

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592056
 研究課題名（和文） 融合遺伝子を標的とした横紋筋肉腫胞巣型に対する分子標的治療の開発
 研究課題名（英文） Development of molecular targeted therapy against the fusion gene for alveolar rhabdomyosarcoma
 研究代表者
 米田 光宏（YONEDA AKIHIRO）
 大阪府立母子保健総合医療センター・研究員
 研究者番号：30372618

研究成果の概要：

当初、難治性小児悪性固形腫瘍である横紋筋肉腫の中でも極めて予後不良である胞巣型横紋筋肉腫に対し、特徴的な融合遺伝子に着目して、これを分子標的として抗腫瘍効果を得ることを計画した。しかし研究途上において、他施設より融合遺伝子に対する RNA 干渉を行うと細胞増殖抑制が得られるとされる論文が発表された。そこで、新たな横紋筋肉腫の分子標的として、最近成人の悪性腫瘍で注目されている Hedgehog signaling pathway に着目し、その構成転写因子である Gli1 の発現を検討したところ、横紋筋肉腫細胞株において発現亢進が認められた。そこでまた、Gli1 に対する阻害剤である FSK を投与したところ、濃度依存性に細胞増殖を抑制することができた。この点に着目し、ヌードマウスに移植した横紋筋肉腫に対し、FSK を投与したところ、腫瘍増殖抑制効果を得ることができた。したがって横紋筋肉腫に対する分子標的として Hedgehog signaling pathway が有力であることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：横紋筋肉腫、融合遺伝子、RNA 干渉、分子標的治療、Hedgehog signaling pathway

1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫は小児における軟部肉腫として最も頻度が高い。近年の集学的治療によりその予後は全体で 50～70%と改善されつつあるが、たとえ救命できたとし

ても、外科治療による臓器機能廃絶、化学療法による副作用、放射線療法による組織障害など晩期合併症の問題が残されている。また、横紋筋肉腫は組織学的に胎児型と胞巣型に分類されるが、特に胞

巢型はその生存率は50%以下と予後不良で、未だ救命のために強力な治療を要する。胞巢型横紋筋肉腫は、特徴的な融合遺伝子PAX3-FKHRまたはPAX7-FKHRの発現を有していることが知られている。ここに着目して、これら融合遺伝子を分子標的として抗腫瘍効果を得ることを計画した。

本研究では融合遺伝子発現を選択的かつ効率的に抑制するために、近年注目されているRNA干渉法を採用した。また、将来の臨床応用を見据え、small interfering RNA (siRNA) を細胞に導入する際に、HVJ-envelope法を用い、生体内でのRNA干渉を安全かつ有効に行うことを目標とした。

しかしながら、研究途中に、本研究とコンセプトをほぼ同じくする研究が、他施設より発表された。すなわちPAX3-FKHR融合遺伝子に対するRNA干渉を行うと細胞増殖抑制が得られるとされる論文「Kikuchi K, et al: Effects of PAX3-FKHR on malignant phenotypes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 365:568-574, 2008」である。論文中的siRNA導入にはリポフェクション法が使われていたが、本研究では臨床応用の有利さを考え、HVJ-envelope法を用いる予定であった。そこで、導入方法の違いによる細胞増殖抑制効果を検討することとしたが、これも有効な導入効率を得ることができなかった。このため、研究の方向性を大きく変える必要があった。

新たな分子標的として、成人領域で注目されているHedgehog signaling pathwayに注目した。これは肺癌、食道癌、胃癌、基底細胞癌、小児髓芽腫等の

発癌に關与していることが示されており、横紋筋肉腫においても増殖に關与しているという基礎的なデータが報告されている。また、このシグナル系を抑制する阻害剤の研究も進んでおり、一部は臨床応用の段階にある。そこで、横紋筋肉腫におけるHedgehog signaling pathwayの役割の解明と分子標的治療モデルを作成すべく実験を計画した。

2. 研究の目的

- (1) 予後不良である横紋筋肉腫胞巢型に対するRNA干渉を用いた新たな治療法の開発を目指す。
- (2) 横紋筋肉腫におけるHedgehog signaling pathwayの役割を解明し、分子標的治療モデルの作成を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 胞巢型横紋筋肉腫融合遺伝子に対するsiRNAの構造決定とその合成
PAX3-FKHRに特異的な塩基配列の中から19merの候補配列を順次作成し、RNA干渉作用を持つsiRNAを合成し、胞巢型横紋筋肉腫細胞株RH30に対し、HVJ-envelope法を用いて融合遺伝子発現抑制を行う。なお、細胞内への導入効率を確認するために、HVJ-envelope法を用いてRH30細胞にGFPを導入し、蛍光顕微鏡にてGFP発現細胞の割合を測定した。
- (2) 横紋筋肉腫細胞株におけるHedgehog signaling pathwayの構成転写因子であるGli1の発現評価
RT-PCR法を用い、胎児型横紋筋肉腫細胞株RMS-YM、RDおよび胞巢型横紋筋肉腫細胞株RH30において、Gli1の発現評価を行った。なお正常コントロールとして、Gli1発現亢進のないヒト結腸癌細胞株Caco2を用いた。
- (3) Gli1に対する阻害剤であるforskolin

