

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16753

研究課題名(和文) 遺伝子制御部位に注目した高悪性度紡錘形細胞肉腫の遺伝子発現解析と新規治療法開発

研究課題名(英文) Gene expression profile and therapeutic targets in high-grade spindle cell sarcomas focusing on the gene regulation system.

研究代表者

赤池 慶祐 (Akaike, Keisuke)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：60801719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CAGE(Cap Analysis of Gene Expression)法を用いて、27例の軟部肉腫における網羅的遺伝子発現プロファイリングを行い、高悪性肉腫群とPleomorphic leiomyosarcoma(PLMS)の間で遺伝子発現の比較を行い、myostatinという遺伝子に着目した。臨床病理検体を用いてmyostatinの免疫染色を行ったところ、高悪性度肉腫ではびまん性の染色を認めたが、PLMSでは全く発現を認めない、あるいは部分的に発現を認めるのみであった。筋原性マーカーとmyostatinの二重染色でもこれら2つのタンパク発現はほぼ相互排他的であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少がんであること、かつ専門とする病理医も少ない分野における軟部肉腫の病理診断において、従来の免疫染色マーカーだけでなく、myostatinの免疫染色も行うことによって、専門性の高い軟部肉腫の病理診断に役立つ可能性が示された。また、遺伝子発現解析の結果からは、多型型平滑筋肉腫は他の高悪性度肉腫とは異なる性格を有する可能性が示唆されたことから、これらの高悪性度肉腫をしっかりと病理組織学的に分類していく必要性があること、さらには腫瘍特異的な治療法の確立が望まれることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pleomorphic leiomyosarcoma (PLMS) is a high-grade sarcoma composed of typical LMS with a dedifferentiated high-grade area. The mechanisms of myogenic differentiation in high-grade sarcomas are unknown. We employed Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) analysis to elucidate the possible gene expression networks that could discriminate PLMS from other high-grade sarcomas. MSTN promoters, encoding myostatin were more activated in high-grade sarcomas that did not show morphological and immunohistochemical smooth muscle differentiation compared to PLMS. Immunohistochemistry showed reduction or loss of myostatin expression encoded by MSTN in PLMS but not in other high-grade sarcomas. Furthermore, immunohistochemical double staining revealed that the expression patterns of myostatin and myogenic markers were almost mutually exclusive in these tumors. These findings suggest that myostatin acts as a regulator of myogenic differentiation in high-grade sarcomas.

研究分野：骨軟部腫瘍病理

キーワード：肉腫 筋原性 平滑筋肉腫 myostatin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

希少がんであること、また専門とする病理医も少ないこともあり、高悪性度肉腫を含む骨軟部肉腫の病理診断はしばしば困難である。現状高悪性度肉腫に分類される未分化肉腫は、形態学的・免疫染色によって特定の分化が確認されないものである。一方、多型型平滑筋肉腫は、通常型の平滑筋肉腫の成分とともに脱分化したような高悪性度の成分を有するものである。多型型平滑筋肉腫は通常型の平滑筋肉腫より悪性度が高いため予後も悪く、未分化肉腫と同程度の予後を示す。臨床的には一見似たようにみえる両腫瘍であるが、これら2つの違い、特に筋原性分化の機構についてはほとんどわかっておらず、遺伝子発現解析の観点からの解析が必要と判断した。

2. 研究の目的

遺伝子発現制御機構(プロモーター解析)を含む網羅的な遺伝子発現解析を行い、多型型平滑筋肉腫と未分化肉腫を含む高悪性度肉腫において形態学的・タンパク質発現による病理組織学的な違いが生じる分子機構を調べる。

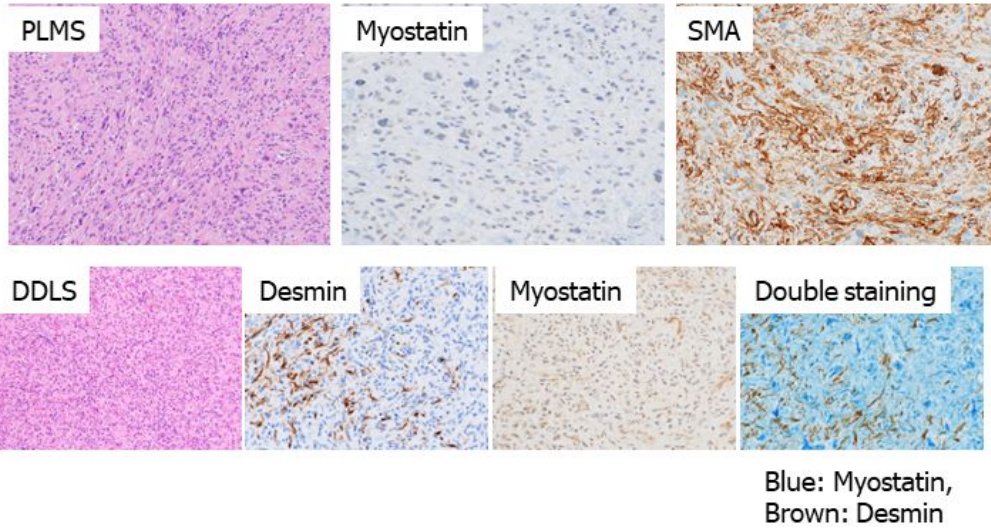
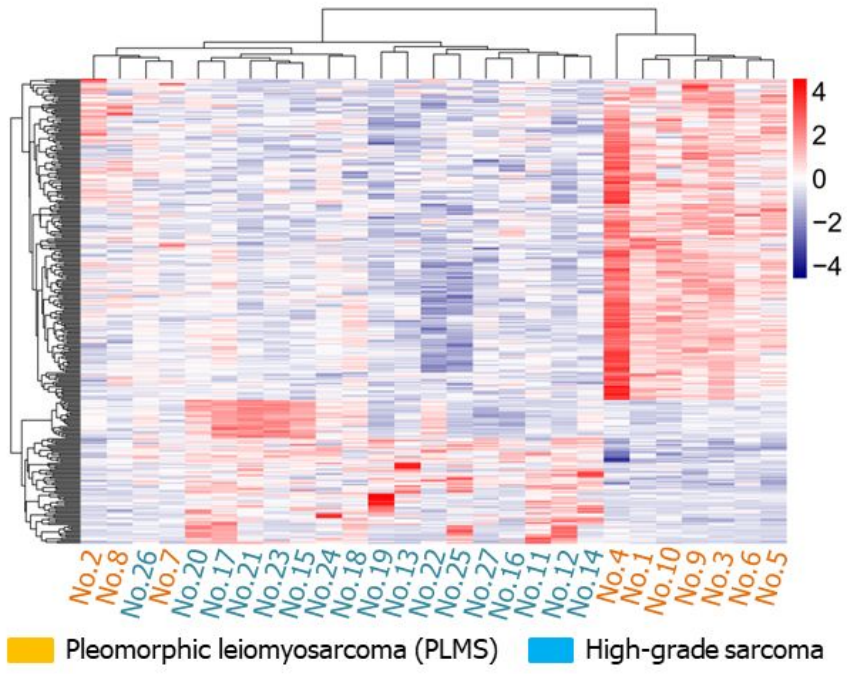
3. 研究の方法

