

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670544

研究課題名(和文)血液細胞の高精度遺伝子発現解析による骨肉腫バイオマーカーの探索研究

研究課題名(英文)Transcriptome analysis of leukocytes from sarcoma patients for helpful biomarkers

## 研究代表者

齋藤 俊行(SAITO, Toshiyuki)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・主任研究員

研究者番号：90205667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部腫瘍の有用バイオマーカーを開発するために、骨肉腫罹患者血液細胞を用いて、血液細胞の遺伝子発現状態の変化を調べた。必要検体数を確保するために対象疾患を骨肉腫に加えて脊索腫にまで拡張した。罹患者6名と健常者4名の白血球画分から得たRNAを試料として高精度大規模遺伝子発現解析を行った結果、罹患者群と健常者群の遺伝子発現パターンを互いに区別することができた。これは末梢血液を用いた罹患者スクリーニングの可能性を示唆する。測定対象を群間差の大きい転写産物に絞り込むことで、弁別精度を保ちつつ解析作業の簡便化を進めている。

研究成果の概要(英文)：To obtain novel biomarkers helpful for diagnosis of sarcomas or musculoskeletal tumors, leukocytes from 6 cases and 4 controls were subjected to a high accuracy large-scale gene expression analysis of 8,919 mRNAs revealed difference of transcriptome between the cases and controls. It is suggested that studies focusing on differentially-expressed transcripts might discriminate cases from controls with high accuracy in the future.

研究分野：分子遺伝学

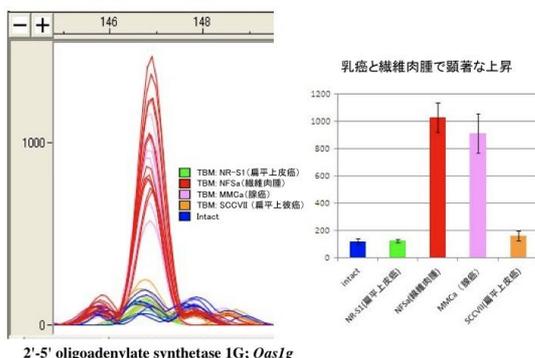
キーワード：がん 骨軟部腫瘍 骨肉腫 脊索腫 遺伝子発現 血液 バイオマーカー トランスクリプトーム

### 1. 研究開始当初の背景

肉腫は癌腫と比べると発症絶対数は小さいものの、化学療法や通常の放射線治療が有効でない症例が多くある。当所病院における切除不能肉腫 1000 例余の重粒子線治療実績から、肉腫に対する重粒子線治療の有効性が示されつつある (Imai R. et al. Lancet Oncol., 7:1034-1035, 2006., Imai R. et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 77:1470-1476, 2010.) が、一方で治療抵抗性のもも存在する。特に骨肉腫は若年層では白血病に次ぐ発生数があり、悪性度が高く切除不能例の生存率はきわめて低かった。重粒子線治療による長期生存例が増えてきているものの、有効な局所制御のための治療効果判定、重粒子線感受性判定、ひいては早期発見のための簡便で患者負担の小さい骨肉腫検出技術が必要である。

報告者らは腫瘍が、腫瘍細胞と線維芽細胞、脂肪細胞、免疫細胞などの間質細胞とで構成される疑似臓器と考え、その維持には血液細胞も深く関与することに着目し、血液細胞の遺伝子発現が腫瘍細胞からの影響を受ける可能性を検討した。複数の組織型の担がん動物を用いて血液細胞の遺伝子発現影響を調べた結果、がん組織型に応じた遺伝子発現影響を示す知見が得られた。特に肉腫での強い発現変化を認め (下図) 今回の骨軟部腫瘍の早期発見と治療効果判定に役立つバイオマーカー候補の血液細胞からの探索研究を着想するに至った。

末梢血細胞で発現上昇を認めた遺伝子の例



### 2. 研究の目的

本研究では、骨軟部腫瘍の代表モデル疾患として骨肉腫を選び、血液細胞の遺伝子発現変化の探索を実施し、病態を鋭敏に反映する診断精度の高い遺伝子群を同定することで、未だ有用分子マーカーがない骨肉腫の検出および局所制御評価に役立てることを目指す。

### 3. 研究の方法

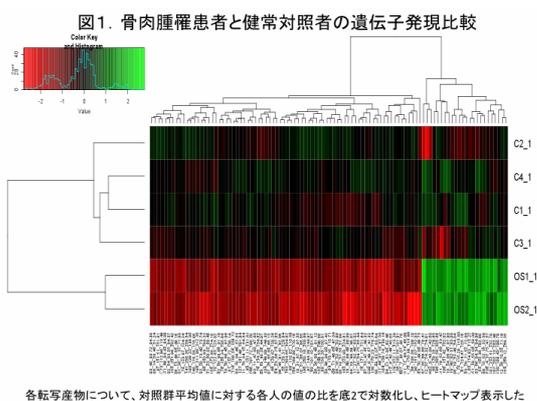
罹患群：放射線医学総合研究所病院において重粒子線治療を受ける骨肉腫罹患患者で基準を満たし研究参加の同意をした者。対照群：性および年齢が相適合する (±5 歳以内) 健常者で研究参加の同意をした者。

