

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390329

研究課題名（和文） 難治性横紋筋肉腫の病態に基づいた新規診断・治療法の開発

研究課題名（英文） The development of novel diagnostics and treatment for refractory rhabdomyosarcoma.

研究代表者

細井 創（HAJIME HOSOI）

京都府立医科大学・大学院医学研究科・小児発達医学・教授

研究者番号：20238744

研究成果の概要（和文）：

現在、横紋筋肉腫に血清や体液で測定可能な腫瘍マーカーは存在しない。我々は、横紋筋肉腫患児の血清中のmiR-206の発現レベルは、他の小児がん患児に比べて高く、感度1.0、特異度0.913と高い診断精度を示し、新規腫瘍マーカーになりうることを明らかにした。

また、我々は、胎児型横紋筋肉腫自験例に認めたキメラ遺伝子PAX3-NCOA2と、胞巣型横紋筋肉腫に認めるキメラ遺伝子PAX3-FKHRをマウス筋芽細胞に強制発現させ、発現アレイを用いて比較したところ、両遺伝子に共通して発現の上昇しているRPS6KA1遺伝子を同定した。我々は、今後、RPS6KA1阻害剤を用いて抗腫瘍効果の確認を行う。

研究成果の概要（英文）：

Presently, there is no body fluid biomarker of rhabdomyosarcoma (RMS). The normalized serum *miR-206* expression level could be used to differentiate between RMS and non-RMS tumors, with a sensitivity of 1.0 and a specificity of 0.913. Serum *miR-206* expression level can be a novel serum biomarker of RMS.

We identified a PAX3-NCOA2 fusion gene in a case of embryonal rhabdomyosarcoma. To understand the role of this translocation in RMS tumorigenesis, we established two types of stable mouse myoblast C2C12 cell lines expressing PAX3-NCOA2 and PAX3-FKHR, respectively. Expression array analysis revealed that RPS6KA1 was commonly upregulated in both cell lines. We are going to validate RPS6KA inhibitor as a novel treatment for rhabdomyosarcoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	3,200,000円	960,000円	4,160,000円
平成23年度	2,700,000円	810,000円	3,510,000円
平成24年度	3,200,000円	960,000円	4,160,000円
年度			
年度			
総計	9,100,000円	2,730,000円	11,830,000円

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、microRNA、分子標的療法、腫瘍マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

小児で最も頻度の高い悪性軟部腫瘍である横紋筋肉腫の治療成績は、1970年代から米国を中心に行われてきた大規模共同臨床研究の成果と集学的治療の進歩により飛躍的に改善したが、現在も初診時すでに遠隔転移のある進行例や、2大組織亜型の一つである胞巣型、とくに特徴的キメラ遺伝子 *PAX3-FKHR* を発現するハイリスク例の予後は極めて不良のままである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで我々が行ってきた横紋筋肉腫の診断と病態解明のための基礎研究を、特に上記難治例の治療のための新規診断・治療法の開発に、統合・発展させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

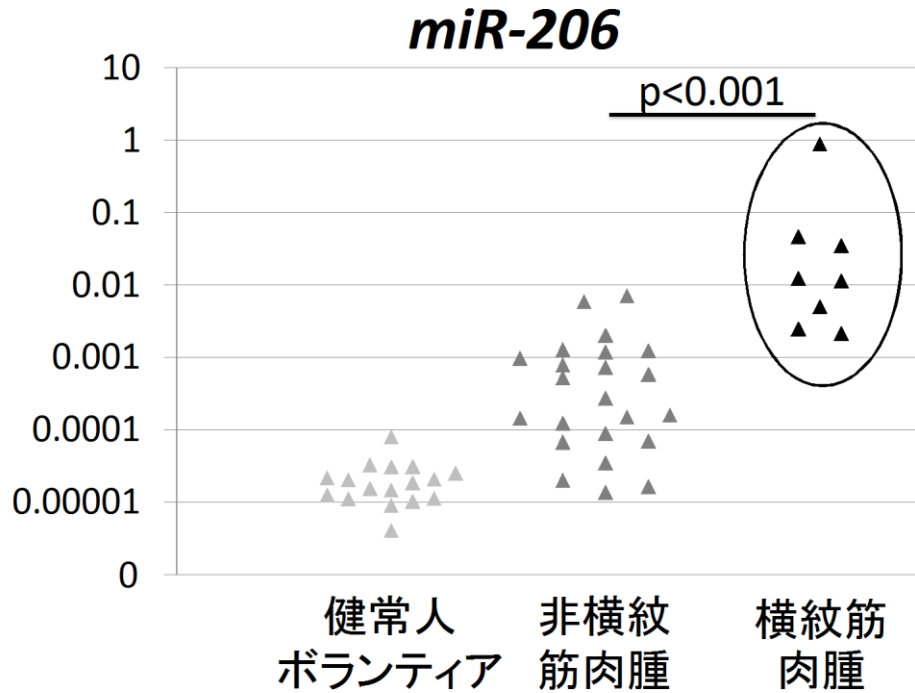
新規診断法については、我々の研究室で、すでに確立し、特許を取得しているバイオマーカー診断法である神経芽腫患者の血清中遊離 DNA 診断の技術を応用して、血清中遊離 microRNA の抽出法と PCR による検出の確立を行った。新規分子標的治療については、*PAX3* (P3WT)、*PAX3-NCOA2* (P3N2)、*PAX3-FKHR* (P3F) 遺伝子を、MSCV レトロウイルス発現系を用いてマウス筋芽細胞 (C2C12) に導入し、それぞれの安定発現細胞株を樹立し、発現アレイを用いて、各細胞株間の発現の差異を解析した。

