

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791674

研究課題名(和文) 骨軟部肉腫治療バイオマーカーの開発を目的とした網羅的マイクロRNA解析

研究課題名(英文) Comprehensive microRNA analyses for the therapeutic biomarkers of musculoskeletal tumors

研究代表者

中谷 文彦(Nakatani, Fumihiko)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：00535320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は高悪性度骨軟部肉腫患者の生検検体や血清を用い、発がんや悪性形質維持に大きな役割を持つとして近年注目されているマイクロRNAの網羅的解析およびその機能解析を行うことによって、予後や治療効果を予測する新たなバイオマーカーの開発を行った。主な成果としては、小児・若年成人に好発する高悪性度骨軟部肉腫であるユーイング肉腫においてmiR-34aというマイクロRNAがユーイング肉腫の重要な予後予測因子となりうることを明らかにした。また、ユーイング肉腫患者の初診時血清サンプル中のマイクロRNA解析を行い、ある特定のマイクロRNAがユーイング肉腫患者で多く発現しているという結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have analyzed the comprehensive microRNAs (miRNAs) expressions of the highly malignant musculoskeletal tumors patients using the their tumor biopsy and serum samples. MiRNAs are newly-recognized small non gene-coding RNA family, they have been increasingly accepted as playing crucial roles in pathogenesis of most human malignancy as well as normal cell differentiation. Microarray analyses of Ewing's sarcoma, which is one of the highly malignant sarcoma that frequently afflict children and young adolescents, defined a signature of miRNAs associated with a differential risk of disease progression. Validation analysis by qRT-PCR confirmed the prognostic relevance of miR-34a. Patients with the highest expressions of miR-34a did never experience adverse events; in contrast, most of the patients with the lowest expressions relapsed within two years. Furthermore, we have identified several miRNAs which have highly expressed in the serum of Ewing's sarcoma patients.

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 バイオマーカー マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫や横紋筋肉腫に代表される高悪性度骨軟部肉腫の治療成績は、1970年代から80年代にかけ、強力な化学療法を含む集学的治療の導入によって著明に改善した。しかしながら、90年代に入り、現在行われている標準的な化学療法が確立した後は、その治療成績はほぼ横ばいであり、さらに解決すべき、以下のような問題点を残している。

(1) 既存の化学療法の効果が不十分な症例や治療後再発例の予後は、依然としてきわめて不良であるが、このような予後不良群を、治療開始前に判別することが難しい。また、予後不良群に投与可能な新規分子標的治療薬の開発は、他がんに比べ著しく遅れている。

(2) 現在の標準治療では、ほぼすべての症例に同様の化学療法プロトコールが使用され、その治療には大量の抗がん剤投与を必要とする。そのため、小児・青年期に多く発生する骨肉腫や横紋筋肉腫が治癒した後も、治療自体による重篤な心・腎不全、抗がん剤による神経障害、不妊、2次がんの発生などの問題が晩期の合併症として患者や家族を苦しめる。

(3) 以上の問題点を解決していくために、

予後不良（抗がん剤低感受性群）あるいは予後最良好群を治療開始時に見分ける生物学的予後マーカーの開発、各々の骨軟部肉腫の生物学的特性に応じた分子標的治療薬の開発、さらにはそれらの分子標的治療薬がどの患者により効果があるかを見分ける、治療効果予測因子の開発などが強く望まれる。

(4) 低分子ノンコーディング RNA 一つであるマイクロ RNA が、近年新たにがんの分野で注目されている。マイクロ RNA の異常が、発がん

や悪性形質維持、化学療法抵抗性に大きな役割をもつことが相次いで報告され、これらを基礎とした、バイオマーカーや新規分子標的治療の開発に大きな期待がよせられていた。研究計画時、ヒトで900を超えるマイクロ RNA が同定されており、転写された mRNA を分解または翻訳抑制することによって、タンパク質の発現を阻害し、すべてのヒト遺伝子のうち約60%以上が、これらのマイクロ RNA によって制御を受けているとされている。またマイクロ RNA の大部分は種を超えてその構造が保存されており、生命現象の重要な部分を司るファインチューニングの役割を果たしていることが明らかになりつつある。比較的安定な一本鎖 RNA であるマイクロ RNA の網羅的解析は、技術的にほぼ確立しており、既知の cDNA マイクロアレイやプロテオーム解析と組み合わせることによって、より統合的に解析ノイズの少ないバイオマーカーが検出可能と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は高悪性度骨軟部肉腫患者の生検検体や血清を用い、発がんや悪性形質維持に大きな役割を持つとして近年注目されているマイクロ RNA の網羅的解析およびその機能解析を行うことによって、予後や治療効果を予測する新たなバイオマーカーを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