罹患者の重粒子線治療開始に先立ち行なわれる血液検査時に、本研究用血液 10ml の採取を行ない、白血球画分を分離後 RNA 安定化剤を添加して冷凍保管する。重粒子線治療後の経過観察のため来院する際 (3 ヶ月後、1 年後) にも同様に 10ml の研究用血液を採取する。保存白血球画分から全 RNA を抽出し、逆転写反応による相補 DNA への変換、二重鎖化後に制限酵素切断しアダプター連結を経て、cDNA-AFLP 解析用の鋳型を調製する。この鋳型に対して 256 通りの選択塩基組み合わせでの蛍光標識 PCR を実施し、キャピラリー型電気泳動装置による展開をおこなう。検出される増幅産物の蛍光シグナル強度から各転写産物量を測定する。各被験者の遺伝子発現量をグローバルノーマライゼーションに基づくパターンマッチングにより標準化をおこなったのちに比較し、罹患群と対照群とで発現量に差異のある転写産物を同定する。同様手順にて、同一被験者の治療前および治療後経過観察中の遺伝子発現量の変化も評価する。

### 4. 研究成果

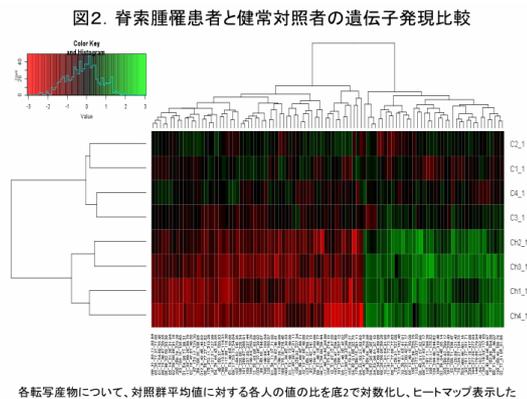
臨床現場では肉腫の早期発見および治療効果判定に役立つバイオマーカーが求めら

れており、その開発を期して本研究を実施した。当初は骨肉腫のみを対象疾患としたが、研究開始後1年間に当院を受診した骨肉腫罹患者すべてが化学療法実施済みで研究用血液の採取要件を満たさなかったため、機関内研究倫理委員会の承認を得て脊索腫を対象疾患に追加した。その結果、要件を満たす骨軟部腫瘍罹患者6名の協力を得て、目標症例数を確保した。最終年度、骨肉腫罹患者2名と脊索腫罹患者4名および健常者4名の白血球画分からRNAを調製し、cDNA-AFLP変法による高精度大規模遺伝子発現解析を実施した。計画の目標症例数は5名であるが、治療経過によっては解析対象外となる被験者が生じうるため上記症例数を解析した。8919種類のmRNA型転写産物の量測定(トランスクリプトーム解析)をおこない、各検体の転写産物発現パターンを距離法にて系統評価すると、罹患者群である骨肉腫群および脊索腫群は、健常者群とは明確に異なるクラスタを形成した。特に群間差の大きい100転写産物に着目することで、罹患者群と健常者群をより高精度に弁別可能であった(図1および図2)。



従来よりおこなわれてきた「がん」バイオマーカー探索は、がん細胞自体が産生する特異的分子を期待するものであった。いっぽう本研究結果は、「がん(肉腫)」組織が血液細胞の遺伝子発現状態に検出可能な変化を及ぼ

す可能性を示唆しており、正常細胞に現れる「がん」影響という新たなバイオマーカー探索対象を提起している。探索対象を「がん」そのものに限ることなく罹患者血液細胞にまで拡張し、バイオマーカーの開発研究をおこなうことの重要性が判明した。



今後は、解析症例数を増やしてこれまでの知見の検証と補強を進めるとともに、重粒子線治療後に提供された血液検体の解析もおこない、病態を鋭敏に反映する高感度治療効果判定バイオマーカーの開発に取り組む予定である。

## 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1件)

Katsumi Sakata, Hajime Ohyanagi, Shinji Sato, Hiroya Nobori, Akiko Hayashi, Hideshi Ishii, Carsten O. Daub, Jun Kawai, Harukazu Suzuki & Toshiyuki Saito. System-wide analysis of the transcriptional network of human myelomonocytic leukemia cells predicts attractor structure and phorbol-ester-induced differentiation and dedifferentiation transitions. Scientific Reports 5, Article number: 8283 doi:10.1038/srep08283, 2015.

〔学会発表〕(計1件)

齋藤 俊行, 林 昭子, 臺野 和広, 今岡 達彦, 西村 まゆみ, 小橋 元, 道川 祐市, 小池 幸子, 島田 義也, 福村 龍太郎. がん罹患者個体の血液細胞に見出された遺伝子発現変化. 第37回日本分子

生物学会年会、横浜、2014年。

〔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 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤俊行 (SAITO, Toshiyuki)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・重

粒子医科学センター・主任研究員

研究者番号：90205667

### (2) 研究分担者

小橋元 (KOBASHI, Gen)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：60270782