

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861182

研究課題名(和文) 淡明細胞肉腫に対するマイクロRNAを標的とした新治療法の確立

研究課題名(英文) a novel therapy targeting miRNA of clear cell sarcoma

研究代表者

永野 昭仁 (Nagano, Akihito)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60422721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：淡明細胞肉腫は悪性度の高い軟部腫瘍である。淡明細胞肉腫の癌化には、融合遺伝子EWS/ATF1が重要な役割を果たすが、EWS/ATF1と様々ながん種のがん化に関与されると報告されているmicroRNA (miR)との関連は未だ不明である。

siRNAを用いてEWS/ATF1をknockdownさせてmiR発現の変化をmicroarrayで確認したところ、miR-3127-5pが最もupregulateされていた。淡明細胞肉腫cell lineにmiR-3127-5pを導入することで、細胞増殖は抑制され、また遊走能も低下することが判明した。これらは淡明細胞肉腫に対する新たな治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Clear cell sarcoma is one of malignant soft tissue sarcoma and EWS/ATF1, chimeric fusion gene, plays important role of tumorigenesis. The objective of this research is to reveal the relationship between EWS/ATF1 and microRNA (miRNA). An siRNA targeting EWS/ATF1 made miR-3127-5p to be upregulated. Transfection of miR-3127-5p to clear cell sarcoma cell line revealed both a suppression of cell proliferation and migratory capacity. These findings suggest miR-3127-5p has a potential to be a novel target of clear cell sarcoma treatment.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：clear cell sarcoma miRNA siRNA microarray

1. 研究開始当初の背景

淡明細胞肉腫 (Clear Cell Sarcoma; 以下 CCS) は悪性軟部腫瘍の 2-3% の頻度で、20-40 歳代の若年成人に発生することが多いとされている。治療は手術による腫瘍切除が原則である。しかしながら淡明細胞肉腫は局所再発、遠隔転移を来しやすく、化学療法や放射線治療といった補助療法に抵抗性であるため、その 5 年生存率は 54% と予後不良である。有効な補助療法の確立が急務であるが、比較的にまれな腫瘍であり大規模な前向き試験などは非常に困難であり、有用な治療法の研究は数えるほどしかないのが現状である。

申請者らは悪性骨軟部腫瘍で比較的多くみられる融合遺伝子、特に Ewing 肉腫で見られる EWS/Fli-1 キメラ遺伝子について研究を行ってきた。融合遺伝子やその標的遺伝子、またシグナル伝達経路を明らかにすることで、腫瘍に特異的であり、そのため正常細胞に影響の少ない治療法の確立が可能になると考えられるためである。実際に EWS/Fli-1 そのものや、その標的遺伝子を siRNA でノックダウンすることで、腫瘍増大を抑制できることを動物実験レベルで証明している。

Ewing 肉腫と同様に淡明細胞肉腫に関しても、融合遺伝子 EWS/ATF1 が同定されていたが、その機能やがん化プロセスへの関与などについてはほとんど知られていなかった。2013 年申請者らは EWS/ATF1 が実際に淡明細胞肉腫の腫瘍化に関与していることを世界で初めて明らかにし、EWS/ATF1 およびその標的遺伝子が淡明細胞肉腫の治療標的となりうることを報告した。

淡明細胞肉腫においても他のがん種と同様に miR が、腫瘍化に関連する様々なプロセスに関与していると考えられるが、これまでに EWS/ATF1 と miR との関連については全く判明していない。EWS/ATF1 によって調節される miR を明らかにし、その経路をブロックすることで淡明細胞肉腫の新しい治療法を確立できるのではないかと考えた。

