

平成24年5月24日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390400  
 研究課題名（和文）骨肉腫における年齢や部位別遺伝子異常の検出と機能的ゲノム解析  
 研究課題名（英文） Analysis of Genomic Aberrations in Osteosarcoma: comparison of age and location  
 研究代表者  
 尾崎 敏文（OZAKI TOSHIFUMI）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：40294459

## 研究成果の概要（和文）：

骨肉腫は、原発悪性骨腫瘍の中で最も頻度の多い腫瘍であり、染色体不安定性を多く示し、治療抵抗性の腫瘍も存在する。本研究では、骨肉腫の発生部位・病理組織学的所見の違いおよび臨床経過に影響を及ぼす因子について DNA 構造異常と異常領域の遺伝子について検討した。その中で染色体不安定性を示す領域で腫瘍に関連するゲノム DNA のコピー数の異常が腫瘍化に関与していると考え、アレイ CGH 法を用いて年齢、部位別に検討を行った。体幹発生例より四肢発生例の方で DNA 欠失を多く認めた。また、若年例で染色体異常が多い傾向にあった。若年者と高齢者の生物学的な腫瘍化過程の違いを示す可能性を持つ複数の遺伝子領域を検出した。

## 研究成果の概要（英文）：

Osteosarcoma is the most common primary solid tumor of bone, which can be characterized by a high level of genetic instability and rarely resistant to conventional treatments. This study focused on the chromosome aberrations and the changes of gene expressions influencing on the specific tumor site, the histopathological subtypes, and the prognosis. We hypothesized that the DNA copy number changes in the domain of chromosomal instability may be related to the tumorigenesis of osteosarcoma. The chromosomal instabilities of osteosarcoma were studied using the array CGH method for each age and location. We identified that there were more DNA deletion in extremities patients than in trunk patients. We detected several gene regions which may lead to different biological tumorigenic process between young and elderly patients.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,400,000 | 720,000   | 3,120,000 |
| 2009年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |

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：骨肉腫、アレイ CGH

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨肉腫は 10 歳代に発症することが最も多いが、高齢者にも発症し二峰性の年齢分布を示す。若年発症の骨肉腫は四肢発生が多いのに対して、高齢発症の骨肉腫は骨盤部に発生することが多い。さらに 40 歳以下（若年者）と 40 歳以上（高齢者）で検討しても、40 歳以下四肢発生例では抗癌剤の感受性が高く生命予後も良好であるのに対して、骨盤発生例では感受性が非常に乏しく、生命予後も不良である（図 1）。

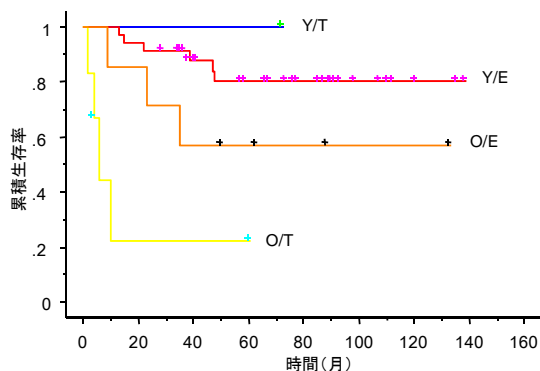


図 1. 骨肉腫の累積生存率

Y/T: 若年・体幹、Y/E: 若年・四肢、O/E: 高齢・四肢、O/T: 高齢・体幹

若年者と高齢者発症の骨肉腫、あるいは四肢と骨盤発生 of 骨肉腫は遺伝子学的に同じものかどうかは骨肉腫症例の治療を担当する者にとって大きな疑問である。近年の発表で、骨肉腫の生存率は組織学的評価に依存しないとの報告があり、最近の大規模ランダムイズドコントロール化試験において、2 種類の異なった薬剤を用いた化学療法のレジメンを行い、用量依存性に病変の組織学的効果 (histologic response) で良好な結果が得られたが、全生存率には関与しないという論文が発表された。高齢者群は若年者群に比較して、低用量の化学療法を行っているが、高率

