

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871161

研究課題名(和文) microRNA解析を用いた骨肉腫の薬剤奏効性予測バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Chemo-responsiveness biomarker discovery in osteosarcoma using mi-RNA microarray

研究代表者

窪田 大介 (KUBOTA, DAISUKE)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70638197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫において化学療法奏効性は予後を規定する因子として重要である。治療開始前に奏効性を予測できれば、化学療法の個別化や最適化が可能となる。本研究で我々はmicroRNAに注目し、化学療法奏効性を予測するバイオマーカーの開発を行った。治療開始前の臨床検体を用いてmiRNAマイクロアレイ解析を行い、奏効性に関連するmiRNAを同定した。このmiRNAについては、骨肉腫細胞株を用いて、抗がん剤抵抗性や細胞増殖・浸潤に関与することを確認した。さらに発現検証として行った検証試験においても、化学療法奏効性との強い相関を認め、骨肉腫の化学療法奏効性を予測するバイオマーカーとして有用である可能性が考えられた。

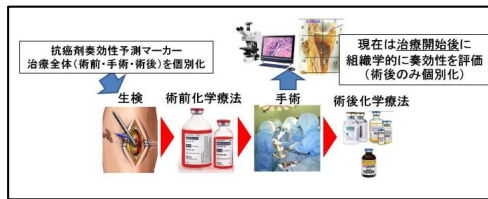
研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma is the most common malignant bone tumor. Patients who respond poorly to chemotherapy are at higher risk of adverse prognosis. In this study, we aimed to identify novel chemo-responsiveness biomarkers. We investigated miRNA expression in eight open biopsy samples using miRNA-microarray analysis. We found six miRNAs were differentially expressed in patients who respond poorly to treatment. In functional study, overexpression of miRNAs in three osteosarcoma cell lines enhanced cell proliferation, invasiveness, and resistance to chemotherapeutic drugs. In addition, overexpression of miRNAs blocked the ability of these chemotherapy agents to induce apoptosis. Finally, the association between poor prognosis and the abundance of miRNAs was confirmed by qRT-PCR in 20 additional osteosarcoma patients. In conclusion, these miRNA biomarkers may be used as basis for risk stratification therapy in osteosarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 化学療法抵抗性 バイオマーカー マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は小児や若年成人に発症する原発性悪性骨腫瘍の代表的疾患である。骨肉腫は日本国内の発症数が年間 150-200 人程度といわれ、稀少疾患の一つである。骨肉腫の治療成績は、1970 年代に化学療法の導入や患肢温存手術技術の発達により、劇的に改善されてきた。骨肉腫においては、薬理作用の異なる複数の抗癌剤を組み合わせ使用しており、また新たな治療法としての分子標的治療薬の使用も研究されてきている。しかし既存の抗癌剤に抵抗性の症例の予後は依然として極めて不良である。抗癌剤奏効症例の 5 年生存率は約 90% であるのに対して、抗癌剤抵抗性の症例では 5 年生存率が 30% 以下となっている。従って、抗癌剤の奏効性は骨肉腫において重要な予後規定因子である。しかし、現段階では抗癌剤の治療効果を事前に予測する有用な手段がないため、全ての患者に画一的な治療を行わざるを得ない状況で、臨床的な問題となっている。もし抗癌剤奏効性をバイオマーカーにより予測する事ができれば、患者の個々の病態にあわせて最適化された、最も効果的な化学療法を提供することが可能となる。



バイオマーカー開発にあたり、我々はマイクロ RNA(miRNA)に注目した。miRNA は長さ 20-25 塩基の小分子の一本鎖 RNA であり、様々な悪性腫瘍の生物学的プロセスへの関与が報告されている。また miRNA は mRNA やタンパク質と比較すると安定的に存在する分子であるため、バイオマーカーとしての利用が期待されている。抗癌剤奏効性については 2008 年ころより miRNA の関与が報告されるようになっており、骨肉腫においても miRNA が抗癌剤奏効性に影響している可能性が考えられる。

本研究の学術的な特色は 2 点ある。1 点目は培養細胞など特殊な環境下における検体ではなく、骨肉腫の臨床検体を多数用いて、抗癌剤感受性を規定する遺伝子を網羅的・複合的に明らかにしようとする点である。2 点目はこれらの新たなバイオマーカーの情報に基づき、多数症例の検証実験を経て骨肉腫の個別化医療、新たな治療戦略の可能性を探る点である。

本研究の独創的な点は miRNA を骨肉腫の抗癌剤奏効性予測バイオマーカーとして用いる事である。miRNA は全身に広く安定的に分布していること、採取・測定が容易な事よりバイオマーカーとしての利用が期待されている。しかし骨肉腫ではまだ十分に調べられていない。本研究は miRNA を骨肉腫の臨床の

