

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462325

研究課題名(和文) 骨軟部肉腫における腫瘍特異的融合遺伝子を標的とした血中循環微量腫瘍細胞の検出

研究課題名(英文) Detection of circulating tumor cells targeting tumor specific fusion gene in musculoskeletal sarcoma

研究代表者

堀田 哲夫 (Hotta, Tetsuo)

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号：00272815

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)：骨軟部肉腫細胞が特異的に発現する遺伝子を特殊な遺伝子増幅法を用いて高精度に検出する方法を開発した。血液2mlに5個程度の肉腫細胞を混入した状態から、高純度の遺伝子を効率よく抽出、精製し、最適な遺伝子増幅条件を設定することにより、血液中から標的となる肉腫細胞の遺伝子を検出することができた。さらに、実際に肺転移を伴う進行期の患者の血液中からも、同様の手法で肉腫細胞の遺伝子が検出できることも判明した。

研究成果の概要(英文)：We developed a new technique to detect the specific gene expression in musculoskeletal sarcoma cells. Highly purified RNA was extracted from the 2 mL blood sample contaminated with 5 sarcoma cells. The condition of gene amplification was optimized and the target gene could be sensitively detected. Furthermore, the target gene was also detected in the blood sample from a patient who carried lung metastasis of musculoskeletal sarcoma.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：血中循環微量腫瘍細胞 骨軟部肉腫 融合遺伝子 遺伝子増幅

1. 研究開始当初の背景

末梢血液中に流れていると考えられるがん細胞を検出しようとする試みはかなり以前から試みられてきていた。当初は末梢静脈血を採取し、光学顕微鏡下に細胞診の手法を用いて、がん細胞の存在を指摘できるかどうか検討された。しかし、かなり病状が進んだ状態においても、この方法での検出は困難であった。そこで分子生物学と遺伝子工学の発展に伴い、細胞そのものではなく、細胞が提示する抗原や、細胞内に存在する遺伝子を標的として、がん細胞の存在を検出可能かどうか検討が行われるようになった。骨軟部肉腫は以前から組織型により腫瘍特異的な融合遺伝子を発現するものが多数報告されており、組織診断を確定するための補助診断として広く用いられてきた。つまり、腫瘍組織から遺伝子 (RNA) を抽出し、RT-PCR 法によりそれぞれの融合遺伝子の発現の有無が検討され、その結果により組織診断を確定する。そこで、骨軟部肉腫の患者末梢血液中を微量に存在し体内を循環していると考えられる腫瘍細胞が発現する融合遺伝子を検出できれば、腫瘍マーカーとして病状把握のために臨床的に有用であろうと考えられたため、本研究の発案に至った。

2. 研究の目的

(1) まず、骨軟部肉腫において腫瘍特異的に発現する融合遺伝子を標的として、患者末梢血液中に存在し、体内を循環していると想定されるごく微量の肉腫細胞を高感度かつ簡便に検出する方法を確立することを目的とした。

(2) 次に微量の肉腫細胞からの高感度な遺伝子の検出法を確立することにより、これまで顕微鏡による形態観察により組織学的な鑑別が困難であった腫瘍に対して、遺伝子の検出による診断確定が可能かどうかについても検討した。骨軟部肉腫においては形態学的な診断鑑別が困難な腫瘍も多く、これらに対する補助診断法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究開始までに従来の RT-PCR 法、nested RT-PCR 法などを用いて、特異的融合遺伝子を発現する骨軟部肉腫の培養細胞における、それぞれの遺伝子発現の検出感度について検討し、報告してきた (文献 1)。しかし、これらの方法による検出感度は臨床的な応用を考えると不十分であると考えられた。そこで、本研究では定量的 RT-PCR 法を用いて、さらに高感度の検出を試みた。特異的融合遺伝子を発現する肉腫細胞株を様々な数で血液中に混入し、そこから RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法による検出限界となる細胞数を検討した。本法にはいくつかの検討すべきステップがあり、まず微量の肉腫細胞

から、どのようにして高純度の RNA を効率よく抽出するかを検討し、次に定量的 RT-PCR 法を行う条件の最適化について検討した。

(2) 定量的 RT-PCR 法を用いることにより、高感度な遺伝子発現の検出が可能であったことから、同様の手技を用いることで、超微量の検体からの様々な遺伝子発現の検出を試みた。日常の外来診療で行われている、穿刺吸引細胞診や針生検で得られた微量の検体から、本法を用いて標的とする遺伝子の検出を行うことで、これまで鑑別が困難であった組織診断を試みた。