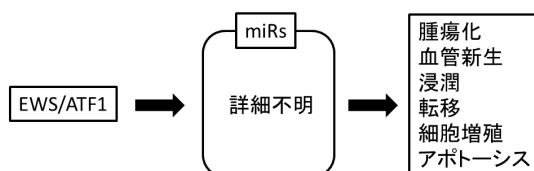


図: EWS/ATF1 と miRs との関連。他のがん種と同様に miR は腫瘍化のさまざまなプロセスに関与していると考えられるが、その詳細は未だ不明である。

2. 研究の目的

淡明細胞肉腫は比較的若年に発症する悪性度の高い軟部腫瘍であり、化学療法や放射線治療に抵抗性の予後不良な疾患である。近年、様々ながん種に対して microRNA (miR) がその細胞増殖やアポトーシス、浸潤や転移

などに関与していることが報告されているが、淡明細胞肉腫と miR との関連については不明である。

本研究では未だ有効な補助療法の確立していない、淡明細胞肉腫に対する miR による全く新しい治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

EWS/ATF1 の knock down を行うべく siRNA の作成およびその knock down 効率の確認を行う。siRNA は EWS/ATF1 融合遺伝子を標的としてデザインする。knock down 効果は複数の CCS cell line に対して siRNA を導入し、その至適条件を確定する。その後コントロール siRNA と EWS/ATF1 を標的とした siRNA を作用させた CCS cell line に対して Micro array による miR の発現プロファイルの変化を同定する。

EWS/ATF1 によって発現プロファイルに変化のあった miR について文献検索を行い、これまでに判明しているその機能を確認する。未だ機能が報告されていない miR も含めて治療標的となる可能性のある miR をピックアップし、それらの miR について機能解析を行う。

実験方法

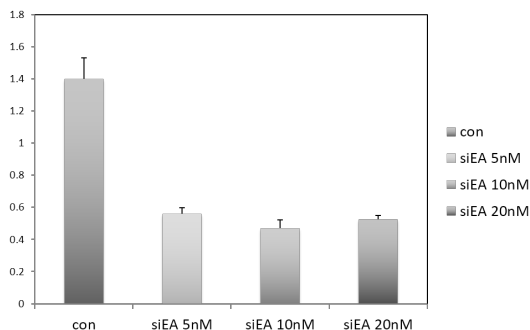
- (1) EWS/ATF1 に対する siRNA の作成
EWS/ATF1 の breakpoint を含んだ配列を標的とした siRNA をデザインする。複数の siRNA 候補を CCS cell line にトランスフェクションし、最も knock down 効率の良い siRNA を選択する。また、トランスフェクションの至適条件についても検討する。
- (2) EWS/ATF1 が knock down された CCS 細胞からの total RNA 抽出
(1) で作成した siRNA とコントロール siRNA をそれぞれ CCS cell line にトランスフェクションし、total RNA を抽出する。複数の CCS cell line で同様の実験を行い、サンプルを採取する。それぞれの cell line において knock down 効果が得られているかどうかは、real time PCR および Western blotting により検証する。
- (3) Micro array による miR 発現プロファイルの同定
(2) で得られたサンプルを Micro array および realtime PCR にて miR 発現相対定量解析を行う。EWS/ATF1 の発現している CCS cell line と EWS/ATF1 を knock down したコントロールから得られたサンプルの miR 発現プロファイルを比較することで、EWS/ATF1 によって調節を受ける miR の同定を行う。なお Micro array および、miR 発現相対定量解析は外注で

行う。

- (4) 治療標的候補となる miR を CCS cell line において、Ambion® Anti-miR™ miRNA Inhibitor などの阻害剤を用いて downregulate させることで、腫瘍細胞の増殖速度や細胞形態、浸潤能に変化を生じるかどうかについて検討をおこなう。さらに EWS/ATF1 を有さない cell line (NIH3T3) に、標的となる miR を導入することで同様の変化が観察されるかどうかを確認することで、EWS/ATF1 が調節を行っている腫瘍化に関連する miR を同定することができ、また、その機能を阻害することで、CCS 細胞に対する治療効果が得られるかどうかを検証することができると考えられる。効果が確認できれば他の cell line (A673、HT1080) においても同様の効果を示すかどうか検討を行う。