現場でバイオマーカーとして使用する事を旨とする新しい取り組みである。

本研究の成果により、骨肉腫の抗癌剤奏効性を治療開始前に予測する事が可能となり、骨肉腫の新たな治療戦略の策定を通して患者の予後改善に役立つと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨肉腫の抗癌剤奏効性に関する臨床病理学的因子について検討した上で、miRNA の発現解析を行い、抗癌剤奏効性を予測するバイオマーカーを開発する事である。バイオマーカーの臨床応用を通じて骨肉腫の個別化医療を推進させ、分子病態に応じた新たな治療戦略の策定が可能となる。これにより骨肉腫の治療成績の向上が期待される。

本研究ではバイオマーカー候補のタンパク質を同定すると共に、そのバイオマーカー候補となった miRNA の分子生物学的特徴(機能解析・パスウェイ解析)を解明する。また、バイオマーカーの臨床応用を目指して、検証試験を進めていく。

3. 研究の方法

(1)miRNA マイクロアレイ解析を用いた化学療法奏効性予測バイオマーカー候補の同定

骨肉腫の抗癌剤抵抗症例と抗癌剤奏効症例の臨床検体を用いて、miRNA のマイクロアレイ解析(アジレント社)により 851 種類の miRNA 発現を網羅的に解析した。使用した検体は、骨肉腫の臨床凍結検体 8 症例で、化学療法奏効症例(腫瘍壊死率が 90% 以上、HUVOS 分類 1・2) 4 症例と抵抗症例(腫瘍壊死率が 10% 未満 HUVOS 分類 3・4、) 4 症例を用いた。いずれの検体も治療開始前の生検検体より total RNA を抽出し、解析を行っている。そして、2 群間で統計学的に有意な発現差を認める miRNA を同定した。

(2) マイクロアレイ解析の発現検証

次にこれらの miRNA のマイクロアレイでの発現を検証するために qRT-PCR を行い、2 群間での発現差の確認を行った。

(3) miRNA の機能解析

これらのバイオマーカー候補の分子については、3 種類の骨肉腫細胞株(MNNG/HOS, 143B, MG63)を用いて、機能解析を行った。機能解析については、骨肉腫細胞株にバイオマーカー候補の miRNA を強制発現させ、細胞増殖能、細胞浸潤能、アポトーシス、抗がん剤感受性についての検討を行った。細胞増殖能については、細胞増殖については、Cell Counting Kit-8 を用いた WST-8 アッセイにより評価した。抗がん剤感受性については、骨肉腫の治療に用いる Methotrexate (MTX), Doxorubicin (DOX), Cisplatin (CDDP) の 3 剤について IC50 値を計測し解析した。浸潤能の変化については Cell Invasion Assay

Kit(TREVIGEN)にて評価する。アポトーシスについては、アポトーシス関連分子である PARP に対する Western Blotting(WB)法と、Tunel 染色を用いて解析した。また、LNA-miRNA inhibitor を用いて miRNA の発現を抑制させた骨肉腫細胞株をマウスの皮下に移植し、ゼノグラフトモデルを用い、生体内での機能を検討している。

(4) バイオマーカーの追加検証試験

バイオマーカー候補の miRNA の発現検証試験として、骨肉腫 20 症例(奏効症 11 症例、抵抗症 9 症例)での発現検証試験を行い、バイオマーカーとしての有用性を確認した。これらの症例はパラフィン固定された病理検体より total RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて miRNA の発現を定量化し、化学療法奏効性との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨肉腫臨床検体を用いたマイクロアレイ解析の結果

化学療法奏効性に関する miRNA の同定 骨肉腫の臨床検体 8 症例を用いて、miRNA マイクロアレイ発現解析を行った。マイクロアレイ解析により 851 種類の miRNA についての発現量を網羅的に解析し、化学療法奏効群と抵抗群の 2 群間で有意差 ($p < 0.05$, fold difference > 2) を認める 6 個の miRNA を特定した。

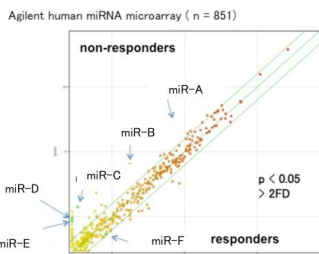


図1 マイクロアレイ解析の結果

(2) 定量 PCR 法によるマイクロアレイ解析の検証

マイクロアレイ解析で有意差を認めた 6 個の miRNA について、その発現差を検証するために定量 PCR 解析を行った。その結果、いずれの miRNA もマイクロアレイ解析と同じ増減の傾向を認めたが、その中でも発現に有意差 ($p < 0.05$) を認めた 2 個の miRNA をバイオマーカー候補とした。これらの miRNA はいずれの化学療法抵抗群で高発現を示すことを確認した。

