

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462323

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる骨巨細胞腫の病態解明と新規治療ターゲットの探索

研究課題名(英文)Next Generation Sequencing of giant cell tumor of bone for the elucidation of pathology and the discovery of novel therapeutic target

研究代表者

田中 健之(Tanaka, Takeyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00583121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨巨細胞腫は良性悪性の間変病変であり、腫瘍に発現しているRANKLが巨細胞(破骨細胞)を誘導することによって、局所での骨破壊が生じる。RANKLは、骨粗鬆症、がんの骨転移での治療ターゲットとなっており、その発現メカニズムに関しては、不明な点が多い。本研究は、骨巨細胞腫のRANKL発現メカニズムについて次世代シーケンサーを用いて行っている。解析をさらに進め、治療ターゲットの探索につなげて行くことを目標としていく。

研究成果の概要(英文)：Giant cell tumors of bone (GCTB) is a locally aggressive neoplasm of bone, with a propensity for recurrence. RANK ligand secreted by the immature osteoblast-like stromal cells of these tumors induce the formation of osteoclast-like giant cells. RANKL is a therapeutic target of osteoporosis and bone metastasis, but the mechanism of the expression is unexplained. To elucidate the mechanism of RANKL expression, we performed this research with next generation sequencing. We will continue this research to discover new therapeutic target for GCTB.

研究分野：整形外科

キーワード：骨・軟部腫瘍 骨巨細胞腫

1. 研究開始当初の背景

骨巨細胞腫は、20~30歳代の膝周囲、橈骨遠位の長幹骨骨幹端部に好発する骨腫瘍である。発生頻度は、診断が確定した良性骨腫瘍の中で、20%を占め、比較的高い。治療は、手術による搔爬術、切除術を原則とするが、脊椎、仙骨・骨盤発生の場合は、手術療法が困難な場合があり、放射線治療を行うこともある。脊椎、骨盤などにも生じること、手術後の機能障害が生じることから根治したとしてもADL障害は多大である。本疾患は、上記治療によっても、再発率は、17~45%と高く、良性腫瘍でありながら、肺転移が2~10%にみられるため、薬物療法の開発が望まれる。しなし、これまで、骨巨細胞腫に関する分子生物学的研究は不十分であり、革新的なアプローチを要する状況である。病理学的には、多核巨細胞と間質細胞、組織球からなり、間質細胞は、間葉系幹細胞と同様な特徴を有し、間葉系細胞への分化能を持つ他、破骨細胞の強力な誘導因子であるRANKLを高発現している。骨巨細胞腫の病態に関しては、VEGFやcyclinD1などの腫瘍原生に関わる分子の発現と治療予後との相関を調べた報告(Zheng MH, *Human Pathol* 2000, Matsumayashi S, *Pathol Res Prac*, 2009)や、マイクロアレイなどの網羅的解析手法を用いた遺伝子発現解析によりp63, Tenascin C, UCHL1の発現異常がみられることが報告されている。また骨巨細胞腫で発現低下が見られるUCHL1, Runx3, ZAK 遺伝子ではメチル化の増加が報告されている。このように骨巨細胞腫におけるゲノム・エピゲノム異常の解析は少数行われているが、その病態メカニズムは未だ不明である(Jorg Fullenberg, *Int J Cancer*, 2010, Han YX et al. *Int J Oncol*, 2012, Babeto E et al. *Int. Virchows Arch*, 2011)。

RANKLをターゲットにした治療は、骨粗鬆症および骨転移の分野で発展し、ヒトモノクローナル抗体を用いた治療が確立している。RANKLヒトモノクローナル抗体は、本疾患に対しても応用され、その有効性が示唆されている。しかしながら、なぜ間質細胞がRANKLを高発現し、多核巨細胞を強く誘導しているのか、その発症機序は不明である。本疾患の発症機序に関する研究は少数であり、これを解明することで、本疾患の画期的治療につながる可能性があるほか、正常な骨代謝の理解にもつながると考えられる。ところで、癌研究において、次世代シーケ

ンサーを用いたゲノム解析方法は、これまでのがん家系の連鎖解析、LOH/CGH解析などによりがん遺伝子の存在する染色体領域を狭小化した後に原因遺伝子を同定するという方法からパラダイムシフトを起こし、全ゲノム・エピゲノムを対象とした原因遺伝子の網羅的解析を統合的に行うことにより、様々ながん疾患において、新規遺伝子異常が報告されている(Kohno T., *Nature med.* 2011, Yoshida K., *Nature*, 2011, Wang L et al. *Genom Res*, 2012)。

以上のことから、骨巨細胞腫の病態解明、新規治療ターゲットの探索のために次世代シーケンサーを用いた研究が望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いた統合的ゲノム・エピゲノム解析により、骨巨細胞腫の腫瘍原生に關与するゲノム・エピゲノム異常を同定することで、病態を解明し、新規治療ターゲットを探索することである。

