

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659192
 研究課題名（和文） 染色体リプログラミングによる革新的な粘液型脂肪肉腫の治療法の開発
 研究課題名（英文） Novel therapy of myxoid liposarcoma by Chromosome re-programming
 研究代表者
 黒田 雅彦 (KURODA MASAHIKO)
 東京医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80251304

研究成果の概要（和文）：

t(12;16)による TLS-CHOP 遺伝子が原因とされる粘液型脂肪肉腫は、中高年で発生する軟部肉腫の中でも発生頻度が高い。本研究では、本腫瘍を Yamanaka factor によって染色体をリプログラミングすることで腫瘍増殖を抑制する、分化誘導治療の開発を目指した。しかし、Yamanaka factor では、腫瘍増殖を抑制することは出来なかった。一方研究過程の中で、脂肪分化に関する miRNA として、miR-486 の同定に成功した。興味深い事に、miR-486 は、TLS-CHOP 遺伝子に直接制御されていることも明らかになった。さらに、miR-486 の標的遺伝子として PAI-1 遺伝子を同定した。これらの検討から、粘液型脂肪肉腫において、TLS-CHOP 遺伝子は、miR-486 を抑制し、その結果 PAI-1 遺伝子の発現亢進がおこり、腫瘍の増殖進展へとつながる新たな分子機構を明らかにする事ができた。

研究成果の概要（英文）：

Myxoid liposarcomas (MLSs) are characterized by t(12;16)(q13;p11) translocation and expression of TLS-CHOP chimeric oncoprotein. In this study, we have found that miR-486 regulate differentiation of adipocyte. Furthermore, miR-486 expression was repressed in TLS-CHOP-expressed NIH3T3 fibroblasts and MLS tissues, and exogenous overexpression of miR-486 repressed growth of MLS cells. In addition, we have identified plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) as a novel target gene of miR-486. Furthermore, knockdown of PAI-1 by a specific small interfering RNA (siRNA) inhibited growth of MLS cells, suggesting that increased expression of PAI-1 by miR-486 repression is critical for survival of MLS cells. Collectively, these results suggest a novel essential molecular mechanism that TLS-CHOP activates PAI-1 expression by repression of miR-486 expression in MLS tumorigenesis and development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：脂肪肉腫、染色体転座、TLS-CHOP 遺伝子、iPS 細胞

1. 研究開始当初の背景
- | | |
|---------------------|---|
| 報告者はこれまでに、粘液型/円形細胞型 | 脂肪肉腫の原因となる TLS-CHOP 遺伝子の研究を行ってきた。これまで、図 1 に示すよう |
|---------------------|---|

に、脂肪分化の前脂肪細胞において 12 番染色体と 16 番染色体の転座が起こり、この転座による TLS-CHOP 遺伝子が、転写因子として C/EBP family 遺伝子群、DOL54 や miRNA の発現調節を行い、腫瘍化が起こっていることを明らかにしてきた (Kuroda, M. et al. Am J Pathol 151; 735, 1997, Kuroda, M. et al. Proc Natl Acad Sci USA 96, 5025, 1999, Zinszner H, Kuroda M, et al. Genes & Dev, 12: 982, 1998, Wang, XZ, Kuroda, M. et al. EMBO J, 17: 3619, 1998, Kuroda, M. et al. EMBO J 19, 453, 2000, Kuroda, M. et al. J Cell Sci, 117: 5897, 2004)。

一方、Cre-Loxp システムを用いて、特定の細胞に TLS-CHOP キメラ癌遺伝子を発現することができるノックインマウスモデルの解析から、本キメラ遺伝子は、未分化間葉系細胞や、分化した脂肪細胞では癌遺伝子として機能しないことが明らかになった。この事実は、分化異常を示す粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の染色体、クロマチン構造を Yamanaka factor によってリプログラミングする事で、TLS-CHOP 遺伝子の発がん機能が消失できる可能性を示すものである。

2. 研究の目的

12 番染色体と 16 番染色体の相互転座による TLS-CHOP 遺伝子が原因とされる粘液型/円形細胞型脂肪肉腫は、中高年で発生する軟部肉腫の中でも発生頻度が高い。本腫瘍は、化学療法も抵抗性の症例が多く、革新的な治療が期待されている。このような背景の中で、報告者は、本腫瘍の原因となる TLS-CHOP 遺伝子が細胞分化の過程で oncogenic activity を失うことを明らかにした。そこで、本研究課題においては、粘液型/円形細胞型脂肪肉腫細胞を、Yamanaka factor によって染色体をリプログラミング (初期化) し、脂肪細胞に分化誘導を行うことで腫瘍増殖を抑制する、革新的な分化誘導治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 粘液型脂肪肉腫培養細胞への Yamanaka factor の導入