(3) miRNA の機能解析

バイオマーカー候補の miRNA については、骨肉腫細胞株を用いて、機能解析を行った。in vitro の解析においては、当該の miRNA を骨肉腫細胞株に過剰発現させ、腫瘍細胞の機能にどのような変化を認めるかを観察した。

WST-8 アッセイでは、細胞増殖能の変化に

ついて検討した。候補の miRNA を高発現させた細胞株では、細胞増殖能が有意に増加することが確認された。3 種類の骨肉腫細胞株全てで同じ傾向が確認されている(図2)。

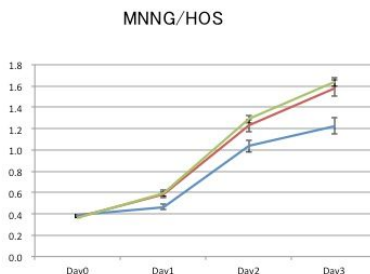


図2 細胞増殖アッセイ(青:control, 赤・緑:miRNA 高発現株)

また invasion アッセイでは、miRNA の高発現により、細胞遊走能・浸潤能が有意に増加していた。

抗がん剤抵抗性の変化については、MTX、DOX、CDDP の 3 剤について検討した。miRNA の導入による化学療法抵抗性変化を確認するため、各薬剤における IC50 値の変化を確認した。その結果、バイオマーカー候補の miRNA を高発現させることにより、いずれの薬剤に対しても、IC50 値が有意に増加することが確認された(図3)。これにより、これらの miRNA が高発現している状態では、いずれの薬剤に対しても抵抗性が增大することが示された。これらの薬剤抵抗性を獲得する機序については、薬剤取り込み阻害によるものか、代謝阻害によるものか、それとも腫瘍の悪性度自体が増大することによるものかは、明らかではなく、今後更なる検討が必要と考

える。

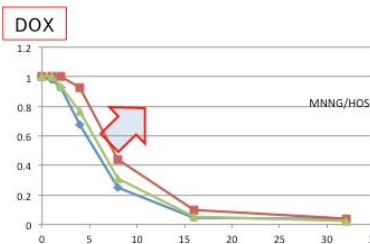


図3 DOX の感受性の変化(青:control, 赤・緑:miRNA 高発現株)

アポトーシスについては、cleaved PARP を中心にアポトーシス関連タンパク質の発現を Western Blotting(WB)法により確認した。

さらに注目した miRNA がどの mRNA の発現を調節しているか、miRNA のデータベース(Target scan、miR-base)を基に調査し、標的分子の特異抗体を用いた Western blot(WB)法による検証を行った。データベースによる検索では、Bak1 遺伝子や Rb 遺伝子の Pathway を調節することを確認した(図4)。

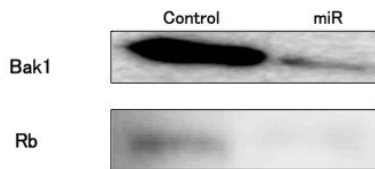


図4 miRNAの標的分子

Bak1やRb遺伝子は、がん抑制遺伝子として知られ、骨肉腫においても重要な発現異常として知られている。WBの結果でも、miRNAを高発現させた細胞株では、これらのBAK1遺伝子やRb遺伝子の発現が抑制され、その結果として、細胞増殖能・アポトーシスの状態に影響することが考えられた。アポトーシスについては、cleaved PARPを中心にアポトーシス関連タンパク質の発現を確認した。miRNAを高発現させた細胞株に抗がん剤を投与すると、BAK1やRb遺伝子の発現抑制と共に、cleaved PARPの発現も抑制されており、化学療法により誘導されるアポトーシスが抑制されることを確認した(図5)。またTunnel染色においても、同様にアポトーシス抑制の傾向が確認された。

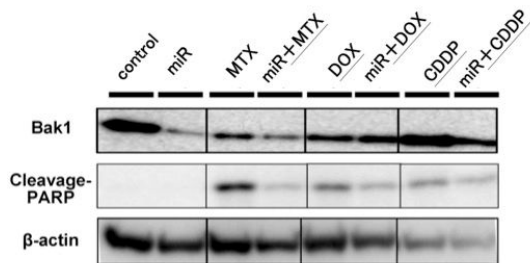


図5 Bak1の発現抑制とアポトーシスの抑制

またmiRNAがもたらすタンパク質の変化を網羅的に観察するため、質量分析を用いたタンパク質の網羅的発現解析も行っている。骨肉腫細胞株とmiRNA高発現細胞株のタンパク質を抽出し、ショットガンプロテオミクスn手法を用いて約2000種類のタンパク質発現の変化を確認した。発現量に変化のみられたタンパク質に関しては、DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>)を用いてパスウェイ解析を行った。その結果、細胞周期に関わるタンパク質に最も大きな変化がみられ、miRNAデータベースと矛盾しない結果であった。

