

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591719
 研究課題名 (和文) 新規癌関連蛋白 C7orf24 を標的として骨軟部肉腫の分子標的治療
 研究課題名 (英文) Molecular therapy for bone and soft tissue sarcomas targeting a new cancer-associated protein, C7orf24.
 研究代表者
 中山 富貴 (NAKAYAMA TOMITAKA)
 京都大学・医学研究科・講師
 研究者番号：80335273

研究成果の概要：

膀胱癌の治療標的分子として同定された C7orf24 の骨肉腫における意義を明らかにすることを目的とした。C7orf24 は骨肉腫腫瘍組織で高発現していたが、発現導入実験では、明らかな表現型を誘導できず、発現抑制実験では特定の細胞株では著しい形態変化を導いたが、普遍的な現象ではなかった。アポトーシス等の細胞死との関連も検出されず、C7orf24 の骨肉腫における治療標的としての明確な意義を示す結果は得られなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：C7orf24、骨軟部肉腫、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は最も頻度の高い原発性悪性骨腫瘍である。1970年代から採用された多剤併用大量化学療法の実進により治療成績は向上し、現在専門施設での5年生存率は約70%に達している。しかし最近10年間での進歩は認められず、残った30%は既存の治療法に対して抵抗性であり、組み合わせ、あるいは投与方法の変更では大きな進歩は期待できず、新規の治療法の開発が切望されている。近年、各悪性腫瘍に対して科学的根拠に基づいた特定の分子を標的とした治療法が開発されてきている。また siRNA により標的遺伝子の発現を特異的に抑制する方法の開発により、

遺伝子治療も新しい局面を迎えている。骨肉腫においても、Ezrin が悪性度に関連した遺伝子として同定され、その下流の mTOR を標的とした Rapamycin の臨床試験が進められている、明らかな治療成績の向上は報告されていない。連携研究者 (戸口田) は、滋賀医科大学泌尿器科・吉貴達寛准教授との共同研究によるプロテオーム解析により、膀胱癌の分子標的となりうる新規分子 C7orf24 を同定した (Kageyama, et al. Proteomics Clin Appl, 2007)。C7orf24 は正常膀胱粘膜に比べて膀胱癌で発現量が著しく増加している蛋白として同定されたもので、特異的 siRNA を用いた遺伝子発現抑制により、膀胱癌細胞の

増殖が阻害される。その後の解析により、研究代表者らは骨肉腫細胞株の中に C7orf24 を発現しているものが存在することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、C7orf24 の骨肉腫における分子標的治療の対象としての意義を明らかにし、臨床応用へ向けての基盤となるデータを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨肉腫組織における C7orf の発現の解析：定量的 RT-PCR 及び免疫組織染色により、発現を解析し、臨床病理学的データと対比することで、その意義を解明した。

(2) C7orf24 の細胞内局在の解明：C7orf24 の細胞内局在を明らかにした。標識蛋白との融合蛋白を作成し、強制発現系により細胞内局在を明らかにした。

(3) C7orf24 の機能解析：siRNA による発現抑制及び遺伝子導入による発現誘導により、生物学的効果を解明する。また発現抑制及び発現誘導の前後での網羅的解析から下流遺伝子群を同定した。

4. 研究成果

(1) ヒト骨肉腫組織における C7orf24 の発現の解析：約 40 例の骨肉腫腫瘍組織より抽出した RNA を用いて、定量的 RT-PCR 法による発現解析を行ったところ、正常骨細胞に比べてほぼ全例で高値を示した。しかし臨床病理学的データとの対比では、特定の相関は見出せなかった。

(2) C7orf24 の細胞内局在の解明：pCAGGS に C7orf24 を組み込んだ発現ベクターを 293 細胞に導入し、C7orf24 蛋白の細胞内発現部位を同定したところ、主として細胞質に陽性であった。

(3) C7orf24 の機能解析：

①pCAGGS-C7orf24 発現ベクターを、C7orf24 陰性骨肉腫細胞株である G292 に導入し、細胞形態、増殖能、移動能及び浸潤能に対する一過性の影響を解析したが、親株との間には有意な相違は認められなかった。

②shRNA 発現ベクターを用いて、永続的にノックダウンした場合の影響を解析した。

siRNA で増殖抑制が認められた配列を用いた shRNA 発現ベクターでは、siRNA 同様に増殖能、浸潤能の抑制が観察されたが、他の配列では、C7orf24 発現抑制効果と生物学的影響の間に解離が認められた。骨肉腫株 HOS で観察された C7orf24 に対する siRNA による著しい形態変化の再現性を、他の肉腫細胞株を用いた解析した。その結果、同様な変化を示した細胞株は検出されなかった。