報告者が樹立した、t(12;16) (TLS-CHOP キメラ遺伝子陽性) の粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の培養細胞株に Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc を導入し、細胞増殖への影響を確認する。同時に感染効率を検討する。

(2) リプログラミング化した脂肪肉腫細胞の脂肪分化誘導

上記項目 1 で、リプログラミングした、粘液型/円形細胞型脂肪肉腫細胞株を、PPAR γ アゴニスト、インシュリンなどの脂肪分化誘導剤を用いて、分化誘導を行う。分化誘導の評価には、Oil-red 染色の他に、

aP2、CEBP family 遺伝子など各種の脂肪分化マーカーを用いる。

(3) RAG マウス移植モデルでの検討

すでに報告者は、3 種類の t(12;16) (TLS-CHOP キメラ遺伝子陽性) の粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の培養細胞株を RAG マウスに移植する事に成功している。本項目においては、3 種類の t(12;16) (TLS-CHOP キメラ遺伝子陽性) の粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の培養細胞株にルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入し、RAG マウスに移植する。移植後、腫瘍内に Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc を発現するレトロウイルスを導入し、1 週間後に PPAR γ を投与後、IVIS (in vivo imaging system; Xenogen 社製) を用いて腫瘍サイズを測定する (図 3)。さらに、腫瘍組織の病理学的検討を行う。

4. 研究成果

(1) t(12;16) (TLS-CHOP キメラ遺伝子陽性) の粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の培養細胞株に Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc を導入し、増殖能を検討したが、細胞形態や増殖能の変化はみられなかった。4 因子の遺伝子導入効率の検討等、行った結果も同様であり、腫瘍細胞における染色体のリプログラミングは困難であることが判明した。

(2) 本腫瘍において、脂肪分化誘導に関連する miRNA の同定を行った。miRNA の同定には、正常脂肪細胞を用いて、分化誘導前後における miRNA の発現をマイクロアレイ法にて解析した。その結果、数種の miRNA の同定に成功した。その一つが miR-486 である。

(3) miR-486 は、TLS-CHOP 遺伝子の直接的遺伝子であり、TLS-CHOP キメラ遺伝子によって miR-486 の発現抑制が起こることも示された。また、miR-486 を TLS-CHOP キメラ遺伝子陽性の粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の培養細胞株に導入すると細胞増殖の抑制が観察された。これらの結果は、miR-486 が脂肪細胞における分化能の制御によって、粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の増殖を制御している事を示す。

(4) さらに miR-486 の標的遺伝子の単離を行った。その結果、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) を単離した。さらに PAI-1 が腫瘍の増殖に関与している事から、粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の培養細胞株において PAI-1 のノックダウンを行うと、細胞増殖抑制が観察された。以上の結果から、TLS-CHOP キメラ遺伝子による miR-486 の発現抑制により、PAI-1 の発現上昇がおり、その結果粘液型/円形細胞型脂肪肉腫の増殖、

進展がおこる新たなメカニズムが明らかになった。

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)

- (1) Yoon JH, Sudo K, Han JS, Chae MY, Park SH, Weinstein M, Nakae S, Yamashita T, Lee IK, Sumida T, Kuroda M, and Mamura M. SMAD2 MEDIATES DENDRITIC CELL SUPPRESSION BY TGF- β Smad2 is the TGF- β receptor-regulated Smad to suppress the immunogenicity of mouse and human dendritic cells. *European Journal of Immunology* -2. 2013 (Manuscript ID: eji.201242972.R1) 査読有
- (2) Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, and Kurose H. GKR6-deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nature Communications*. 2013;4:1532. doi: 10.1038/ncomms2540. 査読有
- (3) Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojigin N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis. *BMC Cancer* (Section: Genetics, genomics and epigenetics) 2013;13:99. doi: 10.1186/1471-2407-13-99. 査読有
- (4) Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Molecular Therapy* vol. 21 no. 1, 185-191 2013. doi: 10.1038/mt.2012.180. 査読有
- (5) Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, Takeshita F, Sakai Y, Kuroda M, Ochiya T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *SCIENTIFIC REPORTS* 3:1197 DOI: 10.1038/srep01197. 2013 査読有
- (6) Minegishi Y, Shibagaki Y, Mizutani A, Fujita K, Tezuka T, Kinoshita M, Kuroda M, Hattori S, Gotoh N. An adaptor protein complex of FRS2beta and CIN85/CD2AP provides a novel mechanism for ErbB2/HER2 protein downregulation. *Cancer Science*. 2013;104(3):345-52. doi: 10.1111/cas.12086. 査読有
- (7) Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Chen YJ, Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T, Kuroda M, Levine AJ, Yamazaki T. LGR5-Positive Colon Cancer Ctem Cells Interconvert with Drug-Resistant LGR5-Negative Cells and Are Capable of Tumor Reconstitution. *STEM CELLS*. vol 30, No.12, 2631-2644 2012 doi: 10.1002/stem.1257. 査読有
- (8) Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*. 2012. doi: 10.1038 査読有
- (9) Borjigin N, Ohno S, Wu W, Tanaka M, Suzuki R, Fujita K, Takanashi M, Oikawa K, Goto T, Motoi T, Kosaka T, Yamamoto K, Kuroda M. TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012. 19:427(2):355-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.063. 査読有
- (10) Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Chen YJ, Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara

- M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T, Kuroda M, Levine AJ, and Yamazaki T. Drug-resistant colon cancer stem cells are Lgr5-negative and are capable of tumor reconstitution progressing through a Lgr5-positive state. *Stem Cells*. 2012 ;30(12):2631-44. doi: 10.1002/stem.1257. 査読有
- (11) Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Advanced Drug Delivery. Reviews*. 2013;65(3):398-401. doi: 10.1016/j.addr.2012.07.019. 査読有
- (12) Oikawa K, Tanaka M, Itoh S, Takanashi M, Ozaki T, Muragaki Y, Kuroda M. A novel oncogenic pathway by TLS-CHOP involving repression of MDA-7/IL-24 expression. *Br J Cancer*. 2012;106(12):1976-9. doi: 10.1038/bjc.2012.199. 査読有
- (13) Xu M, Takanashi M, Oikawa K, Nishi H, Isaka K, Yoshimoto T, Ohyashiki J, Kuroda M. Identification of a novel role of Septin 10 in paclitaxel-resistance in cancers through a functional genomics screen. *Cancer Sci*. 103(4):821-7. 2012
doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02221.x. 査読有
- (14) Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer science*;102(12):2264-71. 2011
査読有

[学会発表] (計 46 件)

1. Ohno S, Takanashi M, Ohgi T, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver anti-tumor microRNA to breast cancer cells. Keystone Symposia Conference - Noncoding RNAs in Development and Cancer(A7) January 20-25, 2013 Vancouver, British Columbia, CANADA
2. Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Goto M, Taketo M,

- Nakao K, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 is essential for oncogenesis of intestinal tumors and control of intestinal stem cells. 第35回分子生物学会年会、福岡、2012年12月11日
3. Oikawa K, Takanashi M, Niwa M, Sun Y, Gui T, Shimokado A, Itoh S, Ozaki T, Kuroda M, Muragaki Y. Wapl regulates HP1 expression and levels of various histone H3 tail modifications. 第35回分子生物学会年会、福岡、2012年12月11日
 4. 黒田 雅彦. 子宮頸癌のがん遺伝子 hWAPL の臨床応用. 招待講演、第 13 回子宮筋腫・内膜症病変生検研究会、岡山、2012 年 11 月 23 日
 5. Yoshinori Matsuki, Koji Shimoke, Masahiko Kuroda, Motoshige Kudo, Shunsuke Suzuki, Yasuyo Kashiwagi, Hisashi Kawashima, Akinori Hoshika. The reparative time-course is not influenced by the size of lesions in embolic cerebral infarction in rats. 投稿論文奨励賞受賞講演、第 170 回東京医科大学医学会総会、東京、2012 年 11 月 17 日
 6. 黒田 雅彦. 大腸癌発生における形態異常と miRNA. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19
 7. 及川 恒輔、高梨 正勝、黒田 雅彦、村垣 泰光. 粘液型脂肪肉腫において TLS-CHOP は抗がん性サイトカイン MDA-7/IL24 の発現を抑制する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19
 8. 高梨 正勝、須藤 カツ子、松永 芳径、大木 忠明、濱崎 智洋、谷口 維紹、仲矢 丈雄、臼井 嘉彦、後藤 浩、黒田 雅彦. 血管新生網膜症に対する分子標的治療法を目指した核酸薬の開発. 第 32 回日本眼薬理学会、滋賀、2012 年 9 月 15
 9. ボルジゲン 那日蘇、大野 慎一郎、田中 正視、呉 偉紅、田中 理英子、藤田 浩司、高梨 正勝、黒田 雅彦. TLS-CHOP がん遺伝子が発現制御する miRNA の解析. 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012 年 4 月 26 日
 10. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Mizutani T, Ochiya T, Kuroda M. Delivery of miRNA to the EGFR-expressed tumor by systemic injection of target exosomes. International Society for the EGFR-extracellular Vesicles (ISEV) Gothenburg, Sweden 2012. 4.18
 11. Takanashi M, Ohno S, Ohgi T, Yoshikawa K, Hayasi H, Mizutani T, Kuroda M. Novel type of small RNA exhibit RNA interference effect

