

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791021

研究課題名（和文） 癌抑制遺伝子 FUS1 静脈注入法による骨肉腫遺伝子治療

研究課題名（英文） Systemic Gene Therapy for Osteosarcoma by Tumor Suppressor Gene Fus1

研究代表者 川島 寛之

(KAWASHIMA HIROYUKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30361900

研究成果の概要：本研究では、間葉系正常細胞、組織と間葉系腫瘍細胞、組織における癌抑制遺伝子 FUS1 の発現を検討した。FUS1 の RNA は正常、腫瘍の両組織、細胞で広く発現が認められたが、蛋白は正常の末梢神経と正常線維芽細胞とごく一部の骨肉腫などの腫瘍組織にのみ発現が認められた。FUS1 遺伝子導入による間葉系悪性腫瘍細胞の増殖抑制とアポトーシスの誘導については、骨肉腫など多くの細胞株に効果を認めたが、程度は様々であった。肺癌細胞を用いたヌードマウスの同所移植モデルにおいて、FUS1 静脈注入法による遺伝子治療の効果が確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

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：FUS1, 間葉系腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) FUS1 は 3 番染色体短腕 21.3 染色体バンド上に同定された癌抑制遺伝子である。転写、シグナル伝達、細胞周期、アポトーシスなどに関連するミリスチル化蛋白であり、肺癌組織においては発現が消失し、腫瘍増殖や肺癌患者の予後悪化に関連するとされている。FUS1 遺伝子の強制発現は、腫瘍細胞の増殖抑制を起し、アポトーシスを誘導することが分かっており、肺癌の動物実験では抗腫瘍効果を認めるという報告もある。さら

に米国では固形腫瘍に対する FUS1 遺伝子治療の臨床試験が開始されており、臨床的な治療効果の検討が始まっている。

(2) FUS1 は正常組織では、心、脳、精巣、肺、肝、筋、腎そして脾といった様々な組織で発現が確認されている。しかし、そのほかの間葉系組織での発現に関する報告はなく、また間葉系腫瘍に対する癌抑制遺伝子としての働きに関しての報告もない。

2. 研究の目的

(1) 間葉系の正常組織、腫瘍組織における FUS1 の発現を RNA と蛋白レベルで検討し、間葉系組織における腫瘍発生過程への FUS1 遺伝子の関与について検討する。

(2) 間葉系の正常細胞である線維芽細胞と骨肉腫を含む悪性腫瘍細胞を用いて、FUS1 遺伝子の導入を行い、細胞増殖に対する抑制効果やアポトーシスの誘導作用の有無について検討する。

(3) 骨肉腫を含む多くの間葉系悪性腫瘍は肺転移の形成が予後の規定因子となることが多い。FUS1 遺伝子を肺組織に存在する腫瘍内へ導入することで、抗腫瘍効果を期待するという遺伝子治療法の有効性について、動物モデルを作成し検討する。

3. 研究の方法

(1) 本研究で用いた細胞株は以下の通り

Cell line name	origin
WI-38	Normal human lung fibroblast
BMF	Normal human bone marrow fibroblast
NHDF-AD	Normal human dermal fibroblast (adult skin)
HOS	Osteosarcoma
HuO9	Osteosarcoma
MG-63	Osteosarcoma
NOS-1	Osteosarcoma
NOS-10	Osteosarcoma
OST	Osteosarcoma
SaOS-2	Osteosarcoma
U2-OS	Osteosarcoma
NMFH-1	Malignant fibrous histiocytoma
NMHF-2	Malignant fibrous histiocytoma
ASPS-KY	Alveolar soft part sarcoma
HS-SY-II	Synovial sarcoma
NMS-2	Malignant peripheral nerve sheath tumor
OUMS-27	Chondrosarcoma
SKNMC	Primitive neuroectodermal tumor
SFT8606	Epithelioid sarcoma
402-92	Liposarcoma

(2) 本研究で用いた臨床組織はインフォームドコンセントのもと、手術または検査時に 133 名の患者から得られた 110 例の悪性間葉系腫瘍組織と 28 例の良性間葉系腫瘍組織で、その一部より RNA を抽出し、一部をパラフ

イン包埋したものを使用した。正常組織は切断肢から皮膚、骨、筋肉、腱、筋膜、脂肪、末梢神経、血管を採取して、腫瘍組織同様に使用した。

(3) 細胞と組織のそれぞれから RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により FUS1 遺伝子の発現を検討した。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を使用し、定量化した。

(4) 培養細胞における FUS1 蛋白の発現は抗 FUS1 抗体を用いたウエスタンブロット法で検討した。

(5) 組織における FUS1 蛋白の発現は網羅的な検索を行うため、Tissue Micro Array を用い、抗 FUS1 抗体による免疫化学染色を行った。

(6) 骨肉腫を含む間葉系悪性腫瘍細胞に対する FUS1 遺伝子導入による抗腫瘍作用については細胞増殖抑制効果を XTT アッセイで、アポトーシスの誘導作用については関連タンパクである Caspase のウエスタンブロット法で検討した。

4. 研究成果

(1) 組織における FUS1 RNA の発現は以下の通りであった。2 例の悪性線維性組織球腫の組織でのみ発現がなかったが、正常組織を含め他のすべての組織で発現を認めた。また、細胞株による検討でも、腫瘍細胞と正常線維芽細胞の両者すべてで発現を認めた。

