

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390296

研究課題名(和文) 網羅的発現解析を基盤にした新規骨・軟部腫瘍バイオマーカーの探索と治療への応用

研究課題名(英文) Search for novel biomarkers and therapeutic targets of malignant bone and soft tissue tumors/sarcomas using the methods of global expression analysis

研究代表者

川井 章 (KAWAI, AKIRA)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：90252965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、悪性骨軟部腫瘍(肉腫)の化学療法感受性、浸潤能、遠隔転移能等を規定している因子を網羅的遺伝子・タンパク質発現解析の手法を用いて明らかにする事、さらにこれらをマーカーとした個別化医療、新たな治療法の可能性を探ることを目的とした。骨肉腫の新たな化学療法感受性マーカーとしてperoxiredoxin-2、肺転移予測因子としてargininosuccinate synthetase、microRNA-143を同定し、microRNA-133aの発現抑制によって骨肉腫の浸潤能、肺転移形成が抑制されることを見出した。その他GISTの予後予測マーカーとしてp16、DDX39の開発を行なった。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we tried to identify novel factors determining the biological characteristics (chemosensitivity, invasiveness and development of metastasis) of malignant bone and soft tissue tumors (sarcomas). For osteosarcoma, we found peroxiredoxin-2 as a novel chemotherapy responsiveness marker and argininosuccinate synthetase and microRNA-143 as pulmonary metastasis predictive markers. Silencing of microRNA-133a with locked nucleic acid (LNA) reduced cell invasion of highly malignant CD133 (high) population of osteosarcoma cells, and systemic administration of the LNA along with chemotherapy suppressed lung metastasis and prolonged the survival of osteosarcoma-bearing mice.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：骨軟部腫瘍 肉腫 骨肉腫 バイオマーカー 遺伝子 microRNA タンパク質 がん幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍(肉腫)の治療成績は、集学的治療の導入により改善されてきたが、化学療法不応例、遠隔転移発症例の予後は依然不良であり、更なる治療成績向上のためには、これらの予後不良症例を早期に同定し、より強力・有効な治療を行なうこと、あるいは新たな観点からの治療開発を行なうことが重要である。

研究開発当初、悪性腫瘍における治療抵抗性の一因として「がん幹細胞」様細胞の存在が示唆され、その分画の制御に様々な microRNA が関与していることが明らかにされた。

網羅的遺伝子・タンパク質発現解析は、これまでに明らかになっていない未知のバイオマーカー、治療標的の同定に極めて有用な手法であるが、我々が独自に開発した蛍光二次元電気泳動法(2D-DIGE)はタンパク質の網羅的解析法として世界トップレベルの網羅性と再現性を有している。また、われわれの研究室では、in vitro の解析から蛍光ルミネセンスを用いた in vivo における腫瘍増殖の評価まで可能なシステムを確立しており、国内トップクラスの骨軟部腫瘍(肉腫) high-volume center である国立がん研究センター中央病院から得られる臨床検体・臨床情報とも合わせ、肉腫における新たなバイオマーカーの開発、新規治療標的の同定と開発のための環境が整備されつつあった。

### 2. 研究の目的

本研究は、悪性骨軟部腫瘍/肉腫における治療成績向上の要である化学療法感受性・抵抗性、浸潤能、遠隔転移能等に関して、これらを規定している遺伝子・タンパク質を網羅的遺伝子・タンパク質発現解析の手法を用いて明らかにすること、さらに、これらをマーカーとした個別化医療、分子標的とした新たな治療法の可能性を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、原則として解析の出発材料として培養細胞など特殊な環境下の検体ではなく、実際の生体(患者)内の状態を最もよく反映していると考えられる悪性骨軟部腫瘍/肉腫の生検あるいは手術時に採取された新鮮凍結組織を用いた。具体的には、国立がん研究センターバイオバンクに登録・保存されている悪性骨軟部腫瘍凍結組織を使用した。網羅的遺伝子発現解析は GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix 社)を用い、遺伝子発現量のバリデーションは定量的 RT-PCR 等により行なった。microRNA の網羅的解析は miRNA microarray ID 021827 (Agilent Technologies)を用いて行った。網羅的タンパク質発現解析は、蛍光二次元電気泳動、質量分析を用いて研究所創薬プロテオーム研究分野にて行った。データマイニング(T-test, ANOVA, クラスタリング、主成

分分析等)の手法を用いて臨床的特徴と関連する遺伝子・タンパク質(群)の探索を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨肉腫