3. 研究の方法

骨巨細胞腫の検体の採取
 東京大学医学部附属病院のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を受けた上で、対象疾患の患者にインフォームドコンセントを得る。患者血液を正常コントロールとし、診療の範囲内で約10ml採血を行う。また、手術により採取した組織を凍結保存し、保管する。また、すでに手術治療を受け、腫瘍サンプルがある提供者の場合は、既存の腫瘍切除サンプルを用いる。対象とする腫瘍サンプル数は15例を予定する。これらは、連結可能匿名化し、個人情報が特定されないように注意する。

ゲノム・エピゲノム解析

血液および腫瘍検体からゲノムの抽出を行う。解析は、Exome sequencing, SNPアレイ、RNA sequencing、ヒストン修飾の解析を行う。これらの情報をもとに、骨巨細胞腫の腫瘍発生に關与するドライバー変異となるゲノム異常を同定する。

・Exome sequencing

提供者の腫瘍サンプルと血液から抽出されたGenomic DNAを断片化した後にエクソンキャプチャーを用いてエクソン領域を抽出する。東京大学先端科学技術研究センターにおいて、次世代型シーケンサー(イルミナ社GAIIx)で解析し、得られた核酸配列情報を既知のヒトゲノムデータベース上にマッピングする。各腫瘍サンプルと血液から得られた配列情報を比較する。これにより、ゲノムワイドな体細胞変異

の有無を検出する。

・RNA sequencing

提供者の腫瘍サンプルと市販のヒト間葉系幹細胞から抽出した total RNA を断片化した後に、cDNA を作成する。ペアエンドプライマーを用いて PCR を行った後に、次世代型シーケンサー (イルミナ社 GAIIx) で解析し、得られた核酸配列情報を既知のヒトゲノムデータベース上にマッピングし、比較する。これにより、染色体転座の有無、腫瘍特異的なアイソフォームの探索、腫瘍細胞特異的に発現している遺伝子、RNA 編集などを検出する。

・SNP アレイ

提供者の腫瘍サンプルと血液から抽出された Genomic DNA を用いて、946,000 以上のコピー数プローブを有する Genome-wide Human SNP array 6.0 (Affymetrix) で SNP genotyping を行い、アレール特異的なゲノムコピー数解析を行う。

・Infinium assay

提供者の腫瘍サンプルと市販のヒト間葉系幹細胞から抽出した genomic DNA を用いて、DNA メチル化異常をイルミナ社の Infinium 27K ビーズアレイを用いて網羅的に解析する。

これら Exome-seq、RNA-seq、メチル化解析の解析結果を統合することで、骨巨細胞腫ゲノムに生じたドライバー変異となるゲノム異常を同定する。

候補遺伝子の機能解析

ゲノム解析の結果、候補にあがった遺伝子の機能解析を行う。候補遺伝子を間葉系幹細胞にレトロウイルスベクターを用いて安定導入し、増殖能、浸潤能、遊走能などの腫瘍原性をみる。増殖能は、MTT assay、細胞遊走能は scratch assay、Boyden chamber assay、組織侵入能は、Matrigel coating chamber により解析を行う。また、骨巨細胞腫では、RANKL が高発現することが知られているが、候補遺伝子の安定導入によって RANKL 発現が上昇しているか real time PCR により解析する。RANKL 発現上昇が見られた場合には、そのシグナル経路について解析を行う。候補に上がったシグナル経路について、ウェスタンブロッティングによる蛋白解析を、また腫瘍組織の免疫染色によって発現を確認する。

新規治療ターゲットの探索

候補遺伝子を安定導入した細胞を用いて破骨細胞の分化誘導を行う。で解析した RANKL 発現に關与するシグナルの阻害剤を投与し、RANKL 発現抑制、破骨細胞誘導抑制効果の検討を行う。既知の骨代謝における骨芽細胞の

RANKL シグナル伝達系には、VDR 経路、cAMP/PKA 経路、gp130/STAT 経路、Ca/PKC-ERK 経路などが存在する。RANKL 発現に至るシグナル経路を解明するために、先述の候補遺伝子を過剰発現させた系および siRNA を用いてその機能を抑制した系におけるこれらシグナル伝達分子の量的変化、リン酸化などの質的变化をウェスタンブロッティングにて評価し、候補遺伝子と既知のシグナルとの関連について検討を行う。さらに、候補遺伝子およびその下流シグナルに対する特異的なインヒビターが存在する場合には、これを用いて RANKL 発現抑制、破骨細胞誘導抑制効果の検討を行う。