さらに、生体内(*in vivo*)での機能解析についても検討を行った。骨肉腫細胞株にタカラバイオ社のLNA-miRNA inhibitorをtransfectionし、当該のmiRNA発現を抑制させた。この細胞株をマウスの皮下に移植し、経時的に腫瘍径の測定を行った。miRNAを抑制した細胞株では、増殖が抑制される傾向がみられそうだが、まだ再現性がとれておらず、今後更なる検討が必要である。

(4) バイオマーカーの発現検証

同定したmiRNAバイオマーカーの有用性を検証するため、追加の臨床検体(20症例)におけるmiRNAの発現を解析し、化学療法奏効性との関連性を検討した。追加の臨床検体については、パラフィン固定された臨床検体よりtotal RNAを抽出して行った。qRT-PCR法によりmiRNAの発現を定量化し、化学療法奏効性との相関を解析した。その結果、いずれのmiRNAも化学療法抵抗性の症例で有意な高発現をしてしており、ROC解析ではAUCが0.89, 0.90といずれも強く相関する結果であった(図6)。

臨床の現場で使用するバイオマーカーとして使用するに当たっては、さらに大規模な発現検証試験が必要である。骨肉腫は希少腫瘍であり、単施設での研究では症例数が限られ、臨床応用を目指した研究は困難である。従って、今後は多施設共同で、さらに大規模な発現検証試験を行っていく予定である。

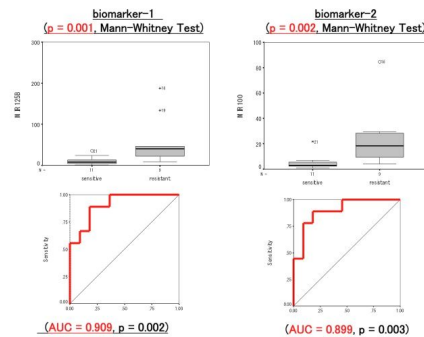


図6 追加検体(20症例)の発現検証

(5) 結語

このように骨肉腫臨床検体を用いたmiRNAの網羅的発現解析により、化学療法奏効性を予測するためのバイオマーカーを同定した。機能解析の結果より、これらのmiRNAは腫瘍の悪性度に関わり、またがん抑制遺伝子の発現調整を介して薬剤により惹起されるアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

このバイオマーカーを治療開始前に測定し、骨肉腫の化学療法奏効性を事前に把握することにより、患者の個々の病態にあわせた治療戦略の立案が可能となり、これにより治療効果の改善、副作用の現象など、骨肉腫患者の予後やQOLの改善に有用であると考えられる。

今後は、バイオマーカーの臨床応用にむけてさらに規模を大きくして、検証試験をすすめていく。またこれらのmiRNAの機能を考えると、骨肉腫の新規治療標的分子として有用である可能性も考えられる。今後は、骨肉腫の予後改善を目指し、バイオマーカーの発展と新規治療法開発を目指し、さらに解析を進めていきたい。

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. Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. J Proteome Res. 2014 May 2;13(5):2250-61. (査読あり)
2. Kubota D, Mukaiharu K, Yoshida A, Tsuda H, Kawai A, Kondo T. Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma. J Proteomics. 2013 Oct 8;91:393-404. (査読あり)

[学会発表](計3件)

1. Kubota D., Suehara Y., Kobayashi K., Kanko K., Kawai A., Kondo T. Chemo-responsiveness predictive biomarker discovery for osteosarcoma using microRNA-microarray, ESMO ASIA 2015, Singapore, 2015 Dec.
2. Kubota D., Mukaiharu K., Takagi T., Suehara Y., Kaneko K. DISCOVERY OF TARGETABLE TYROSINE KINASES AND ANTI-TUMOR ACTIVITY OF TYROSINE KINASE INHIBITORS IN ALVEOLAR SOFT PART SARCOMA, CTOS2015, Salt lake city, Utah, 2015 Nov.
3. Kubota D, Yoshida A, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. PROTEOMICS IDENTIFIED OVEREXPRESSION OF SET NUCLEAR ONCOGENE PRODUCTS AND POSSIBLE THERAPEUTIC TARGET IN ALVEOLAR SOFT PART SARCOMA, Connective Tissue Oncology Society, 2014 Annual Meeting, Oct 15-18, 2014, Berlin, Germany

[図書](計1件)

1. 窪田大介, 末原義之, 肉腫の橋渡し研究の最前線(2): プロテオーム解析 -骨軟部腫瘍とプロテオミクス, 週刊医学のあゆみ 肉腫研究・診療の最前線, vol 254, No.4, 2015年7月25日, 70(271-275), 医歯薬出版株式会社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 大介 (KUBOTA, Daisuke)
順天堂大学 医学部 助教
研究者番号: 70638197