(3) 本法により検出する標的遺伝子を絞り込み、骨軟部腫瘍組織や細胞内における標的遺伝子の発現量を比較検討した。すでに、治療対象として創薬が行われ、臨床応用されている遺伝子を対象とすることにより、本解析結果により迅速に実地診療へのフィードバックが可能になると推測し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 血液サンプルからの RNA 抽出は、以前は、低温での赤血球溶解の前処理を行った後に RNA 抽出試薬である ISOGEN などを用いて行ってきた。しかし、手順が煩雑で時間がかかるうえに、抽出の効率や精製度は十分とは言えなかった。近年、血液からの RNA 抽出については様々な試薬がキット化されて発売されており、その中でもタカラバイオのグアニジンベースの Lysis solution で細胞を処理した後、シリカメンブレン法でミニスピナカラムを用いた精製キットにより、効率的に精度の高い RNA を得ることができると分かった。

(2) 以前行われてきた PCR 法は、増幅反応のエンドポイントで増幅産物を電気泳動により確認するという方法が行われてきた。確立された手法である一方、感度調節は様々な因子が関連し、研究者の手技などによっても結果が変動するという問題点があった。一方で、定量的 PCR 法は、PCR 増幅産物の増加をリアルタイムでモニタリングし、解析する技術である。我々は、SYBR Green という蛍光色素を用いたインターカレーター法による定量的 RT-PCR 法を用いることで、高い感度で増幅産物の検出ができ、操作手技も比較的簡便で安定した結果が出せることを見出した。さらに、(1) で記載した RNA 抽出法に続き、効率的に逆転写反応と PCR 反応を行うための酵素など試薬の調整や、プライマーの設計、反応条件の設定などについても様々なキットなどを使用して検討を重ね、最善の条件を設定した。

(3) 以上の手法を用いて、in vitro の実験系として、特異的な融合遺伝子の発現が確認

されている様々な肉腫の細胞株を用いて研究を行った。標的とした融合遺伝子と培養細胞株は、

胞巣状軟部肉腫細胞株 ASPS-KY に発現する ASPL-TFE3 融合遺伝子

滑膜肉腫細胞 SYO-1, HSSY-II に発現する SSX-SYT 融合遺伝子

ユーイング肉腫細胞株 SKNMC に発現する EWSR1-FLI1 融合遺伝子

粘液型脂肪肉腫細胞株 402-92 に発現する DDIT3-FUS1 融合遺伝子

である。

それぞれの融合遺伝子に対して特異的な定量的 RT-PCR の反応条件を検討した。その結果、胞巣状軟部肉腫細胞株における ASPL-TFE3 融合遺伝子の発現やユーイング肉腫細胞株における EWSR1-FLI1 融合遺伝子の発現については、他の遺伝子に比べて高い検出感度の設定を行うことができた。そこで、正常末梢血液中に一定数の ASPS-KY 細胞と SKNMC 細胞を混入し、特異的融合遺伝子の検出限界を検討したところ、末梢血 2ml に対して 5 個程度の肉腫細胞の混入した状態で検出可能であることが分かった。さらに、臨床的には、多発転移を有する進行期の胞巣状軟部肉腫患者の末梢血から融合遺伝子 ASPL-TFE3 の検出が可能であることが確認できた。これは、進行期の肉腫患者の末梢血液中に肉腫細胞が実際に存在していることを証明することであり、血中循環微量腫瘍細胞に由来すると考えられる融合遺伝子を検出し得たことは、進行期患者における腫瘍マーカーとして臨床応用できる可能性も示唆された。現在は、本研究結果に基づき、臨床検体の採取を進め、研究成果の確立を目的に研究を継続している。

(4) 本研究で確立された、高精度の定量的 RT-PCR 法を用いることで、ごく微量の検体で臨床病理学的に鑑別が困難であった腫瘍の遺伝子発現による鑑別を試みた。外来診療で行われる、穿刺吸引細胞診や針生検で採取される微量検体では、これまで脂肪腫と高分化型脂肪肉腫の鑑別が困難なことが多かった。そこで、微量検体から定量的 RT-PCR 法を行い、両者の鑑別に有効と考えられる MDM2 や CDK4 遺伝子の発現量を定量的に比較することにより、実際に鑑別が可能となることも見出した。現在は本手法を用いることで、他の腫瘍についても微量検体から正確な腫瘍の鑑別診断が行えるか検討を継続している。

(5) さらに同様の手法を用いて、骨軟部腫瘍における Receptor-activator of nuclear kappaB ligand (RANKL) の発現解析を行った。骨軟部腫瘍の微量検体から効率よく RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法を用いて RANKL の発現量を定量的に解析した。RANKL は骨腫瘍において、破骨細胞の活性化を介して骨破壊機序に深く関連していると考えられている。こ

