

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791627

研究課題名(和文) miRNAによる骨軟部腫瘍の発生・進展における分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular genetic analyses of bone and soft tissue tumors

研究代表者

木村 文子 (Kimura, Ayako)

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンター・特任助教

研究者番号：30597232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：稀少癌種である骨軟部腫瘍において、切除組織標本を用いてmiRNAやその他の網羅的発現解析を行った結果、腫瘍化組織と正常組織間で有意に発現の異なるmiRNA、遺伝子は見出せなかった。一方で骨軟部腫瘍細胞株における検討において、既存の癌関連遺伝子の強制発現あるいはノックダウンが増殖、遊走、浸潤に影響することを見出した。この遺伝子による制御が細胞周期関連遺伝子の発現調節を介すること、分化関連遺伝子の転写を調節していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Genetic analysis was performed using human osteosarcoma samples, failed to detect any apparent genetic alterations. Using osteosarcoma cell line, we isolated the genes involving the development and progression of osteosarcoma. Overexpression and knockdown of the gene demonstrated its function in cell proliferation, migration and invasion.

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：骨軟部腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

わが国において、癌は死亡原因の1位であり、癌の罹患率は右肩上がりが増加している。癌の中でも骨軟部腫瘍は特に良悪性の診断が難しく、至適の治療の方針すら見いだせない「癌の中の難病」である。また、肺癌、前立腺癌、乳癌等は骨転移を多発する癌であり、骨転移はこれら癌の予後の決定要因であるためその克服は喫緊の課題であるが、腫瘍発生および骨転移の分子機構は不明な点が多い。

内在性の低分子 RNA である microRNA (miRNA) は、mRNA 分解や翻訳抑制などに関与しており、発生、増殖、分化などの様々な生物現象を担っている。ヒトでは 900 を超える miRNA が同定されており、すべてのヒト遺伝子のうち 3 分の 1 がこれらの miRNA によって制御を受ける。また、miRNA が脊椎動物の進化を導いたことも示唆されているなど、その生物学的な意義は極めて大きい。我々は、これまでに分子生物学的手法や発生工学的手法を用いて骨軟部代謝の分子機構の解明を行ってきたが (Development 2010, Cell 2000, 2002, Nature 2005, Natue Medicine 2007)、最近、miRNA が骨代謝の重要な制御因子であることを見出した (PNAS 2009)。一方で、miRNA の発現制御の異常が、癌の発生や進展とも大きく関わることが近年明らかになっている。例えば乳癌では、miRNA である let-7 の発現減弱や miR-21 の発現上昇により癌遺伝子 RAS や癌抑制遺伝子 TP53 を調節していることが示されている。しかしながら骨軟部腫瘍においては、miRNA の意義は未だ不明である。

そこで本研究では、骨軟部腫瘍の発生や骨転移における miRNA の病態生理的意義を分子生物学的に解明することを目的とする。本研究の特色は、大規模の学際的なアプローチを行う点である。骨軟部腫瘍は、他の癌種に比べ発生頻度が稀で組織型が多岐にわたるため、限られた患者数の単一施設では治療戦略の構築が困難であり、標準的治療の確立には大規模の多施設共同研究が不可欠である。本研究では、東京医科歯科大学および協力施設の協力により、合計 50 症例の軟部肉腫患者切除標本をすでに得ており、信頼性ある解析が可能である。また、これら標本の網羅的解析、臨床情報との統合解析は、癌研有明病院整形外科、東京医科歯科大学整形外科および硬組織疾患ゲノム解析部門と共同で行う。このように基礎医学および臨床医学の専門家が協力して本研究プロジェクトを遂行する。本研究により、骨軟部腫瘍の発生浸潤転移にかかわる新規 miRNA を抽出できることが期待され、新規 miRNA の分子機構解明は、がんの分子生物学および miRNA の制御機構においてその意義は大きいと考えられる。また、一部の骨軟部腫瘍では有用な悪性度判定法が未だ確立されていない。本研究で同定された miRNA を新規の診断マーカー

として術後の再発性の予測や補助療法を選択する指標として応用しうることも期待される。また体液や血液中に存在する分泌型の循環 miRNA の生物学的意義はほとんど理解されておらず、その病態生理的意義の解明は大変重要であり、臨床的にも、miRNA を解析することで簡便な癌の診断が可能になることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨軟部腫瘍の発生・進展・転移における miRNA の生理的意義の統合的な理解および診断法への応用を目指すことを目的とする。

miRNA による骨軟部腫瘍の発生の分子機構の解明については、すでに入手済みである骨軟部腫瘍患者の切除組織標本を用いて miRNA の発現を網羅的に解析し、腫瘍化組織で特異的に発現に異常を示す miRNA を同定を試みる。得られた候補 miRNA を強制発現あるいはノックダウンし形質転換能を評価することで、腫瘍における当該 miRNA の機能を解明する。また、P53 をはじめとする既存の癌関連因子と当該 miRNA の関連を明らかにする。これらの検討により癌化における miRNA の病態生理的意義を検討する。さらに、miRNA を用いた骨軟部腫瘍の悪性度診断法の確立を行う。骨軟部腫瘍の一部では、病理学的な悪性度と臨床的な悪性度の間に乖離がみられることが知られている。そこで、上記の骨軟部腫瘍患者において、網羅的な解析により得られた miRNA の発現データのクラスター解析を行い、病理、あるいは臨床的な悪性度との相関を検討する。これらの検討により、良性あるいは悪性でみられる特異的な miRNA を同定する。さらに得られた個々の特徴についての一連の検討で miRNA による骨軟部腫瘍のあらたな悪性度評価法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