(FSK) 投与による細胞増殖抑制
横紋筋肉腫細胞株RMS-YMを用い、Gli1阻害剤であるFSKを投与して細胞増殖に与える影響を検討した。コントロールとしてヒト結腸癌細胞株Caco2を用いた。細胞培養液中にFSKを50 μ M、100 μ M、200 μ M、300 μ Mの濃度で投与し、24および48時間後の生細胞数をWST-1 assayにて検討した。

(4) ノードマウス移植横紋筋肉腫に対するFSKによる腫瘍増殖抑制効果

RMS-YMをノードマウスに移植し、これにFSKを局所注射して腫瘍径を測定した。コントロールとして生理食塩水のみ局注した群と比較検討した。

4. 研究成果

(1) PAX3-FKHR 融合遺伝子に対する siRNA の作成

HVJ-envelope 法により GFP を細胞内に導入を試みたところ、導入効率はいずれも 10%以下であった。確認のため、作成した 5 種類の siRNA を融合遺伝子の明かな発現抑制も証明できなかった。さらに、研究途中に発表された、PAX3-FKHR 融合遺伝子に対する RNA 干渉を行うと細胞増殖抑制が得られるとされる論文「Kikuchi K, et al: Effects of PAX3-FKHR on malignant phenotypes in alveolar rhabdomyosarcoma. Biochem Biophys Res Commun 365:568-574, 2008」中に示された siRNA を用い、HVJ-envelope 法にて細胞内に導入を試みたが、融合遺伝子の明かな発現抑制も証明できなかった。以上により、HVJ-envelope 法を用いた siRNA による融合遺伝子発現抑制は難しいことが判明した。また、先に発表された siRNA を用いて、リポフェクション法やこれに類似した方法による RNA 干渉実験は新規性がないことからこの方法による研究を断念せざるを得なかった。

(2) 横紋筋肉腫細胞株における Hedgehog signaling pathway の構成転写因子である Gli1 の発現

RT-PCR 法により、胎児型横紋筋肉腫細胞株 RMS-YM、RD および胞巣型横紋筋肉腫細胞株 RH30 において、Gli1 の発現亢進が認められた。

(3) Gli1 に対する阻害剤である FSK 投与による細胞増殖抑制

RMS-YM 細胞株に FSK を投与したところ、濃度依存性に細胞増殖が抑制された。また、これは、投与開始後 24 時間、48 時間の時点で認められ、とくに 48 時間後においては統計学的に有意であった。

(4) ノードマウスに移植した横紋筋肉腫に対する FSK による腫瘍増殖抑制効果

ノードマウス移植横紋筋肉腫に対し、FSK を局所注射すると腫瘍の増殖抑制が認められた。

(5) まとめ

PAX3-FKHR 融合遺伝子に対する RNA 干渉を行うために、siRNA を作成し、将来の臨床応用に有用であると思われる HVJ-envelope 法にて細胞内に導入を試みたが、融合遺伝子の発現抑制を達成するために必要な導入効率は得られなかった。また、PAX3-FKHR 融合遺伝子に対する RNA 干渉を行うと細胞増殖抑制が得られるとされる論文 (Kikuchi K, et al: Biochem Biophys Res Commun, 2008) に示された siRNA を用い、HVJ-envelope 法にて細胞内に導入を試みたが、融合遺伝子の発現抑制を達成するために必要な導入効率は得られなかった。

横紋筋肉腫細胞株における Hedgehog signaling pathway に着目し、その構成転写因子である Gli1 の発現を検討したところ、発現亢進が認められた。

Gli1 に対する阻害剤である FSK を投与した

ところ、濃度依存性に細胞増殖を抑制することができた。

ヌードマウスに移植した横紋筋肉腫に対し、FSK を投与したところ、腫瘍増殖抑制効果を得ることができた。

以上より、横紋筋肉腫に対する分子標的として Hedgehog signaling pathway が有力であることが明かとなった。

考察と今後の展開
横紋筋肉腫において Hedgehog signaling pathway が分子標的と成りうる事が明らかとなった。成人領域の悪性腫瘍において、Hedgehog signaling pathway の関連分子に対する阻害剤が研究されており、今回用いた FSK など一部の薬剤はすでに実用化されていることから、今後、これらの候補薬剤の投与による分子標的治療が有効である可能性が示唆される。したがって、Hedgehog signaling pathway 阻害剤投与の効果、安全性を確認する研究を行い、有用な薬剤が判明すれば臨床応用への期待が大きくなると考えられる。

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は下線)

[学会発表] (計 2 件)

山中宏晃・大植孝治・福澤正洋 : 小児横紋筋肉腫に対する Hedgehog シグナル活性化とその阻害剤による増殖抑制効果について。第 21 回日本バイオセラピー学会 2008.11.18 ~ 19、文京区

山中宏晃・大植孝治・上原秀一郎・福澤正洋 : 小児悪性固形腫瘍に対する Hedgehog signal pathway の治療標的としての可能性について。第 46 回日本小児外科学会総会 2009.6.1 ~ 3、大阪

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

米田 光宏 (YONEDA AKIHIRO)

大阪府立母子保健総合医療センター・研究員

研究者番号 : 3 0 3 7 2 6 1 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

福澤 正洋 (FUKUZAWA MASAHIRO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 6 0 1 6 5 2 7 2

大植 孝治 (OOUE TAKAHARU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 5 0 3 1 4 3 1 5