4. 研究成果

- (1) siRNA の作成と knockdown 効率の確認： CCS の融合遺伝子の breakpoint を標的とした siRNA (siEWS/ATF1; siEA) を作成し、CCS cell line に transfection したところ control siRNA と比較して 93% の knockdown を確認できた。また、CCS cell line の細胞増殖を有意に抑制した。



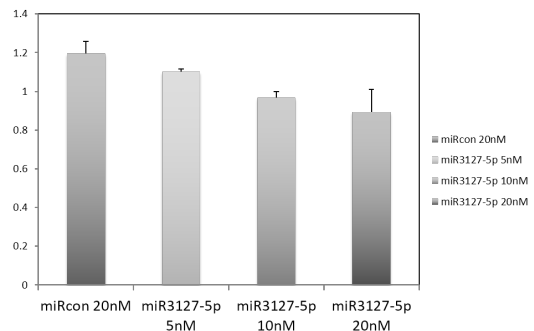
図：EWS/ATF1 に対する siRNA のトランスフェクションによって、CCS cell line の細胞増殖は抑制された。

- (2) microarray による miRNA 発現プロファイル変化の同定： control siRNA と siEA をそれぞれ transfection した CCS cell line より total RNA を抽出し、microarray で miRNA 発現プロファイル変化を確認した。結果、30 種類の miRNA の発現が有意に増強していた。その中で最も発現量が upregulate されていた miR-3127-5p の解析を行うこととした。

- (3) miR-3127-5p の機能解析： siEA の transfection によって発現量が変化する mRNA についても microarray を行ったところ、GATA5 遺伝子の発現量が最も抑制

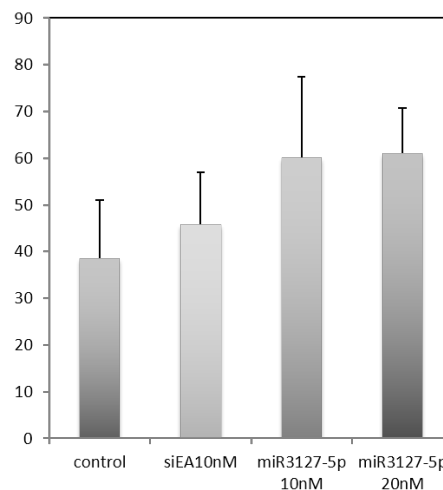
されていた。GATA5 は zinc-finger 転写因子であり、細胞の分化に関与するとされており、消化管腫瘍、卵巣腫瘍、泌尿器科系腫瘍において癌化に関連しているという報告があるが、肉腫との関連についての報告はなされていない。

CCS cell line に siEA を transfection し、EWS/ATF1 を knock down した状態で、GATA5 mRNA 発現量を RT-PCR で確認したところ有意に減少していた。また、miR3127-5p を CCS cell line に導入したところ GATA5 mRNA 発現量は有意に減少し、CCS cell line 細胞増殖を抑制した。さらに wound healing assay においても



wound healing を遅延させることを確認した。

図：miR3127-5p のトランスフェクションによって CCS cell line の細胞増殖は濃度依存性に抑制された。



図：wound healing assay miR3127-5p のトランスフェクションによって CCS cell line の遊走能は低下した。

- (4) GATA5 の機能解析： GATA5 に対する siRNA (siGATA5) を作成し、CCS cell line に transfection したところ、細胞増殖は抑制された。また、wound healing assay においては wound healing を遅延させていた。

以上より淡明細胞肉腫の EWS/ATF1 融合遺伝子は miR3127-5p の発現を抑制し、そ

の下流に存在する GATA5 の発現を増強することにより、細胞増殖および細胞遊走能を促進していることが明らかとなった。すなわち、miR3127-5p の導入、GATA5 の抑制が淡明細胞肉腫の新しい治療法となる可能性が示された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野昭仁 (Nagano Akihito)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60422721

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：