Histological type	No. of samples	Positive Cases	Negative Cases
Malignant tumor (Primary)			
Osteosarcoma	11	11	0
MFH	29	27	2
ASPS	3	3	0
Chondrosarcoma	9	9	0
Epithelioid sarcoma	3	3	0
Ewing's sarcoma	6	6	0
Leiomyosarcoma	5	5	0
Liposarcoma	14	14	0
MPNST	3	3	0
Rhabdomyosarcoma	8	8	0
Synovial sarcoma	8	8	0
Malignant tumor			

(Metastasis)				Epithelioid sarcoma	3	0	3
Osteosarcoma	7	7	0	Ewing's sarcoma	3	0	2
(Lung)				Leiomyosarcoma	3	1*	3
MFH (Lung)	2	2	0	a			
Synovial sarcoma	1	1	0	Liposarcoma	4	1*	3
(Lung)				MPNST	3	0	3
Osteosarcoma	1	1	0	Rhabdomyosarcoma	3	0	3
(retroperitoneum)				Synovial sarcoma	3	0	1
Benign tumor				Benign tumor			
Desmoid	5	5	0	Desmoid	1	0	2
GCT of bone	5	5	0	GCT of bone	2	0	3
Hemangioma	4	4	0	Hemangioma	3	0	3
Lipoma	5	5	0	Lipoma	3	0	3
Neurofibroma	4	4	0	Neurofibroma	3	0	3
Schwannoma	5	5	0	Schwannoma	3	0	3
Total	138	136	2	Total	85	3	82

(2) 細胞株における FUS1 蛋白の発現は正常線維芽細胞のほか、5 骨肉腫細胞株 (HOS, MG-63, NOS-1, OST, SaOS-2) と 2 悪性線維性組織球腫細胞株 (NMFH-1, 2) と 1 類上皮肉腫細胞株で弱い発現を認めたが、そのほかでは認められなかった。

(3) 組織における FUS1 蛋白の発現は以下の表の通りであった。わずか 3 例の腫瘍組織にのみ発現を認めたが、そのほかの腫瘍組織では認められなかった。正常組織では末梢神経にのみ発現を認め、そのほかでは発現していなかった。

Histological type	No. of samples	Positive Cases	Negative Cases
Malignant tumor			
Osteosarcoma	11	0	11
(Primary)			
Osteosarcoma	4	0	4
(Lung metastasis)			
MFH	27	1*	26
ASPS	3	0	3
Chondrosarcoma	3	0	3
a			

(4) 骨肉腫を含む間葉系悪性腫瘍細胞に FUS1 遺伝子を導入し、細胞増殖の抑制効果を検討したところ、骨肉腫細胞 SaOS-2 において約 60%の増殖抑制という検討した細胞中で最も高い効果が確認できた。そのほかの細胞でも 40%から 50%程度の増殖抑制効果を認めたが、ユーイング肉腫細胞株 SKNMC と脂肪肉腫細胞株 402-92 ではほとんど効果が認められなかった。

(5) FUS1 遺伝子導入によるアポトーシスの誘導作用について Caspase-3 の発現を検討し、骨肉腫細胞株 NOS-10, SaOS-2, 胞巣状軟部肉腫細胞株 ASPS-KY 等において、Cleaved Caspase の発現が認められた。つまり、FUS1 遺伝子導入により腫瘍細胞のアポトーシスが誘導され、細胞増殖が抑制されたものと考えられた。

(6) 非小細胞肺癌細胞株 H322 をヌードマウス胸腔内へ注射し、肺癌・胸腔内播種モデルを作成し、尾静脈から FUS1 プラスミドベクターを遺伝子導入試薬 Dotap:Cholesterol を用いて静注し、治療実験を行った。治療終了後の平均腫瘍重量は治療を行っていない群では 508.3mg であったが、治療群では 292.5mg

と著明な増大抑制が認められた。摘出した腫瘍の TUNEL 染色により、治療群では腫瘍組織内に広範にアポトーシスが起きていることが確認できた。

以上より、間葉系の組織において、FUS1 RMA は腫瘍組織、正常組織を問わず広範に発現しているが、蛋白は正常の末梢神経組織と骨肉腫を含む一部の腫瘍組織にのみ発現していることが分かった。さらに、培養細胞と、担癌動物モデルを用いた FUS1 遺伝子導入による治療効果の検討では、FUS1 が腫瘍細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが分かった。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Deng WG, Kawashima H, Wu G, et al. Synergistic tumor suppression by coexpression of FUS1 and p53 is associated with down-regulation of murine double minute-2 and activation of the apoptotic protease-activating factor 1-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Research*, 67, 709-17, 2007, 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

① Deng W, Kawashima H, et al. Overcoming gefitinib/erlotinib-induced resistance by tumor suppressor fus1-mediated downregulation of met/akt signaling in human lung cancer. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2008.4.12-16. San Diego

② Deng W, Uno F, Wu G, Kawashima H, et al. Nanoparticle-mediated delivery of therapeutic peptide derived from novel tumor suppressor FUS1 protein for human lung cancer treatment. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2007.4.14-18. Los Angeles

③ Iwamaru A, Deng W, Kawashima H, et al. Interaction of tumor suppressor FUS1 with nuclear receptor tyrosine kinase RAR-alpha proteins enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) to retinoid-mediated therapy. Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2007.4.14-18. Los Angeles

[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

川島 寛之 (KAWASHIMA HIROYUKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30361900

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：