

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293342

研究課題名(和文) 悪性骨軟部腫瘍の治療選択・層別化のためのバイオマーカーの開発と新たな治療法の探索

研究課題名(英文) Development of biomarkers and novel therapeutic targets for malignant bone and soft tissue tumors using the methods of global expression analysis

研究代表者

川井 章(KAWAI, AKIRA)

国立研究開発法人国立がん研究センター・骨軟部腫瘍・リハビリテーション科・科長

研究者番号：90252965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨肉腫、粘液線維肉腫、骨巨細胞腫の全エクソン解読ならびに全トランスクリプトーム解読を行い、新規ドライバー変異、融合遺伝子を同定した。また、粘液線維肉腫はエピゲノムの特徴から予後と関連する3群に分類されることを見出した。microRNA133aの発現抑制によって骨肉腫の、microRNA135bの発現抑制によって粘液型脂肪肉腫の浸潤能及び肺転移が抑制されることを明らかにした。TFE3免疫染色、WT1遺伝子FISH検索、FGF23免疫染色、USP6遺伝子FISH検索、H3K27me3免疫染色が種々の肉腫の病理診断に有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we performed whole exome and transcriptome sequences of chondrosarcoma, myxofibrosarcoma and giant cell tumor of bone. Myxofibrosarcoma was divided into 3 groups depending on the epigenome characteristics. Invasiveness and potential of pulmonary metastasis were regulated by microRNA133a in osteosarcoma and by microRNA135b in myxoid liposarcoma. Immunohistochemistries for TFE3, FGF23 and H3K27me3, and FISH for WT1 and USP6 were useful for pathological diagnosis of bone and soft tissue sarcomas.

研究分野：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨軟部腫瘍 肉腫 骨肉腫 粘液線維肉腫 粘液型脂肪肉腫 遺伝子 microRNA タンパク質

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍（肉腫）の治療成績は、集学的治療の導入により改善されてきたが、化学療法不応例、遠隔転移例の予後は依然きわめて不良であり、更なる治療成績向上のためには、これらの予後不良症例を的確に同定し、より有効な治療を行なうこと、あるいは新たな観点からの治療開発を行なうことが重要である。

網羅的遺伝子・タンパク質発現解析は、腫瘍の基礎的研究のみならず、未知のバイオマーカー、治療標的の同定に極めて有用な手法である。国立がん研究センター研究所には、次世代シーケンサーをはじめとした最先端の遺伝子・タンパク質発現解析技術が整備されている。また、我々が独自に開発した蛍光二次元電気泳動法（2D-DIGE）はタンパク質の網羅的解析法として世界トップレベルの網羅性と再現性を有している。本研究開始時、悪性腫瘍における治療抵抗性の一因として「がん幹細胞」様細胞の存在が示唆され、我々の研究室でも骨肉腫の「がん幹細胞」に關与する microRNA-133a を同定していた。国内トップクラスの high-volume center である国立がん研究センター中央病院から得られる詳細な臨床情報の付与された臨床検体とも合わせ、悪性骨軟部腫瘍（肉腫）における新たなバイオマーカーの開発、新規治療標的の同定と開発には最適の環境が整っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、多様な生物学的特徴を有する悪性骨軟部腫瘍（肉腫）の分子生物学的異常を、遺伝子からタンパク質まで重層的・包括的に解析し、临床上重要な表現型（組織型、化学療法感受性、増殖・浸潤・転移能、予後）に關与する因子（群）を明らかにすること、それによって正確な病理診断、各腫瘍の分子背景に基づく治療法の選択、特異的な分子生物学的異常をターゲットとした新たな治療法

の開発を促進することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、解析の出発材料として樹立培養細胞株など特殊な環境下に適合した検体ではなく、実際の生体（患者）内の状態を最もよく反映していると考えられる悪性骨軟部腫瘍（肉腫）の生検あるいは手術時に採取された新鮮凍結組織あるいはそのゼノグラフトを用いた。

網羅的遺伝子発現解析は GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix 社) を用い、遺伝子発現量のバリデーションは定量的 RT-PCR 等により行なった。microRNA の網羅的解析は miRNA microarray ID 021827 (Agilent Technologies) を用いて行った。網羅的タンパク質発現解析は、蛍光二次元電気泳動、質量分析を用いて行った。データマイニング (T-test, ANOVA, クラスタリング、主成分分析等) の手法を用いて臨床・病理学的特徴と關連する遺伝子・タンパク質（群）の探索を行なった。