に副作用を合併している。高齢者に対する化学療法を若年者と同等の用量で行うとどうなるかはまだわかっていない。

(2) 一方、染色体不安定性を示す領域で腫瘍に関連するゲノム DNA のコピー数の異常が、腫瘍化に関与していると考えられている。そこで骨肉腫において発症年齢や発症部位の違いによる腫瘍特性の大きな違いが遺伝子レベルでの相違によるのではないかという仮説を DNA 構造異常、エピジェネティクス、RNA、タンパク発現を段階的に検討することで明らかにしたいと考えた。骨肉腫の若年者と高齢者の病態の違いのメカニズムを解析するため、骨肉腫の染色体不安定性について注目し、アレイ CGH 法を用いて、生物学的な腫瘍化過程の違いを明らかにする。

### 2. 研究の目的

アレイ CGH 法を用いて骨肉腫の染色体不安定性を示す領域を見つけ出し、若年者と高齢者の比較を行うことで、骨肉腫の発生部位・病理組織学的な違いおよび臨床経過に影響を及ぼす因子について明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) DNA 一次構造異常の検出: アレイ CGH を用いて解析を行った。1987年から2006年までに、当施設にて治療を行った約80例の骨肉腫腫瘍を対象とする。四肢発生症例は60例、骨盤発生症例は20例である。そのうち、40歳以上の高齢発症群8例 (44-74歳)、40歳以下の若年発症群8例 (10-25歳) を対象とした。また、四肢発生 (8例)、体幹発生 (8例) に分類し解析を行った。術前化学療法前に採取し、凍結保存している骨肉腫組織からDNAを抽

出し、Agilent社製マイクロアレイCGHで解析を行った。染色体領域のgain, lossについて年齢、部位別に検討を行った。解析はCGH Analytics 3.4ソフトウェアを用いて行った。(2)解析項目:アレイCGHで得られた結果から、DNAコピー数の変化、年齢別、部位別(体幹、四肢)にどの領域の変異が見られるか検討した。また、各変異とその領域に存在するmicroRNAについて検討した。

#### 4. 研究成果

(1) DNA一次構造異常の検出:アレイCGH法を用いて骨肉腫の染色体不安定性を示す領域を見出し、さらに、性別、年齢、部位別に検討を行い、若年者と高齢者の生物学的な腫瘍化過程の違いを示す可能性を持つ複数の遺伝子領域を見出した。各アレイで検出されたaberration領域の平均個数は、若年・四肢群(Y/E):165.5、若年・体幹群(Y/T):44、高齢・四肢群(O/E):63.75、高齢・体幹群(O/T)64.75であった。(表1)四肢発症例では、若年者の方が高齢者よりaberration領域を多く認めた。また若年発症例においては体幹症例でaberration領域が四肢症例より少なかった。これらの遺伝子変異のgain, lossについて検討した結果、体幹発症例より四肢発症例の方でloss領域を多く認めた。また、若年例でaberrationが多い傾向にあった。全群にわたってgainを認めたのは6p12-23、4q13など、lossの領域は4q28、13q31などであった。これらの結果は今までに報告された骨肉腫の染色体変異と同様であった。部位別では、四肢群でgain: 21q, 8q, loss: 12q14, 8pを認め、体幹群ではgain: 12q13, 20p12, 13q13, loss: 4q28などを認めた。表2に年齢・部位別の発現差が(gain>2, loss<1) 50%以上の症例で出現したaberration領域を示す。

表1. 年齢・部位別におけるaberration領域

| 各アレイで検出されたAberration領域の数    |  |
|-----------------------------|--|
| A1-1OT_control sample =38   |  |
| A2-2OT_control sample =74   |  |
| A3-3OT_control sample =133  |  |
| A4-4OT_control sample =14   |  |
| A5-1YT_control sample =8    |  |
| A6-2YT_control sample =68   |  |
| A7-3YT_control sample =68   |  |
| A8-4YT_control sample =32   |  |
| A9-1YE_control sample =153  |  |
| A10-2YE_control sample =296 |  |
| A11-3YE_control sample =167 |  |
| A12-4YE_control sample =46  |  |
| A13-1OE_control sample =130 |  |
| A14-2OE_control sample =7   |  |
| A15-3OE_control sample =51  |  |
| A16-4OE_control sample =67  |  |