化学療法感受性マーカー peroxiredoxin-2 (PRDX2)

骨肉腫 12 例の生検標本よりタンパク質を抽出、術前化学療法奏効例(6 例)と非奏効例(6 例)の間で認められるタンパク質発現の差を蛍光 2 次元電気泳動で解析し、全 2250 タンパク質スポットより発現差の認められる 55 スポットを同定した。質量分析により、この 55 スポットは 38 遺伝子産物であることが示された。その中で peroxiredoxin-2 (PRDX2) に注目し、さらに解析を行った。PRDX2 に対する特異抗体を用いた Western blotting により、骨肉腫に対する化学療法奏効例 (PRDX2 低発現) と非奏効例 (PRDX2 高発現) は明瞭に区別することが可能であり、これは validation sample を用いた検証実験でも確認された。PRDX2 は骨肉腫術前化学療法の新たな効果予測因子として有用と考えられた。

肺転移予測因子 argininosuccinate synthetase (ASS)

骨肉腫 20 例の生検標本より RNA を抽出、肺転移早期出現例(7 例)と非出現例(12 例)の間で認められる遺伝子発現の差を GeneChip U133plus2.0 を用いて解析した。両群間で 102 遺伝子の発現に有意差が認められた。肺転移出現例において発現上昇を認めたもの 7 遺伝子、発現低下を認めたもの 95 遺伝子であった。argininosuccinate synthetase (ASS) 発現は肺転移出現例で著明に低下しており、骨肉腫 62 例を用いた ASS 特異抗体による免疫染色では、ASS 低発現例の予後は有意に不良であった。

肺転移予測因子 microRNA-143 (miRNA-143) miRNA-143 は骨肉腫肺転移例において有意に低下しており、これは MMP-13 を介して骨肉腫細胞の浸潤能に影響を与えることによるものと考えられた。また、miRNA の強制発現によって骨肉腫肺転移巣の形成は有意に抑制された。

“骨肉腫幹細胞”を制御する microRNA133a 骨肉腫における治療抵抗性の一因である「がん幹細胞」に相当する細胞集団を同定し、その分画を制御する microRNA を網羅的発現解析から特定した。網羅的解析から特定された microRNA1, 10, 133a の 3 種類の microRNA から、microRNA133a に特化した研究を展開し、LNA による発現抑制が in vitro の骨肉腫細胞の浸潤能及び in vivo の動物移植モデルでの肺転移をとともに抑制する効果を見いだした。

#### (2) GIST

我々が見出した GIST の新たな予後予測マーカー・フェチンの臨床的有用性を多数の他施設手術検体を用いて検証を進めるとともに、

網羅的タンパク質発現解析 (2D-DIGE) の手法を用いて、GISTにおける新たな予後予測マーカーとして ATP-dependent RNA helicase DDX39 を同定した。DDX39 高発現の GST はそうでないものに比べて有意に予後不良であった。

#### 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 21 件)

Kondo T.

Inconvenient truth: Cancer biomarker development by using proteomics.

Biochim Biophys Acta. 2014 May;1844(5):861-865. 査読有 doi:10.1016/j.bbapap.2013.07.009.

Kondo T.

Casting doubt on the traditional approach of cancer biomarker discovery through proteomics.

Expert Rev Proteomics. 2014;11(1):9-12. 査読有 doi: 10.1586/14789450.2014.871496

Fujiwara T, Kawai A, Ochiya T.

Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells.

STEM CELLS, 2(4): 959-973, 2014 査読有 doi: 10.1002/stem.1618

Fujiwara T, Kawai A, Ochiya T.

Circulating microRNAs in sarcoma: potential biomarkers for diagnosis and targets for therapy.

Chemotherapy, 3:2014

査読有 doi: 10.1007/s10585-012-9502-4

Trautmann M, Kawai A

SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma.

Oncogene 1-11, 2013

査読有 doi: 10.1038/onc.2013.443

Kikuta K, Kawai A.

An analysis of factors related to recurrence of myxofibrosarcoma.

Jpn J Clin Oncol ;43(11):1093-104, 2013 査読有 doi: 10.1093/jjco/hyt119

Yoshitaka T, Kawai A.

Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma.

J Orthop Res ;31(12):1992-1998 2013

査読有 doi: 10.1002/jor.22457

Kubota D, Kawai A, Kondo T.

Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma.

J Proteomics ;91:393-404, 2013

査読有 doi: 10.1016/j.jprot.2013.07.022

Kondo T, Kawai A.