4. 研究成果

(1) ゲノム・エピゲノム解析

軟骨肉腫、粘液線維肉腫、骨巨細胞腫の全エクソン解読ならびに全トランスクリプトーム解読を行い、体細胞ゲノム異常の包括的な同定、融合遺伝子の検出を試み、いずれの組織型においても新規ドライバー変異、融合遺伝子を同定した。また、粘液線維肉腫については約 45 万箇所の CpG メチル化を包括的に解析するための Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit を用いたエピゲノム解析を行い、粘液線維肉腫は予後と關連する 3 群に分類されることを見出した。さらに、肉腫ゼノグラフト株 10 種（軟骨肉腫、骨肉腫、類上皮肉腫、滑膜肉腫）と細胞株 2 種（骨肉腫、滑膜肉腫）の全ゲノム解析を行い、遺伝子異常情報を付与した。

(2) マイクロ RNA 解析

わが国で開発された核酸医薬である Synthetic Tough-Decoy (S-TuD) による microRNA133a の発現抑制によって、骨肉腫細胞の in vitro における浸潤能及び in vivo 移植モデルでの肺転移が抑制されることを明らかにした。また、粘液型脂肪肉腫の round cell 領域に高発現する microRNA として microRNA135b を同定した。microRNA135b 高値の患者は、低い患者に比べて予後不良であること、また in vivo 移植モデルにおいて microRNA135b の発現抑制が肺転移を抑制することなどから、microRNA135b は粘液型脂肪肉腫の新たな治療標的となりうることが示唆された。

(3) プロテオーム解析

肉腫の臨床検体および培養細胞を用いたプロテオーム解析にて、肉腫の悪性度に関連するタンパク質の同定を行った。パゾパニブに対する応答性が異なる肉腫培養細胞を用いた解析では、耐性を示す細胞株において特徴的なチロシンリン酸化酵素の発現および活性を同定し、培地中に放出されるタンパク質を同定した。粘液線維肉腫では、その浸潤性発育に関わるタンパク質を同定した。

(4) 新規病理診断マーカーの探索

肉腫特異的な遺伝子異常等を FISH や免疫染色にて検出し、病理診断バイオマーカーとして活用するため、近年文献的に報告された様々な抗体や FISH プローブの有用性について、複数症例を用いて妥当性検証を行った。具体的には、TFE3 免疫染色、WT1 遺伝子の FISH 検索、FGF23 免疫染色、USP6 遺伝子の FISH 検索等につき、その有用性を確認した。また、悪性末梢神経鞘腫瘍では H3K27me3 免疫染色の完全消失が高頻度に認められ、これと鑑別を要する腫瘍ではほとんど認められないことから、病理診断に非常に有用であることを

確認した。

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 51 件)

1. Kawai A, Araki N, Sugiura H, Yonemoto T. et al. Trabectedin monotherapy after standard chemotherapy versus best supportive care in patients with advanced, translocation-related sarcoma: a randomised, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 16(4) 406-16.2016 査読有
DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70098-7
2. Yoshida A, Goto K, Kodaira M, Kobayashi E, Kawai A. et al. CIC-rearranged Sarcomas: A Study of 20 Cases and Comparisons With Ewing Sarcomas. *Am J Surg Pathol.* 40(3) 313-23.2016 査読有
DOI: 10.1097/PAS.0000000000000570.
3. Pan X, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Current status of publicly available sarcoma cell lines for use in proteomic studies. *Expert Rev Proteomics.* 13(2) 227-40.2016 査読有
DOI: 10.1586/14789450.2016.1132166.
4. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Yoshida A, Kawai A. et al. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene.* 35(48):6177-6188.2016 査読有
DOI: 10.1038/onc.2016.157.
5. Kubota D, Kosaka N, Fujiwara T, Yoshida A, Ochiya T, Kawai A, Kondo T. et al. miR-125b and miR-100 Are Predictive Biomarkers of Response to Induction Chemotherapy in Osteosarcoma. *Sarcoma.* 1390571.2016 査読有
DOI: 10.1155/2016/1390571
6. Nezu Y, Hagiwara K, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A. et al. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene.* 35(48):6177-6188.2016 査読有
DOI: 10.1038/onc.2016.157

