

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：20101
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K09112
研究課題名（和文）骨軟部腫瘍における転移診断バイオマーカーの同定と治療応用可能な融合遺伝子の探索

研究課題名（英文）Investigation of druggable fusion genes and diagnostic biomarker in bone and soft tissue sarcoma

研究代表者
濱田 修人（Hamada, Shuto）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90813626
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：骨軟部腫瘍で比較的多くの組織型で認められている融合遺伝子の同定し、このバイオマーカーを標的とした治療法を開発することで、骨軟部腫瘍の予後改善のための研究基盤を確立する。われわれは予後不良な類上皮肉腫にて解析を行った。15歳男性の類上皮肉腫である下腿軟部腫瘍の腫瘍サンプルから、9個の融合遺伝子候補を同定した。この中でGATSL2×GTF21のみが融合していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

類上皮肉腫は今でも予後が改善されていない予後不良な肉腫の1つである。類上皮肉腫では腫瘍特異的な融合遺伝子は同定されておらず、我々はこの融合遺伝子の同定し、それを標的とした治療法を開発することで、予後改善のための研究基盤を確立する。次世代シーケンサーを用いた解析によって、1つの融合遺伝子候補を同定した。現在治療の標的になる融合遺伝子かの解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：Fusion genes have been reported to occur in several bone and soft tissue sarcomas (BSTT). We tried to detect new druggable fusion genes to improve overall survival in BSTT. Especially, we analyzed fusion genes of epithelioid sarcoma. We identified nine candidates of fusion genes in a tumor sample of a 15 year-old Japanese patient, using next-generation sequences. Of them, GATSL2×GTF21 was confirmed to be a fusion.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨軟部腫瘍 融合遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍においては、さまざまな組織型で腫瘍特異的な融合遺伝子が同定されている。この融合遺伝子は診断に有用であることがほとんどであるが、その一部で治療への応用が期待されている組織型もある。しかし発癌に関係する driver 分子で、治療へも応用されている融合遺伝子はいまだ存在しない。組織検体から融合型キナーゼのような癌化にも関連する融合遺伝子を同定し、転移診断、さらに治療へも応用できれば、骨軟部腫瘍に対する画期的治療につながり、予後改善が期待できる。われわれは、現在でも融合遺伝子が同定されていない組織型に着目し、draggable な融合遺伝子の同定を行うこととした。類上皮肉腫は予後不良で、これまで融合遺伝子の存在が示されていない肉腫の 1 つである。われわれは類上皮肉腫の新規細胞株 (ESX) を樹立した (Emori M, et al. Plos One 2013) ことで、類上皮肉腫にて融合遺伝子の解析を行った。これまで ESX にて候補となる融合遺伝子は同定している (図)。しかし細胞株ではなく腫瘍サンプルからの融合遺伝子同定を目指した。

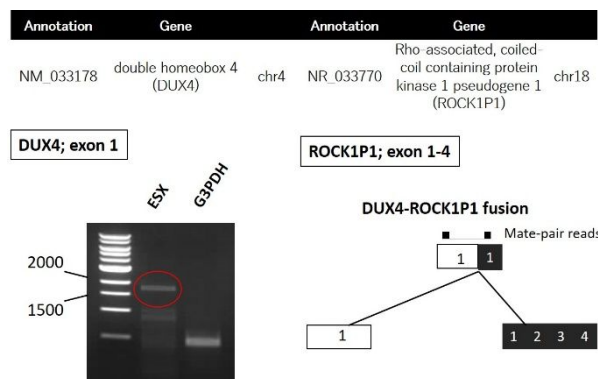


図 ESX における融合遺伝子候補

2. 研究の目的

予後不良な軟部肉腫の 1 つである類上皮肉腫における draggable な融合遺伝子の同定を行うこととした。

3. 研究の方法

次世代シーケンスを用いた融合遺伝子解析

(1) 転移腫瘍組織の採取と保存法

部分肺切除により採取した肺転移巣の保存には、新鮮な腫瘍組織 (5mm³ 大の組織を二つ) を、二本の保存チューブ (Nunc tube) 内の保存液 (RNA later) に浸漬し、-20 に保存する。あるいはホルマリン固定され、パラフィンに包埋されている肺転移腫瘍組織を用いる。

(2) 腫瘍組織からの RNA 抽出

RNA later に保存した組織からの RNA 抽出には、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋組織からの RNA 抽出には、RecoverAll™ (ThermoFischer) を用いる。

(3) 候補融合遺伝子の検出

Illumina 社の HiSeq 2000 を利用して取得したペアエンドリード配列を用いて、融合遺伝子を検出する。deFuse と FusionHunter の 2 種類のソフトウェアを用いる。