(2) DNAのgain, loss領域に存在するmicroRNAについて検討したところ、DNAコピー数の増加領域に比べloss領域に存在するmicroRNAが多いことがわかった(表3)。それらのloss領域を詳細に解析することで骨肉腫におけるDNAの欠失とmicroRNAの関与を検討可能である。

表2. 年齢・部位別における頻度の多いaberration領域

|     | Chr   | Cytoband        | Amplificatio | Deletion | pval      | Gene Names     |
|-----|-------|-----------------|--------------|----------|-----------|----------------|
| Y/E | chr1  | p36.22          | 0            | -0.47    | 1.12E-13  | CLSTN1         |
|     | chr5  | q31.1           | 0            | -0.40    | 1.10E-31  | CDKL3, UBE2B   |
|     | chr6  | q24.3           | 0            | -0.88    | 0         | EPN2A, FBXO3   |
|     | chr10 | q21.3 - q22.1   | 0            | -0.71    | 3.76E-16  | DNAJC12, SIRT  |
|     | chr10 | q23.32 - q23.33 | 0            | -0.72    | 1.28E-11  | CPFB3, MARCH   |
|     | chr16 | q11.2 - q13     | 0            | -0.38    | 0         | ANKRD26P1, SH  |
| O/E | chr10 | p15.3           | 0.47         | 0        | 3.96E-117 | ZMYND11, DIP2  |
|     | chr12 | p13.31          | 0            | -1.16    | 1.45E-15  |                |
| Y/T | chr1  | p31.1           | 1.28         | 0        | 2.11E-13  |                |
|     | chr1  | q25.3           | 0            | -0.73    | 7.61E-73  | RGSL1, RNASEL  |
|     | chr12 | p13.31          | 0            | -1.01    | 1.27E-22  |                |
|     | chr15 | q11.1 - q11.2   | 0.63         | 0        | 3.47E-90  | GOLGA6L6, GO   |
|     | chr1  | p31.1           | 0            | -2.86    | 1.14E-15  |                |
| O/T | chr1  | q31.3           | 0            | -0.86    | 4.52E-11  | CFHR3, CFHR1   |
|     | chr4  | q13.2           | 1.24         | 0        | 1.88E-34  | UGT2B17, UGT   |
|     | chr6  | p22.1           | 1.24         | 0        | 1.50E-12  | HLA-H, HGG2P   |
|     | chr8  | q24.11          | 2.11         | 0        | 1.06E-247 | SLC30A8        |
|     | chr8  | q24.13          | 2.77         | 0        | 2.32E-25  | FBXO32, KLHL3  |
|     | chr8  | q24.23 - q24.3  | 1.35         | 0        | 2.38E-227 | COL22A1, KGN   |
|     | chr11 | p13             | 0.78         | 0        | 3.37E-36  | RCN1, WT1, WT  |
|     | chr11 | q22.3 - q23.1   | 0            | -0.64    | 1.04E-46  | GRIN4, KIAA182 |
|     | chr12 | p13.31          | 0.87         | 0        | 3.17E-23  |                |

表3. Aberration領域内のmiRNA gene

|     | Aberration領域内のmiRNA gene |                    |
|-----|--------------------------|--------------------|
|     | Copy number gains        | Copy number losses |
| Y/E | 0                        | 35                 |
| O/E | 0                        | 17                 |
| Y/T | 2                        | 5                  |
| O/T | 16                       | 18                 |

これらの結果から、四肢発生例と体幹発生例で予後が異なる原因として、染色体変異領域の相違の関連の可能性が考えられた。

#### 倫理面への配慮

本研究は、すべて、文部科学省、厚生労働省および経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って行った。事前の十分な説明と自由意思による同意に基づいた研究を行った。個人情報 は徹底して保護した。また、本研究に開始に関しては、事前に当大学の倫理委員会により審査及び承認を得ることで研究の適正性を確保する。関連学会での指針等を参考にして、倫理指針の趣旨を踏まえた適切な対応を行った。