れまでは、癌骨転移において RANKL の高い発現を認めるとされていたが、原発性骨腫瘍や軟部腫瘍の一部においても高い発現を認めることが分かった。近年、原発性骨腫瘍である骨巨細胞腫に対して、抗 RANKL 抗体療法が行われ、骨破壊の抑制、および骨硬化の促進において、臨床的にも高い効果が認められている。今回、我々が行った解析結果から、抗 RANKL 抗体療法の有効性が示唆される腫瘍組織型が明らかとなり、今後の臨床応用が期待される結果となった。現在は、本治療法の有効性と作用メカニズムの解明を目的として、さらに研究を継続中である。

<引用文献>

Hoshino M, Ogose A, Kawashima H, Izumi T, Hotta T, Hatano H, Morita T, Otsuka H, Umezumi H, Yanoma S, Tsukuda M, Endo N. Molecular analyses of cell origin and detection of circulating tumor cells in the peripheral blood in alveolar soft part sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009;190:75-80.

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)

Yamagishi T, Kawashima H, Ogose A, Ariizumi T, Sasaki T, Hatano H, Hotta T, Endo N. Receptor-activator of nuclear kappaB ligand expression as a new therapeutic target in primary bone tumors. *PLoS One.* 査読あり 2016 in press.

Sasaki T, Ogose A, Kawashima H, Hotta T, Hatano H, Ariizumi T, Umezumi H, Ohashi R, Tohyama T, Tanabe N, Endo N. Real-time polymerase chain reaction analysis of MDM2 and CDK4 expression using total RNA from core-needle biopsies is useful for diagnosing adipocytic tumors. *BMC Cancer.* 査読あり 2014;14:468. doi:10.1186/1471-2407-14-468.

[学会発表](計9件)

生越 章, 堀田 哲夫, 川島 寛之, 佐々木 太郎, 山岸 哲郎, 遠藤 直人、脂肪腫と高分化型脂肪肉腫の腫瘍倍加時間の比較検討、日本整形外科学会基礎学術集会、2015年10月22日、富山国際会議場(富山県富山市)

山岸 哲郎, 生越 章, 川島 寛之, 佐々木 太郎, 堀田 哲夫, 遠藤 直人, 梅津 哉, 畠野 宏史, 有泉 高志、軟部腫瘍における治療標的としての RANKL 関連分子の発現解析、日本整形外科学会基礎学術集会、2015年10月22日、富山国際会議場(富山県富山市)

佐々木 太郎, 生越 章, 川島 寛之, 山岸 哲郎, 堀田 哲夫, 遠藤 直人, 色素性絨毛結節性滑膜炎/腱鞘巨細胞腫におけるRANKL 関連分子の発現解析、日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2015年7月9日、サンポートホール高松（香川県高松市）

Kawashima H, Ogose A, Sasaki T, Hotta I, Hatano H, Ariizumi T, Endo N. RANKL/RANK/OPG expression in musculoskeletal tumor as a therapeutic target. 2014 MSTS Annual Meeting, October 9-11, 2014, Houston (USA)

佐々木 太郎, 生越 章, 川島 寛之, 山岸 哲郎, 堀田 哲夫, 遠藤 直人, 守田 哲郎, 畠野 宏史, 有泉 高志, 梅津 哉、骨・軟部腫瘍における治療標的としてのRANKL 関連分子の発現解析、日本整形外科学会基礎学術集会、2014年10月9日、城山観光ホテル、（鹿児島県鹿児島市）

川島 寛之, 生越 章, 堀田 哲夫, 佐々木 太郎, 田中 恵子, 遠藤 直人, 梅津 哉、実地病理診断における融合遺伝子の検出による時間的有用性、日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2014年7月17日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

佐々木 太郎, 生越 章, 川島 寛之, 有泉 高志, 堀田 哲夫, 田中 恵子, 遠藤 直人、脂肪腫と高分化型脂肪肉腫に対する針生検での微量検体 RNA を用いた real-time PCR による遺伝子解析、日本整形外科学会基礎学術集会、2013年10月17日、幕張メッセ国際会議場（千葉県千葉市）

渡邊 信, 生越 章, 川島 寛之, 有泉 高志, 權 斎増, 堀田 哲夫, 遠藤 直人、皮下に発生した骨外性 Ewing 肉腫の2例、日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2013年7月11日、東京ドームホテル（東京都）

有泉 高志, 生越 章, 川島 寛之, 堀田 哲夫, 佐々木 太郎, 遠藤 直人、脂肪成分を有さない MDM2、CDK4 陽性四肢体幹軟部肉腫の3例、日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2013年7月11日、東京ドームホテル（東京都）

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀田 哲夫 (HOTTA, Tetsuo)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：00272815

(2)研究分担者

川島 寛之 (KAWASHIMA, Hiroyuki)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：30361900

(3)研究協力者

佐々木 太郎 (SASAKI, Taro)
山岸 哲郎 (YAMAGISHI, Tetsuro)