- without activation of Toll-like receptor 3. キーストンシンポジウム (Nucleic Acid Therapeutics: From Base Pairs to Bedsides (A2)), Santa Fe, New Mexico USA 2012 January 10
12. Ohno S, Ueda S, Ishikawa A, Fujita K, Takanashi M, Kuroda M. Delivery of antitumor molecules to the EGFR expressing cancer using EGF expressing exosomes. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13日
13. Oikawa K, Tanaka M, Itoh S, Sun Y, Gui T, Shimokado A, Ozaki T, Takanashi M, Kuroda M, Muragaki Y. A novel oncogenic mechanism of the chimeric oncoprotein TLS-CHOP mediated by a tumor suppressor protein MDA-7/IL24. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13日
14. 水谷 隆之, 高梨 正勝, 及川 恒輔, 田中 正視, 黒田 雅彦. 関節炎治療を目的とした siRNA クリームによる内在性遺伝子のノックダウン. 医学会奨励賞受賞講演、第166回東京医科大学医学会総会、東京、2011年11月6日
15. 黒田 雅彦、高梨 正勝、大野 慎一郎、上田 しのぶ、牧野 洋二郎、大平 達夫、池田 徳彦. 人工型エクソソームを用いた新規肺癌治療の開発. 第52回日本肺癌学会総会、大阪、2011年11月3日
16. 及川 恒輔、高梨 正勝、黒田 雅彦、村垣 泰光. コヒーシン関連タンパク Wap1 の新規分子機能の検討. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3日
17. 山田 正俊、大野 慎一郎、高梨 正勝、黒田 雅彦. 癌遺伝子 hWAPL に対する標的 microRNA の同定. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3日
18. 黒田 雅彦. 疾患マーカーとしての細胞外核酸 (分泌型 miRNA). 第84回日本生化学会大会 (シンポジウム 細胞外核酸の動態: 医科学、環境科学での新しい観点からの研究、応用展開) 京都、2011年9月21日
19. 呉 偉紅、那 日蘇、藤田 浩司、松山 永久、高梨 正勝、大野慎一郎、田中 正視、田中理英子、倉田 厚、黒田 雅彦. 大腸癌、乳がん、胃癌組織における miR-17-92 クラスターの解析. 第167回東京医科大学医学会総会、東京、2011年6月4日
20. 那 日蘇、大野慎一郎、田中 正視、呉 偉紅、田中理英子、藤田 浩司、高梨 正勝、黒田 雅彦. 粘液型脂肪肉腫の原因遺伝子 TLS/CHOP により発現制御される miRNA の解析. 第167回東京医科大学医学会総会、東京、2011年6月4日
21. Xu M, Morishima N, Mizoguchi I, Chiba Y, Fujita K, Kuroda M, Iwakura Y, Cua DJ, Yasutomo K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production. IMMUNOLOGY 2011, 98th Annual Meeting of The American Association of Immunologists. San Francisco, California. May 13th 2011
22. 黒田 雅彦. 乳がん幹細胞に対する核酸医薬の開発. 第2回久留米核酸医薬研究会、福岡、2011年5月11日
23. Hirano K, Araki-Sasaki K, Osakabe Y, Tanaka K, Kuroda M, Fukuoka H, Kawasaki S, Maeda N, Kinoshita S. The significance of lactoferrin in secondary corneal amyloidosis. Fort Lauderdale, Florida, USA. 2011 ARVO Annual Meeting. May 1st 2011
24. 那 日蘇、呉 偉紅、田中 正視、鈴木 理英子、藤田 浩司、高梨 正勝、今村 哲夫、黒田 雅彦. 粘液型脂肪肉腫における TLS-CHOP 遺伝子により誘導される miRNA の解析. 第100回日本病理学会総会、横浜、2011年4月30日

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: VEGF 遺伝子の発現抑制用一本鎖核酸分子

発明者: 黒田雅彦、高梨正勝、後藤 浩、池田徳彦、土田明彦、大木忠明、濱崎智洋

権利者: 東京医科大学、株式会社ボナック
種類: 特許

番号: 特願 2012-050947 (国内)

PCT/JP2013/056374 (日本を含む PCT)

出願年月日: 2012/3/7

国内外の別: 国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 雅彦 (KURODA MASAHIKO)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80251304