様々な骨軟部腫瘍生検検体の網羅的マイクロ RNA 解析を行う中で、特に小児・若年成人に好発する高悪性度骨軟部肉腫であるユーイング肉腫に着目して研究を行った。ユーイング肉腫は特徴的な融合遺伝子 EWS-ETS 遺伝子群によって発症する円形細胞腫瘍で、既存の化学療法などの集学的治療が一定の効果を示すが、治療そのものによる二次発がんや重要臓器に対する有害事象に悩まれることも多々あり、中には様々な治療に抵抗性のグ

ループも存在する。  
研究方法の具体的な手順をいかに述べる。

(1) 均一なプロトコール治療が行われた、限局性ユーイング肉腫 50 例の初診時生検サンプルから抽出した全 RNA を使用し、マイクロ RNA の網羅的解析を施行した。

(2) 次に、得られたデータを、再発転移および死亡イベントの有無で比較、有意に差を認めたマイクロ RNA 群について定量化 PCR および多変量解析による検証を行った。

(3) 12 種のユーイング肉腫細胞株を用い、In vitro で得られたマイクロ RNA の機能解析を行った。

(4) 35 例のユーイング肉腫患者から抽出された初診時血清中のマイクロ RNA の網羅的解析を施行した。他の良性および悪性骨軟部腫瘍患者から抽出された血清中のマイクロ RNA 発現プロファイルと比較し、発現量に差があったマイクロ RNA について定量化 PCR による検証を行った。

#### 4. 研究成果

(1) マイクロ RNA の網羅的解析により予後良好群と予後不良群を比較すると、miR-34a, miR-92a, miR-23a, miR-490-3p, miR-130b の 5 つのマイクロ RNA 発現量に優位な差が検出された。

(2) このうち、定量化 PCR および多変量解析によって最終的に miR-34 が有望なバイオマーカー候補として残り、miR-34a の発現量が高い症例は予後が良好であり、発現量が著しく低い症例は 2 年以内にほぼ全例が再発転移を来したことから、miR-34a はユーイング肉腫の独立した予後因子であると考えられた。

(3) 次に、12 種のユーイング肉腫細胞株を用い、In vitro でユーイング肉腫における miR-34a の機能解析を行った。その結果、miR-34a はユーイング肉腫細胞株の p53 status と相関し、p53 野生型の細胞株ではその発現が増加していた。また、miR-34a の発現量はアガロースゲルにおけるコロニー形成能と強い負の相関を示し、miR-34a の発現量が低いものほど、悪性度が高いことが示唆された。さらに、miR-34a の発現が低下している細胞株で合成 miR-34a を強制発現させると、抗がん剤への感受性が増強する傾向があった。また、miR-34a は、p53 の機能と密接に関係し、miR-34a の低下がユーイング肉腫の悪性度増強につながる可能性が示唆され、miR-34a の機能を基にした分子標的治療の開発が大いに期待される。また、今後は日本ユーイング肉腫研究グループ (JESS) 等と協議し、本研究で得られた知見を、多施設でより大規模な検証実験を行えるよう、計画を進めていく予定である。

(4) さらにユーイング肉腫患者の初診時血清サンプル中のマイクロ RNA の網羅的解析を行った。その結果、ある特定のマイクロ RNA がユーイング肉腫患者で多く発現しているという結果を得た。このマイクロ RNA は他のがん腫において、発がんを促進している発がん性マイクロ RNA であることが明らかにされつつあり、その発現量を経時的に観察することによって腫瘍マーカーとして開発できる可能性を秘めている。

#### 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 2 件)

1) The role of miRNA for musculoskeletal cancer.

Nakatani F.

Gan To Kagaku Ryoho. 2012 Mar;  
39(3):369-72. 査読無し  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22619771>

2) miR-34a predicts survival of Ewing's sarcoma patients and directly influences cell chemo-sensitivity and malignancy.

Nakatani F, Ferracin M, Manara MC, Ventura S, Del Monaco V, Ferrari S, Alberghini M, Grilli A, Knuutila S, Schaefer KL, Mattia G, Negrini M, Picci P, Serra M, Scotlandi K.

J Pathol. 2012 Apr;226(5):796-805.  
doi:10.1002/path.3007. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

1) 中谷 文彦 Ewing 肉腫における予後因子としての miR-34a 同定とその機能解析

平成 24 年度 日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会

平成 24 年 7 月 14 日～15 日 東京

2) 中谷 文彦 Ewing 肉腫の発がん、悪性形質維持における p53 pathway の役割

平成 25 年度 日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会

平成 25 年 7 月 11 日～12 日 東京

3) 中谷 文彦 網羅的マイクロRNA 解析によるユーイング肉腫の予後因子同定と分子標的治療の可能性

平成 25 年度 日本癌治療学会学術集会

平成 25 年 10 月 24 日～26 日 京都

〔図書〕(計 1 件)

中谷 文彦 悪性軟部腫瘍(手術適応のある肉腫)新臨床腫瘍学 日本臨床腫瘍学会編集 南江堂 平成 24 年(2012 年): 494-496

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 文彦 (NAKATANI, Fumihiko)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号: 00535320