高悪性度肉腫17例(未分化肉腫、高悪性度粘液線維肉腫、脱分化型脂肪肉腫)と多型型平滑筋肉腫10例の凍結検体からRNAを抽出し、Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 解析を行い、多型型平滑筋肉腫と高悪性度肉腫を鑑別できるような遺伝子発現のネットワークを探索した。さらに両群間で発現の異なるもの(differentially expressed genes: DEGs)として抽出された遺伝子の中から *MSTN* にコードされるタンパク質である myostatin の発現に着目し、このタンパク質発現と筋原性マーカーである Desmin, SMA の発現をホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて免疫染色を行い調べた。また、二重染色を行い、myostatin と筋原性マーカーとの発現の分布を調べた。また、DEGs を用いたクラスター解析を行い、多型型平滑筋肉腫と高悪性度肉腫がどのように分類されるかを調べた。

4. 研究成果

CAGE 解析の結果、myostatin をコードする遺伝子である *MSTN* の複数のプロモーターが高悪性度肉腫でより活性化されていることが分かった。304 個の DEGs を用いたクラスター解析では、10 例中 7 例の多型型平滑筋肉腫は独立した集団として分類された。残りの 3 例は他の高悪性度肉腫 1 例と一緒に集団として、高悪性度肉腫の大きな枝のもとに分類された。免疫染色では、多型型平滑筋肉腫では myostatin の発現は減弱あるいは消失していたものの、高悪性度肉腫では強い発現を示した。さらに二重染色では、多型型平滑筋肉腫では筋原性マーカーの発現と myostatin の発現は相互排他性に観察された。以上より、高悪性度肉腫において myostatin は筋原性分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、多型型平滑筋肉腫は遺伝子発現の観点からは他の高悪性度肉腫とは明確に区別されるものが多いことも判明した。

下図：PLMS (pleomorphic leiomyosarcoma : 多型型平滑筋肉腫) , DDLS (dedifferentiated liposarcoma : 脱分化型脂肪肉腫) 。クラスター解析と免疫染色、二重染色。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sano K, Suehara Y, Oguchi A, Sasa K, Hayashi T, Kurihara T, Akaike K, Kim Y, Okubo T, Takagi T, Murakawa Y, Saito T. |
| 2. 発表標題 Comprehensive transcriptome analysis of 5' Cap sites in osteosarcoma. |
| 3. 学会等名 Orthopaedic Reserch Society, 2021 Annual Meeting. (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐野圭、末原義之、小口綾貴子、林大久生、佐々恵太、栗原大聖、赤池慶祐、高木辰哉、金栄智、大久保武人、村川泰裕、齋藤剛 |
| 2. 発表標題 軟部肉腫におけるCAGE法を用いたプロモーターレベルでの網羅的遺伝子発現プロファイリング |
| 3. 学会等名 第53回骨軟部腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sano K, Suehara Y, Hayashi T, Kurihara T, Akaike K, Oguchi A, Takagi T, Kim Y, Okubo T, Murakawa Y, Kaneko K, Saito T. |
| 2. 発表標題 High-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage in spindle cell sarcomas. |
| 3. 学会等名 Connective Tissue Oncology Society, 24th Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐野圭、末原義之、林大久生、村川泰裕、栗原大聖、赤池慶祐、高木辰哉、金栄智、大久保武人、金子和夫、齋藤剛 |
| 2. 発表標題 CAGE法を用いた紡錘形細胞肉腫における網羅的遺伝子発現解析 |
| 3. 学会等名 第52回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐野 圭, 末原 義之, 林 大久生, 村川 泰裕, 栗原 大聖, 赤池 慶祐, 高木 辰哉, 金 栄智, 大久保 武人, 金子 和夫, 齋藤 剛 |
| 2. 発表標題 紡錘形細胞肉腫のCAGE法(cap analysis of gene expression法)を用いた網羅的遺伝子発現解析 |
| 3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|