Proteomic approach toward personalized sarcoma treatment: lessons from prognostic biomarker discovery in gastrointestinal stromal tumor.

Proteomics Clin Appl ;7(1-2):70-78, 2013 査読有 doi: 10.1002/prca.201200085

Kikuta K, Kawai A, Kondo T.

Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor.

Journal of Proteomics 75: 1089-1098, 2012 査読有 doi: 10.1016/j.jprot.2011.10.005

Kubota D, Kawai A, Kondo T.

Validation study on Pfetin and ATP-dependent RNA helicase DDX39 as prognostic biomarkers in gastrointestinal stromal tumour.

Jpn J Clin Oncol 42: 730-741, 2012

査読有 doi: 10.1093/jjco/hys092

Kondo T, Kawai A.

Application of Proteomics to Soft Tissue Sarcomas.

International Journal of Proteomics 42 (8):730-741

査読有 doi: 10.1155/2012/876401

Ogura K, Kawai A.

Extraskeletal myxoid chondrosarcoma: a review of 23 patients treated at a single referral center with long-term follow-up. Arch Orthop Trauma Surg 132: 1379-1386, 2012

査読有 doi:10.1007/s00402-012-1557-9

Suehara Y, Kawai A, Kondo T.

Secernin-1 as a novel prognostic biomarker candidate of synovial sarcoma revealed by proteomics.

Journal of Proteomics 74: 829-842, 2011. 査読有 doi: 10.1016/j.jprot.2011.02.033

Ogura K, Kawai A.

A retroperitoneal mass, systemic lymphadenopathy, and pulmonary nodules in a pregnant woman.

Skeletal Radiol 40: 631-632, 657-658, 2011 査読有 doi: 10.1007/s00256-010-1091-1

Osaki M, Kawai A, Ochiya T.

MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression.

Molecular Therapy 19: 1123-1130, 2011.

査読有 doi: 10.1038/mt.2011.53

Kubota D, Kawai A, Kondo T.

Pfetin as a prognostic biomarker for gastrointestinal stromal tumor: validation study in multiple clinical facilities.

Jpn J Clin Oncol.2011Oct;41(10):1194-1202.

査読有 doi: 10.1093/jjco/hyr121

Kawai A, Kondo T.  
Peroxiredoxin 2as a chemotherapy  
responsiveness biomarker candidate in  
osteosarcoma revealed by proteomics.  
Proteomics Clin Appl 4: 560-567, 2010  
査読有 doi: 10.1002/prca.200900172.  
Oshima K, Kawai A.  
A Case of Proximal Tibial Osteosarcoma.  
Jpn J Clin Oncol 40: 278, 2010  
査読有 doi: 10.1093/jjco/hyq013.  
Kobayashi E, Kawai A.  
Reduced Argininosuccinate Synthetase is a  
Predictive Biomarker for the Development  
of Pulmonary Metastasis in Patients with  
Osteosarcoma.  
Mol Cancer Ther 9: 535-544, 2010  
査読有 doi: 10.1158/1535-7163  
②Itami J, Kawai A.  
High-dose rate brachytherapy alone in  
postoperative soft tissue sarcomas with  
close or positive margins.  
Brachytherapy 9: 349-353, 2010  
査読有 doi: 10.1016/j.brachy.2009.07.012

〔学会発表〕(計 16 件)

川井 章「悪性骨・軟部腫瘍に対する新規  
治療薬の現状と展望」  
第 86 回日本整形外科学会学術総会 2013.5  
広島  
川井 章「再発あるいは治療抵抗性の  
c-kit あるいは PDGFR 陽性肉腫に対するイマ  
チニブの第 相試験に、至る経過とその顛  
末」  
第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2013.8 仙  
台  
川井 章「小児の骨・軟部腫瘍に対する外  
科的治療とその課題」  
第 55 階日本小児血液・がん学会学術集会  
2013.11 福岡

Kawai A, Ogura K,  
Soft tissue sarcoma in the real world: data  
of a high-volume cancer center in japan  
bone and soft tissue tumor registry  
ISOLS September, 2013 ITAL

Kondo T, Proteomic study of open biopsy  
samples identified peroxiredoxin 2 as a  
predictive biomarker of response to  
induction chemotherapy in osteosarcoma  
Annual Meeting of Connective Tissue  
Oncology Society NY

近藤格「プロテオーム解析を用いた肉腫の  
バイオマーカー開発」第 26 回京都がん研究  
会、京都

Kondo T, Cancer proteomics for biomarker  
development toward personalized medicine  
Annual Meeting of Proteomics Forum  
Berlin

落谷孝広「遺伝子導入技術に基づく分子イ  
メージング」第 29 回 日本 DDS 学会学術集

会 2013.7 京都

Ochiya, T. Exosomes as a Novel Diagnostic  
and Therapeutic Tool for Cancer.