7. Ogura K, Hosoda F, Nakamura H, Hama N, Totoki Y, Yoshida A, Yachida S, Kawai A. et al. Highly recurrent H3F3A mutations with additional epigenetic regulator alterations in giant cell tumor of bone. Genes Chromosomes Cancer. 2016 査読有 DOI: 10.1002/gcc.22469.
8. Kikuta K, Morioka H, Kawai A, Kondo T. Global protein-expression profiling for reclassification of malignant fibrous histiocytoma. Biochim Biophys Acta. 1854(6) 696-701.2015 査読有 DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.08.012
9. Yoshida A, Asano N, Kawai A, Kawamoto H, Nakazawa A, Kishimoto H, Kushima R. Differential SALL4 immunoexpression in malignant rhabdoid tumours and epithelioid sarcomas. Histopathology. 66(2) 252-61.2015 査読有 DOI: 10.1111/his.12460
10. Yoshida A, Yoshida H, Yoshida M, Mori T, Kobayashi E, Kawana K, Kawai A. et al. Myoepithelioma-like Tumors of the Vulvar Region: A Distinctive Group of SMARCB1-deficient Neoplasms. Am J Surg Pathol. 39(8)1102-13.2015 査読有 DOI: 10.1097/PAS.0000000000000466
11. Fujiwara T, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T, et al. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. Stem Cells. 32(4) 959-73.2014.2014 査読有 DOI: 10.1002/stem.1618
12. Yoshida A, Narita Y, Kawai A, Asamura H, et al. STAT6 immunohistochemistry is helpful in the diagnosis of solitary fibrous tumors. Am J Surg Pathol. 38(4) 552-9.2014 査読有 DOI: 10.1097/PAS.0000000000000137
13. Fujiwara T, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai A. et al. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. Stem Cells. 32(4) 959-73.2014 査読有 DOI: 10.1002/stem.1618

〔学会発表〕(計 53 件)

1. Akira Kawai, Challenges and resource stratified management of soft tissue sarcoma treatment in Asia. Introduction. ESMO Asia 2016, 2016年12月16日～2016年12月19日, Singapore.
2. Akira Kawai, The role of Guidelines in improving patient care in Soft Tissue Sarcomas. ESMO Asia 2015, 2015年12月18日～2015年12月21日, Singapore.
3. Akira Kawai, The role of Guidelines in improving patient care in Soft Tissue Sarcomas. ESMO Asia 2015, 2015年12月18日～2015年12月21日, Singapore.
4. 川井 章, Ewing Sarcoma(ESFT). 8th SIOP Asia Congress, 2014年04月17日～2014年04月19日, Seoul, Korea

〔図書〕(計 11 件)

1. Fujiwara T, Fujita Y, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Academic Press, Inc. Epigenetic Biomarkers and Diagnostics, 1st Edition.2016. 613-642.
2. 川井 章. 南山堂.肉腫化学療法マスタークラス.2015.367.

〔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

6. 研究組織
 (1)研究代表者
 川井 章(KAWAI, Akira)

国立がん研究センター中央病院・骨軟部腫瘍・リハビリテーション科・科長
研究者番号：90252965

(2)研究分担者

近藤 格 (KONDO, Tadashi)
国立がん研究センター研究所・希少がん研究分野・分野長
研究者番号：30284061

落谷 孝広 (OCHIYA, Takahiro)
国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・主任分野長
研究者番号：60192530

市川 仁 (ICHIKAWA, Hitoshi)
国立がん研究センター研究所・臨床ゲノム解析部門・部門長
研究者番号：30284061

吉田 朗彦 (YOSHIDA, Akihiko)
国立がん研究センター中央病院・病理科・医員
研究者番号：80574780

細野 亜古 (HOSONO, Ako)
国立がん研究センター東病院・小児腫瘍科・医長
研究者番号：00602947

小倉 浩一 (OGURA, Koichi)
国立がん研究センター中央病院・骨軟部腫瘍・リハビリテーション科・がん専門修練医
研究者番号：20583115

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者

()