③アポトーシスへの関連性を、上記の発現誘

導系及び抑制系を用いて解析したが、これまでのところ有意な関連性を示す結果は得られなかった。

④C7orf24 の機能を理解するために、イースト・ツーハイブリッドシステムを用いた結合タンパクの同定を試み、結果として二つの分子が同定された。

分子 A：ヒストン脱アセチル化酵素を標的部位にリクルートすることで、ホルモン核受容体による転写抑制作用を補助する分子であった。この分子に対する siRNA を作製し、骨肉腫細胞株における発現を抑制したところ、C7orf24 を抑制した場合と同様な結果が得られ、両者の機能的関連性を示唆する結果が得られた。

分子 B：プロテアーゼ阻害剤ファミリーに属する蛋白であった。腫瘍組織における発現を解析したところ、C7orf24 と同調して発現が亢進しているという結果が得られた。siRNA による発現抑制では、C7orf24 とは異なる結果が得られた。

以上の二つの分子が、in vivo において C7orf24 と結合するかどうかについて、内因性蛋白同士の免疫共沈降での確認を試みたが、結合は証明されなかった。次に C7orf24 の強制発現系を用いた免疫共沈降実験を行ったが、やはり結合は証明されず、両者が in vivo において結合していることを示す結果は得られなかった。

以上の解析より、C7orf24 の発現は、特定の肉腫細胞株においては、著しい形態変化を伴う増殖抑制効果をもつが、普遍的なものではないと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Toguchida J, Nakayama T. Molecular genetics of sarcomas: Applications to diagnoses and therapy. *Cancer Sci*, in press. 査読有
- 2) Nagayama S, Yamada E, Kohno Y, Aoyama T, Fukukawa C, Kubo H, Watanabe G, Katagiri T, Nakamura Y, Sakai Y, Toguchida J. Inverse correlation of the up-regulation of FZD10 expression and the activation of beta-catenin in synchronous colorectal tumors. *Cancer Sci*. 100(3): 405-12, 2009. 査読有
- 3) Matsubara H, Watanabe M, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Kamitsuji Y, Watanabe KI, Nishiyo K, Toguchida J, Nakahata T, Adachi S. Involvement of ERK activation in human osteosarcoma cell resistance to the HDAC inhibitor FK228. *J Pharmacol Exp Ther*, 328(3): 839-48, 2009. 査読有
- 4) Fukukawa C, Nagayama S, Tsunoda