### 4. 研究成果

血清中の筋特異的 microRNA の発現は、非横紋筋肉腫小児がん症例や健常人に比して、横紋筋肉腫症例において有意に増加していた (図 1)。特に miR-206 は、ROC 曲線下面積 0.967 (95% confidence interval, 0.912 to 1.000)、感度 1.0、特異度 0.913 (カットオフ値  $2.1 \times 10^3$ ) と高い診断精度を示した。治療前後のペア血清が得られている横紋筋肉腫 4 例では治療後に筋特異的 microRNA の発現の低下を認めた。腫瘍と血清の双方を検討できた横紋筋肉腫 6 例、非横紋筋肉腫 8 例では、腫瘍と血清の筋特異的 microRNA の発現に有意な相関を認めた ( $p < 0.05$ )。

横紋筋肉腫症例の脳脊髄液、胸水での miR-206 の発現は、体腔液 1  $\mu$ l 当たり、それぞれ 2529 コピー、36370 コピーで、非横紋筋肉腫症例の体腔液での発現の平均 13.3 コピーに比べて増加していた。中枢神経転移再発をきたし、放射線照射により寛解し、その後再々発をきたした横紋筋肉腫症例では、miR-206 の発現は、脳脊髄液 1  $\mu$ l 当たり、2529 コピー(再発時)、0 コピー(寛解時)、128 コピー(再々発時)と病勢に応じた変化を認めた。

図1



また、発現アレイの解析では、P3N2、P3F 発現株において、RAS-MAPK 経路の下流に位置する Rps6ka1 (Rsk1) の発現の増加を認めた。P3N2、P3F 発現株では、Rsk 阻害剤である BI-D1870 添加により、増殖能、分化阻害能、移動能のいずれも低下を認めた。RPS6KA1 は、融合遺伝子陽性横紋筋肉腫の発生に強く関与し、新規治療標的となる可能性が示唆された。

#### 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 5 件)

1. Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Sep 10;400(1):89-93. (査

読あり)

2. Yagy S, Iehara T, Tsuchiya K, Hosoi H, et al. Preoperative analysis of 11q loss using circulating tumor-released DNA in serum: a novel diagnostic tool for therapy stratification of neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2011 Oct 28;309(2):185-9. (査読あり)
3. Katsumi Y, Iehara T, Tsuchiya K, Hosoi H, et al. Sensitivity of malignant rhabdoid tumor cell lines to PD 0332991 is inversely correlated with p16 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Sep 16;413(1):62-8. (査読あり)
4. Yoshida H, Hosoi H, et al. Post-transcriptional modulation of

C/EBP $\alpha$  prompts monocytic differentiation and apoptosis in acute myelomonocytic leukaemia cells. Leuk Res. 2012 Jun;36(6):735-41. (査読あり)

5. Fujiki A, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Quantitative RT-PCR analysis of the MOZ-CBP fusion transcript in therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13). J Pediatr Hematol Oncol. 2012 Jul;34(5):402-5. (査読あり)

[学会発表] (計7件)

1. Hosoi H. miRNAs as serum biomarkers for RMS. 2012 Fall Children's Oncology Group meeting. Soft tissue sarcoma committee. Biology session. 2012年9月12; Atlanta. U.S.A.
2. Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Validation of serum mir-206 expression level as a diagnostic biomarker for rhabdomyosarcoma: a report of the Children's Oncology Group study ARST12B1. 44th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. 2012. 10. 5-8.; London, United Kingdom.
3. Miyachi M, Yoshida H, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Dual role of *PAX3-NCOA2* in tumorigenesis of rhabdomyosarcoma. 102<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 2011. 4. 2-6; Orlando, U.S.A.

4. 坂本謙一, 宮地 充, 大内一孝, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創. p90 ribosomal S6 kinase 1 は横紋筋肉腫における新規分子標的となり得る. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月30日~12月2日; 横浜.

5. 吉田秀樹, 宮地 充, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創. 新規融合遺伝子 PAX3-NCOA2 は横紋筋肉腫の造腫瘍性を促進し、分化を阻害する. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月30日~12月2日; 横浜.

6. 宮地 充, 土屋邦彦, 柳生茂希, 今村俊彦, 家原知子, 細井 創. 胞巣型横紋筋肉腫において、血清 miR-206 は高発現を示す. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月30日~12月2日; 横浜.

7. 大内一孝, 宮地 充, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創. 融合遺伝子陰性横紋筋肉腫において、HMGA2 遺伝子は増殖を促進する. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月30日~12月2日; 横浜.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 体液由来検体を用いた横紋筋肉腫の検出方法

発明者: 宮地 充、細井 創

権利者: 京都府公立大学法人、LSIP LLC

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/058843

出願年月日: 2011年4月7日

国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等

[http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/ped/research/  
tumor.html](http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/ped/research/tumor.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細井 創 (HOSOI HAJIME)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児  
発達医学・教授  
研究者番号：20238744

### (2) 研究分担者

家原 知子 (IEHARA TOMOKO)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児  
発達医学・講師  
研究者番号：20285266

土屋 邦彦 (TSUCHIYA KUNIHICO)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科小児  
発達医学・助教  
研究者番号：90381938