World CTC, April Berlin Deutschland.

落谷孝広「分子がん転移研究の新たな潮  
流：エクソソームによる前転移ニッセの実  
態解明」第 22 回 日本がん転移学会学術集  
会・総会 2013.7 長野

落谷孝広「骨肉腫の肺前転移ニッセ形成  
における腫瘍由来エクソソームの役割の解  
明」

第 5 回 日本 RNAi 研究会 2013.8 広島

Kondo T, Cancer proteomics for biomarker  
development toward personalized  
medicine Annual Meeting of Human Proteome  
Organization Boston

近藤格「バイオマーカー開発の最前線」第  
10 回日本プロテオーム学会年会 2012.7 横  
浜

Kondo T, Proteomic approach towards  
biomarker discovery for early  
intra-hepatic recurrence in  
hepatocellular carcinoma.

Annual Meeting of European Proteome  
Association Scotland

落谷孝広「microRNA による抗がん剤抵抗性  
の制御とがん幹細胞治療」

第 55 回日本放射線影響学会 2012.9 仙台

近藤格「プロテオーム解析による個別化医  
療のためのバイオマーカー開発」

第 58 回日本臨床検査医学学術集会 2011.11  
岡山

Kondo T, Proteomic study of malignant  
pleural mesothelioma by laser  
microdissection and two-dimensional  
difference gel electrophoresis: cathepsin  
D as a novel candidate for a differential  
diagnosis biomaker

Annual Meeting of Connective Tissue  
Oncology Society France

Kondo T, Solid-phase hexapeptide ligand  
library with liquid chromatography and  
two-dimensional difference gel  
electrophoresis for intact plasma  
prteomics

Annual Meeting of Human Proteome  
Organization Switzerland

近藤格「プロテオーム解析によるがん個別  
化医療のためのバイオマーカー開発」

第 9 回日本プロテオーム学会総会 2012.9 新  
潟

落谷孝広「microRNA による抗がん剤抵抗性  
の制御とがん幹細胞治療」

第 55 回日本放射線影響学会 2012.9 仙台

②川井 章「軟部肉腫の進行期と治療方針・  
予後」

第 100 回日本病理学会 2011.4 横浜市

②川井 章「高齢者の骨軟部腫瘍」

第 116 回中部日本整形災害外科学会 2011.4

高知市

②③Kawai A, Chemotherapy of Osteosarcoma. Korea Cancer Association 2011.6. Seoul

②④Kawai A, Rectus Abdominis Myocutaneous Flap in Surgeries for Malignant Pelvic Bone Tumors.

International Limb Salvage Symposium 2011.9. Beijing

②⑤落谷孝広, Roles of non-coding RNAs in cancer development (including miRNAs) 第70回日本癌学会学術総会 2011.10 名古屋

〔図書〕(計 4 件)

近藤格「骨軟部腫瘍のプロテオーム解析」先端医療シリーズ4 4 臨床医のための最新整形外科 寺田国際事務所・先端医療技術研究所 2013: 12-15

近藤格「プロテオーム解析」新臨床腫瘍学がん薬物療法専門医のために南江堂 2012

Kawai A, Ochiya T etc.

Cancer stem cells of sarcoma.

Kawai A, Ochiya T etc

Role of cancer stem cells in cancer biology and therapy. USA, CRC Press

〔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

川井 章 (KAWAI, Akira)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号: 90252965

### (2) 研究分担者

近藤 格 (KONDO, Tadashi)

独立行政法人国立がん研究センター研究所・創薬プロテオーム研究分野・分野長

研究者番号: 30284061

### (3) 連携研究者

市川 仁 (ICHIKAWA, Hitoshi)

独立行政法人早期・探索臨床研究センター・ユニット長

研究者番号: 30201924

### (4) 連携研究者

落谷 孝広 (OCHIYA, Takahiro)

独立行政法人国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・分野長

研究者番号: 60192530

### (5) 連携研究者

細野 亜古 (HOSONO, Ako)

国立がん研究センター・東病院・医長

研究者番号: 00602947