腫瘍組織での免疫組織学的手法による発現確認

腫瘍細胞における候補遺伝子の発現を、今回解析に使用した検体および東大病院および関連施設から収集したパラフィン包埋固定された検体を用いて免疫組織染色で確認する。

4. 研究成果

骨巨細胞腫の検体を採取し、症例を蓄積した。これらからゲノムを抽出し、Exome sequencing、RNA sequencing を行った。特に、骨巨細胞腫を特徴づける RANKL 発現に関して、エピゲノムの観点からヒストン修飾などに着目し、解析を行っている。この際に、骨肉腫や、骨芽細胞の RANKL の遺伝子発現機構と比較し、骨巨細胞腫での RANKL 異常発現メカニズムについて解析を行っている。骨巨細胞腫に共通する遺伝子異常として、H3F3A 遺伝子が同定された (Behjati S, Nat Genet. 2013 Dec; 45(12):1479-82)。今のところ、これ以外の骨巨細胞腫のドライバー遺伝子となる遺伝子異常は同定されていない。現在、症例を増やして解析を行っているところである。骨巨細胞腫の新規治療薬であるランマークによる治療が開始され、骨巨細胞腫の治療体系が変わりつつある。ランマークは、ヒトモノクローナル抗 RANKL 抗体であるが、RANKL 投与によって、骨巨細胞腫の骨融解の進行を停止させ、さらに骨形成がみられる。しかし、ランマーク投与中止によって再発が見られる症例があること、ランマーク投与後に腫瘍の搔爬術を行った検体をみても、先述した骨巨細胞腫に共通してみられる H3F3A の遺伝子異常が残存していることから、単独で根治することは難しい可能性もあり、この点にも着目し、研究を進めている。骨巨細胞腫の検体採取後に酵素

処理を行い、骨巨細胞腫の本体と考えられている間質細胞の初代培養を行った。この細胞に RANKL 発現があることを Real time PCR を用いて確認した。これに、ランマークを投与し、MTT assay を用いて細胞増殖能に与える影響を調べたが、細胞増殖能に与える影響はなかった。また、その他、ランマーク投与による遺伝子発現変化についても検討した。In vitro の解析では非生理的であること、巨細胞の非存在下での解析であることから、ランマーク投与前後の検体を用いて、遺伝子発現解析とエピゲノム変化について解析を追加で行っているところである。

現在、Nature genetics に報告された H3F3A 以外の有力な遺伝子異常は同定されていないが、引き続き骨巨細胞腫の腫瘍原生に関わるメカニズムを解析して行きたい。また、新規治療薬であるランマークに関連した研究についても解析を行って行く予定である。

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 9 件)

Y Takatori, T Tanaka, et.al.
Clinical and radiographic outcomes of total hip replacement with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-grafted highly cross-linked polyethylene liners: three-year results of a prospective consecutive series. Mod Rheumatol. 2015 Mar;25(2):286-91.

T Moro, T Tanaka, et. al. Wear resistance of the biocompatible phospholipid polymer-grafted highly cross-linked polyethylene liner against larger femoral head. J Orthop Res. 2015 Jul;33(7):1103-10

K Ogura, H Kawano, et.al.
Development and external validation of nomograms predicting distant metastases and overall survival after neoadjuvant chemotherapy and surgery for patients with nonmetastatic osteosarcoma: A multi-institutional study. Cancer. 2015 Nov 1;121(21):3844-52.

H Kobayashi, H Kawano, et al.

Intercostal neuralgia as a symptom of an osteoblastoma in thoracic spine. BMJ Case Rep. 2015 Jul 2;2015

K Ogura, H Kawano, et.al.
What is the effect of advanced age and comorbidity on postoperative morbidity and mortality after musculoskeletal tumor surgery? Clin Orthop Relat Res. 2014 Dec;472(12):3971-8.

K Ogura, H Kawano, et.al.
Nomogram predicting severe adverse events after musculoskeletal tumor surgery: analysis of a national administrative database. Ann Surg Oncol. 2014 Oct;21(11):3564-71

K Ogura, H Kawano, et.al.
Nomogram predicting severe adverse events after musculoskeletal tumor surgery: analysis of a national administrative database. J Bone Joint Surg Am. 2013 Sep 18;95(18):1684-91.

K Ogura, H Kawano, et.al.
Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese version of the Toronto Extremity Salvage Score (TESS) for patients with malignant musculoskeletal tumors in the lower extremities. J Orthop Sci. 2015 Nov;20(6):1098-105

S Sugita, H Kawaguchi, et al.
Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Mar 10;112(10):3080-5.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

田中健之（TANAKA, Takeyuki）
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00583121

(2)研究分担者

河野博隆（KAWANO, Hirotaka）
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：20345218

川口浩（KAWAGUCHI, Hiroshi）
東京大学・医学部附属病院・届出診療
員
研究者番号：40282660