、予後不良群において 2/8 症例)、12q13 (予後良好群において 0/8 症例、予後不良群において 5/8 症例) の 2 領域であった。

(図 3) 骨肉腫検体における 17p12 増幅



・これまでに骨肉腫腫瘍検体を用いたゲノムコピー数解析はいくつか報告がなされているが、対象症例を層別化した上での解析は渉猟し得る範囲内ではみあたらない。

Atyleらは22症例の骨肉腫臨床検体を用いてarrayCGHを行っており、12q11-15, 8q24, 6p12-13, 17p11-13のampliconを指摘している。これ以外にも骨肉腫腫瘍検体において12q13-14が高頻度に増幅されているという報告は散見されており、この領域にはMDM2やSAS, CDK4などのがん遺伝子が存在している。骨肉腫はさまざまな悪性腫瘍の中においてMDM2の発現亢進が比較的高頻度に見られることがわかっている。さらに興味深いことに、われわれの結果からは予後不良群に特異的に12q13の増幅が認められた。われわれの骨肉腫細胞株による検討ではMDM2高発現株は1種のみであったが、骨肉腫腫瘍形成にはMDM2が重要な役割をになっている可能性が高いと考えられる。

・また今回のわれわれの結果では17p12の高頻度な増幅をみとめた。この領域にはHer2/neuがあり、同様な増幅を認める癌種としては乳がんや胃がん、膵がん、神経芽腫があげられる。この事実は今後骨肉腫に対し、

HER2 陽性乳がんでは効果が認められているトラスツズマブを使用する動機付けになりうると期待している。

・またさらにわれわれは今回の研究において、予後不良群において 12q13-14 領域の増幅を認めなかった 2 症例に、共通した新規 amplicon を同定した。現在この領域に存在する遺伝子群の骨肉腫における発現解析を進めているところであり、今までの MDM2-p53 pathway とは異なる、新しい制御系の存在が予想される。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤本 修一 (FUJIMOTO SHUICHI)

千葉県がんセンター (研究所)・化学療法  
研究部・部長

研究者番号 : 70260255

### (2) 研究分担者

大平 美紀 (OHIRA MIKI)

千葉県がんセンター (研究所)・生化学研  
究部・研究員

研究者番号 : 20311384

影山 肇 (KAGEYAMA HAJIME)

千葉県がんセンター (研究所)・化学療法  
研究部・研究員

研究者番号 : 50260253

### (3) 研究協力者

岩田 慎太郎 (IWATA SHINTARO)

千葉県がんセンター・整形外科・医師

研究者番号 : 90549685