(4) 候補融合遺伝子の真正性確認

候補となる融合遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて、数種の類上皮肉腫細胞株で確認する。

4 . 研究成果

15 歳男性の類上皮肉腫である下腿軟部腫瘍の腫瘍サンプルを用いた。Illumina 社の HiSeq 2000 を利用して取得したペアエンドリード配列を用いて、融合遺伝子を検出した。deFuse と FusionHunter の 2 種類のソフトウェアを用いた。候補となった融合遺伝子のうち、いずれの遺伝子も coding location にあるものを最初に解析した。その数は 9 個である。それらは、CES4A x TMEM26、C20orf111 x FITM2 、 DDX58 x TOPORS、ASF1B x PRKACA、DPM2 x PIP5KL1、GATSL2 x GTF2I 、 GNG10 x UGCG 、 AC008993.1 x WASH1、AC010506.1 x ZNF600 である。当科で樹立した類上皮肉腫細胞株 ESX では、1 つも融合が確認できた遺伝子配列はなかった。そこで、福岡大学から分与してもらった類上皮肉腫細胞株 FU-EPS-1 を使用して検討した。融合部をまたぐように Primer を設計し、FU-EPS-1 の cDNA において融合が確認できたのは、GATSL2 x GTF2I のみであった。この融合に関しては Sequence にて融合していることを確認した。類上皮肉腫に特異的な配列であるか検討するために、類上皮肉腫以外肉腫細胞株で検討を行った。用いた肉腫細胞株は骨肉腫細胞株 OS2000、骨 MFH 細胞株 MFH03 である。いずれの細胞株でも同様の配列が検出された。したがってこの GATSL2 x GTF2I 配列は、類上皮肉腫特異的ではなかったが、この融合配列の機能的な意義に関して、今後検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件(うち査読付論文 13件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件)