#### 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 10 件) 全て査読有

- ① Numoto K, Yoshida A, Sugihara S, Kunisada T, Ozaki T. (他 5 名、10 番目) Frequent methylation of RASSF1A in synovial sarcoma and the anti-tumor effects of 5-aza-2'-deoxycytidine against synovial sarcoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136(1):17-25
- ② Saiga K, Furumatsu T, Yoshida A, Masuda S, Takihira S, Abe N, Ozaki T. Combined use of bFGF and GDF-5 enhances the healing of medial collateral ligament injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 12; 402(2):329-34.
- ③ Nakahara H, Misawa H, Yoshida A, Hayashi T, Tanaka M, Furumatsu T, Tanaka N, Kobayashi N, Ozaki T. Bone repair using a hybrid scaffold of self-assembling peptide PuraMatrix and polyetheretherketone cage in rats. *Cell Transplant*. 2010;19(6):791-7.
- ④ Furumatsu T, Ozaki T. (他 4 名、6 番目) Anterior cruciate ligament-derived cells have high chondrogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;1;391(1):1142-7.
- ⑤ Date H, Furumatsu T, Sakoma Y, Yoshida A, Hayashi Y, Abe N, Ozaki T. GDF-5/7 and bFGF activate integrin alpha2-mediated cellular migration in rabbit ligament fibroblasts. *J Orthop Res*. 2010;28(2):225-31.
- ⑥ Ito T, Furumatsu T, Ozaki T (他 10 名、10 番目). Arginine methyltransferase CARM1/PRMT4 regulates endochondral ossification. *BMC Dev Biol*. 2009; 2;9:47
- ⑦ Nakahara H, Misawa H, Ozaki T (他 17 名、19 番目). Bone repair by transplantation of hTERT-immortalized human mesenchymal stem cells in mice. *Transplantation*. 2009;15;88(3):346-53.
- ⑧ Kikuchi T, Asaumi K, Ozaki T (他 7 名、9 番目). Promotion of bone regeneration by CCN2 incorporated into gelatin hydrogel. *Tissue Eng Part A*. 2008;14 (6):1089-98.
- ⑨ Doi H, Nishida K, Ozaki T (他 7 名、10 番目). Interleukin-4 downregulates the cyclic tensile stress-induced matrix metalloproteinases-13 and cathepsin B expression by rat normal chondrocytes. *Acta Med Okayama*. 2008; 62(2):119-26.

- ⑩ Manabe H, Nasu Y, Ozaki T (他7名, 8番目). Inhibition of histone deacetylase down-regulates the expression of hypoxia-induced vascular endothelial growth factor by rheumatoid synovial fibroblasts. *Inflamm Res.* 2008; 57(1):4-10.

[学会発表] (計3件)

- ① 尾崎 敏文, 小児の悪性骨・軟部腫瘍と鑑別を要する腫瘍類似疾患、第43回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2010.7.15-16, 東京都
- ② 尾崎敏文, 骨盤部悪性腫瘍の治療、第119回西日本整形・災害外科学会、2010/6/6、福岡市
- ③ 尾崎敏文, 悪性骨腫瘍切除後の再建手術、第59回東日本整形災害外科学会学術集会、2010.9.18、盛岡市

[図書] (計2件)

- ① 尾崎 敏文, 患者さんといっしょに読める整形外科病態生理32はじめてのマニュアル, メディカ出版, 2011
- ② 尾崎 敏文, 今日の整形外科治療指針第6版. 軟部腫瘍の手術療法, 医学書院 p201, 2010

[その他]

ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/orthop/japanese/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎 敏文 (OZAKI TOSHIFUMI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 40294459

### (2) 研究分担者

国定 俊之 (KUNISADA TOSHIYUKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 80346428

杉原 進介 (SUGIHARA SHINSUKE)

独立行政法人国立病院機構・四国がんセンター臨床研究部・医長  
研究者番号: 60314671

森本 裕樹 (MORIMOTO YUKI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号: 00452574  
(H21年度～H22年度)

### (3) 連携研究者