骨軟部腫瘍組織標本を用いて網羅的な miRNA 発現解析を行い、解析結果と臨床病理情報の相関を解析し、骨軟部腫瘍の癌化、悪性化に関わる miRNA を特定する。また、高骨転移性細胞株を用いて、骨転移に関与する分泌型 miRNA を特定し、その機能を検討する。

miRNA による骨軟部腫瘍の発生の分子機構の解明については、骨軟部腫瘍切除組織標本を用いて、網羅的 miRNA 発現解析を行う。解析結果から、腫瘍化組織と正常組織間で有意に発現の異なる miRNA を抽出する。この候補 miRNA らについて腫瘍化への寄与を明らかにするために、使用した各組織標本の候補 miRNA の発現をリアルタイム発現を確認する。また、組織標本を用いて腫瘍化細胞での候補 miRNA の発現を免疫組織学的に検討する。さらに、骨腫瘍細胞株を用いて、候補 miRNA の強制発現あるいはノックダウンに

よる形質転換能への影響を組織学的に検討する。なお、本研究で使用する新鮮凍結標本は、東京医科歯科大学とその協力施設及び癌研有明病院において腫瘍切除術を受けた軟部肉腫患者の新鮮凍結標本から合計 50 症例を集めており、手術にて腫瘍が摘出された直後に採取され、すでに、東京医科歯科大学整形外科骨軟部腫瘍組織バンクおよび癌研有明病院整形外科にて凍結保管されているものを使用する。同定された腫瘍化を調節する miRNA について、その制御機構を明らかにする。P53、RAS など既存癌関連因子に注目し、骨腫瘍細胞株を用いて、候補 miRNA の強制発現あるいはノックダウンによる標的候補遺伝子の転写、発現、リン酸化への影響を検討して、標的遺伝子を同定する。これらの検討により腫瘍化における miRNA による腫瘍発生制御分子メカニズムを明らかにする。さらに、miRNA を用いた骨軟部腫瘍の悪性度診断法確立を行う。一部の骨軟部腫瘍では、病理学的な悪性度と臨床的な悪性度の間に乖離がみられる。そこで、上記の骨軟部腫瘍患者において、得られた miRNA の網羅的発現データのクラスター解析を行い、病理あるいは臨床的な悪性度との相関を検討する。予後が悪い等、臨床的には悪性度が高いが、病理組織上では悪性予測不可能な症例において特異的な miRNA を見出す。また、これらの miRNA の悪性度診断、骨転移の有効な診断マーカーへの応用を試みる。miRNA を用いた骨軟部腫瘍の悪性度診断法確立では、悪性度診断に有用である、複数の miRNA の特徴的な発現の組み合わせを用いて、悪性度の診断法を開発する。さらに、新たな症例を用いて、診断法の有用性を評価する。これら一連の検討から悪性度診断法を確立する。

#### 4. 研究成果

骨軟部腫瘍切除組織標本を用いて網羅的発現解析を行った結果、腫瘍化組織と正常組織間で有意に発現の異なる miRNA は見出せなかった。また遺伝子、コピー数の異常についても検討したが、有意な変化、異常は見出せなかった。

一方で骨軟部腫瘍細胞株における検討において、既存の癌関連遺伝子の強制発現あるいはノックダウンが増殖、遊走、浸潤に影響することを見出した。また、この遺伝子による制御が細胞周期関連遺伝子の発現調節を介すること、分化関連遺伝子の転写を調節していることを明らかにした。

これらの検討により、腫瘍化、悪性化における新たな骨軟部腫瘍発生制御分子メカニズムを明らかにした。さらに、この遺伝子発現を誘導する既存の薬剤の有効性を検討したところ、骨軟部腫瘍細胞株においては増殖、遊走、浸潤の抑制が可能であることを見出した。

#### 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 3 件)

Runx2 haploinsufficiency ameliorates the development of ossification of the posterior longitudinal ligament. Iwasaki M, Piao J, Kimura A, Sato S, Inose H, Ochi H, Asou Y, Shinomiya K, Okawa A, Takeda S. PLoS One. 2012;7(8):e43372.

木村文子, 竹田秀. タバコによる摂食抑制作用. 糖尿病・代謝・内分泌. 34 65-69, 2012

木村文子, 竹田秀. アンチエイジングと骨 Anti-aging and Bone. アンチ・エイジング医学 Vol.7 No.2, 63-68, 2011

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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

木村 文子

(東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンター・特任助教)

研究者番号: 3 0 5 9 7 2 3 2

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：