1. 著者名 Tsuchie Hiroyuki, Emori Makoto, Nagasawa Hiroyuki, Miyakoshi Naohisa, Murahashi Yasutaka, Shimizu Junya, Mizushima Emi, Yamashita Toshihiko, Shimada Yoichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Prognosis of Primary Osteosarcoma in Elderly Patients: A Comparison between Young and Elderly Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Principles and Practice	6. 最初と最後の頁 425 ~ 431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000500404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TSUCHIE HIROYUKI, EMORI MAKOTO, MIYAKOSHI NAOHISA, NAGASAWA HIROYUKI, OKADA KYOJI, NANJYO HIROSHI, MURAHASHI YASUTAKA, MIZUSHIMA EMI, SHIMIZU JUNYA, YAMASHITA TOSHIHIKO, SHIMADA YOICHI	4. 巻 33
2. 論文標題 Prognostic Impact of CD44 Expression in Patients With Myxofibrosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2095 ~ 2102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Emori Makoto, Tsuchie Hiroyuki, Nagasawa Hiroyuki, Sonoda Tomoko, Tsukamoto Arihiko, Shimizu Junya, Murahashi Yasutaka, Mizushima Emi, Takada Kohichi, Murase Kazuyuki, Iesato Kotoe, Igarashi Keita, Hori Tsukasa, Yamamoto Masaki, Sugita Shintaro, Miyakoshi Naohisa, Hasegawa Tadashi, Shimada Yoichi, Yamashita Toshihiko	4. 巻 2019
2. 論文標題 Early Lymph Node Metastasis May Predict Poor Prognosis in Soft Tissue Sarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/6708474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakahashi Naoya, Emori Makoto, Tsuchie Hiroyuki, Nagasawa Hiroyuki, Sonoda Tomoko, Takada Kohichi, Miyajima Masahiro, Watanabe Atsushi, Shimada Yoichi, Yamashita Toshihiko	4. 巻 120
2. 論文標題 Treatment outcome of chest wall soft tissue sarcomas: Analysis of prognostic factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1235 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jso.25708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Kazuhiro, Mizusawa Junki, Naka Norifumi, Kawai Akira, Katagiri Hirohisa, Hiruma Toru, Matsumoto Yoshihiro, Tsuchiya Hiroyuki, Nakayama Robert, Hatano Hiroshi, Emori Makoto, et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 Ten-year follow-up results of perioperative chemotherapy with doxorubicin and ifosfamide for high-grade soft-tissue sarcoma of the extremities: Japan Clinical Oncology Group study JCOG0304	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-6114-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Tomonori, Yoshimoto Mitsunori, Terashima Yoshinori, Tanimoto Katsumasa, Iesato Noriyuki, Ogon Izaya, Oshigiri Tsutomu, Teramoto Atsushi, Emori Makoto, Takashima Hiroyuki, Hirota Ryosuke, Fujimoto Shutaro, Yamashita Toshihiko	4. 巻 45
2. 論文標題 Do We Have Adequate Flexion-extension Radiographs for Evaluating Instability in Patients With Lumbar Spondylolisthesis?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SPINE	6. 最初と最後の頁 48 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000003203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagano Akihito, Matsumoto Seiichi, Kawai Akira, Okuma Tomotake, Hiraga Hiroaki, Matsumoto Yoshihiro, Nishida Yoshihiro, Yonemoto Tsukasa, Hosaka Masami, Takahashi Mitsuru, Yoshikawa Hideki, Kunisada Toshiyuki, Asanuma Kunihiro, Naka Norifumi, Emori Makoto, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Osteosarcoma in patients over 50 years of age: Multi-institutional retrospective analysis of 104 patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 319 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2019.04.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TSUCHIE HIROYUKI, EMORI MAKOTO, MIYAKOSHI NAOHISA, NAGASAWA HIROYUKI, OKADA KYOJI, MURAHASHI YASUTAKA, MIZUSHIMA EMI, SHIMIZU JUNYA, YAMASHITA TOSHIHIKO, SHIMADA YOICHI	4. 巻 39
2. 論文標題 Impact of Acridine Orange in Patients With Soft Tissue Sarcoma Treated With Marginal Resection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6365 ~ 6372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13849	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayasaka Naotaka, Takada Kohichi, Nakamura Hajime, Arihara Yohei, Kawano Yutaka, Osuga Takahiro, Murase Kazuyuki, Kikuchi Shohei, Iyama Satoshi, Emori Makoto, Sugita Shintaro, Hasegawa Tadashi, Takasawa Akira, Miyanishi Koji, Kobune Masayoshi, Kato Junji	4. 巻 9
2. 論文標題 Combination of eribulin plus AKT inhibitor evokes synergistic cytotoxicity in soft tissue sarcoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42300-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama Tomoyuki, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Ono Yusuke, Emori Makoto, Murata Masaki, Hayasaka Takahiro, Fujitani Naoki, Osanai Makoto, Yamashita Toshihiko, Hasegawa Tadashi, Sawada Norimasa	4. 巻 189
2. 論文標題 Identification of Coiled-Coil Domain-Containing Protein 180 and Leucine-Rich Repeat-Containing Protein 4 as Potential Immunohistochemical Markers for Liposarcoma Based on Proteomic Analysis Using Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.01.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murahashi Yasutaka, Emori Makoto, Shimizu Junya, Anzai Ken, Tanaka Takaaki, Naka Norifumi, Tsuchie Hiroyuki, Nagasawa Hiroyuki, Miyakoshi Naohisa, Shimada Yoichi, Yamashita Toshihiko	4. 巻 30
2. 論文標題 The value of the black fiber sign on T1-weighted images for predicting stability of desmoid fibromatosis managed conservatively	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Radiology	6. 最初と最後の頁 5768 ~ 5776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00330-020-06953-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TSUCHIE HIROYUKI, EMORI MAKOTO, MIYAKOSHI NAOHISA, NAGASAWA HIROYUKI, OKADA KYOJI, MURAHASHI YASUTAKA, MIZUSHIMA EMI, SHIMIZU JUNYA, YAMASHITA TOSHIHIKO, SHIMADA YOICHI	4. 巻 34
2. 論文標題 Prognostic Significance of Histological Subtype in Soft Tissue Sarcoma With Distant Metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1975 ~ 1980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11994	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Junya, Emori Makoto, Murahashi Yasutaka, Sonoda Tomoko, Mishina Taijiro, Miyajima Masahiro, Watanabe Atsushi, Sugita Shintaro, Takada Kohichi, Murase Kazuyuki, Hasegawa Tadashi, Yamashita Toshihiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Pulmonary metastasectomy is associated with prolonged survival among patients with bone and soft tissue sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 429-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2020.2009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchie Hiroyuki, Emori Makoto, Miyakoshi Naohisa, Okada Kyoji, Nagasawa Hiroyuki, Murahashi Yasutaka, Mizushima Emi, Shimizu Junya, Yamashita Toshihiko, Shimada Yoichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Prognostic Factors in Patients with Distant Soft Tissue Metastasis of Carcinoma: A Clinicopathological Study of 16 Cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Principles and Practice	6. 最初と最後の頁 538 ~ 543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508463	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamura Yuji, Emori Makoto, Takahashi Nobuyuki, Chiba Mitsumasa, Shimizu Junya, Murahashi Yasutaka, Sugita Shintaro, Iba Kousuke, Hasegawa Tadashi, Yamashita Toshihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Osteofibrous dysplasia-like adamantinoma treated via intercalary segmental resection with partial cortex preservation using pedicled vascularized fibula graft: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-020-01983-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱田修人, 塚原智英, 江森誠人, 久保輝文, 金関貴幸, 廣橋良彦, 山下敏彦, 鳥越俊彦.
2. 発表標題 骨肉腫に対する養子免疫療法を目指したPBF TCRレトロウイルス産生細胞の樹立
3. 学会等名 34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	江森 誠人 (EMORI Makoto) (20580286)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究 分担者	塚原 智英 (TSUKAHARA Tomohide) (20404634)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------