- T, Toguchida J, Nakamura Y, Katagiri T. Activation of the non-canonical Dvl-Rac1-JNK pathway by Frizzled homologue 10 in human synovial sarcoma. *Oncogene*, 28(8): 1110-20, 2009. 査読有
- 5) Watanabe M, Adachi S, Matsubara H, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Watanabe KI, Kamitsuji Y, Toyokuni SY, Hosoi H, Sugimoto T, Toguchida J, Nakahata T. Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation. *Int J Cancer*, 124(1): 55-67, 2008. 査読有
- 6) Chen F, Miyahara R, Bando T, Okubo K, Watanabe K, Nakayama T, Toguchida J, Date H. Prognostic factors of pulmonary metastasectomy for osteosarcomas of the extremities. *Eur J Cardiothorac Surg*, 34(6): 1235-9, 2008. 査読有
- 7) Ueda T, Naka N, Araki N, Ishii T, Tsuchiya H, Yoshikawa H, Mochizuki K, Tsuboyama T, Toguchida J, Ozaki T, Murata H, Kudawara I, Tanaka K, Iwamoto Y, Yazawa Y, Kushida K, Otsuka T, Sato K. Validation of radiographic response evaluation criteria of preoperative chemotherapy for bone and soft tissue sarcomas: Japanese Orthopaedic Association Committee on Musculoskeletal Tumors Cooperative Study. *J Orthop Sci*, 13(4): 304-12, 2008. 査読有
- 8) Ishibe T, Nakayama T, Aoyama T, Nakamura T, Toguchida J. Neuronal differentiation of synovial sarcoma and its therapeutic application. *Clin Orthop Rel Res*, 466(9): 2147-55, 2008. 査読有
- 9) Nakayama T, Tsuboyama T, Toguchida J, Hosaka T, Nakamura T. Natural course of desmoid-type fibromatosis. *J Orthop Sci*, 13(1): 51-5, 2008. 査読有
- 10) Furukawa C, Hanaoka H, Nagayama S, Tsunoda T, Toguchida J, Endo K, Nakamura Y, Katagiri T. Radioimmunotherapy of human synovial sarcoma using a monoclonal antibody against FZD10. *Cancer Sci*, 99(2): 432-40, 2008. 査読有
- 11) Takenaka S, Ueda T, Naka N, Araki N, Hashimoto N, Myoui A, Ozaki T, Nakayama T, Toguchida J, Tanaka K, Iwamoto Y, Matsumine A, Uchida A, Ieguchi M, Kaya M, Wada T. Prognostic implication of *SYT-SSX* fusion type in synovial sarcoma: A multi-institutional retrospective analysis in Japan. *Oncology Report*, 19(2): 467-476, 2008. 査読有
- 12) Kageyama S, Iwaki H, Inoue H, Isono T, Yuasa T, Nogawa M, Maekawa T, Ueda M, Kajita Y, Ogawa O, Toguchida J, Yoshiki T. A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. *Proteomics Clin Appl*, 1: 192-199, 2007. 査読有
- [学会発表] (計 28 件)
- 1) 戸口田淳也. 網羅的解析からの骨軟部腫瘍へのアプローチ. 第 2 回東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンターシンポジウム (2008.11.25 東京)
- 2) 中山富貴, 戸口田淳也, 他. 体外処理骨を用いた悪性骨腫瘍切除後再建. 第 17 回小児固形腫瘍研究会 (2008.11.21 京都)
- 3) 布留守敏, 中山富貴, 戸口田淳也, 他. 肉腫における転移関連新規因子 C7059 の機能解析. 第 67 回日本癌学会総会 (2008.10.29 名古屋)
- 4) 戸口田淳也, 中山富貴, 他. 肉腫において組織幹細胞としての特質は癌幹細胞としての特質に連関するものか. 第 67 回日本癌学会総会 (2008.10.29 名古屋)
- 5) 金永輝, 中山富貴, 戸口田淳也, 他. 肉腫における ras 遺伝子の変異解析. 第 67 回日本癌学会総会 (2008.10.28 名古屋)
- 6) 長山聡, 戸口田淳也, 他. 大腸癌にて高発現している新規遺伝子の免疫組織化学染色による発現解析. 第 67 回日本癌学会総会 (2008.10.28 名古屋)
- 7) 布留守敏, 中山富貴, 戸口田淳也, 他. 肉腫転移関連因子 C7059 の機能解析. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2008.10.24 京都)
- 8) 青山朋樹, 中山富貴, 戸口田淳也, 他. 分化誘導プロファイルを用いた肉腫起源細胞へのアプローチ. 第 41 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2008.7.18 浜松)
- 9) 戸口田淳也. 遺伝子発現プロファイルからみた骨・軟部腫瘍の起源・分類・診断. 第 41 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2008.7.17 浜松)
- 10) 布留守敏, 中山富貴, 戸口田淳也, 他. 肉腫転移関連因子 C7059 の機能解析および治療標的としての可能性の探索. 第 41 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2008.7.17 浜松)
- 11) 戸口田淳也. 肉腫幹細胞と組織幹細胞の接点. 治療開発を目指した最前線セミナー 2 Cancer Stem Cell ーがん幹細胞をターゲットとした治療の開発に向けてー (2008.6.24 東京)
- 12) 戸口田淳也. 癌幹細胞探索のための細胞イメージングの可能性. 第 47 回日本生体医工

- 学会大会 (2008.5.8 神戸)
- 13) Kohno T, Nakayama T, Toguchida J, et al. Snail is negative regulator controlling the construction of epithelial structures in SS. 第 13 回(CTOS2007.11.2 Seattle)
 - 14) Otsuka S, Nakayama T, Toguchida J, et al. Multidirectional differentiation property like mesenchymal stem cells of osteosarcomas in vitro and in vivo. 第 13 回CTOS(2007.11.2 Seattle)
 - 15) Furu M, Nakayama T, Toguchida J, et al. Isolation and functional analysis of a novel protein associated with the distant metastases of spindle cell sarcomas. 第 13 回 CTOS (2007.11.2 Seattle)
 - 16) 光野芳樹、中山富貴、戸口田淳也、他:滑膜肉腫の上皮構造形成におけるCLD7、ELF3 およびSnailの関連性について. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会(2007.10.26 浜松)
 - 17) 布留守敏、戸口田淳也、他:紡錘形軟部肉腫における生命予後因子C7059 と細胞浸潤能の解析. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会(2007.10.25 浜松)
 - 18) Kohno Y, Nakayama T, Toguchida J, et al. Snail is negative regulator controlling the construction of epithelial structures in SS. 第 66 回日本癌学会総会(2007.10.4 横浜)
 - 19) Furu M, Nakayama T, Toguchida J, et al. Isolation and functional analysis of a novel protein associated with the distant metastases of spindle cell sarcomas. 第 66 回日本癌学会総会(2007.10.4 横浜)
 - 20) Otsuka S, Nakayama T, Toguchida J, et al. Some osteosarcomas have multidirectional differentiation potential like mesenchymal stem cells in vitro and in vivo.第 66 回日本癌学会総会(2007.10.3 横浜)
 - 21) 福川千香子、戸口田淳也、他:イットリウム 90-抗FZD10モノクローナル抗体による滑膜肉腫抗体治療の検討. 第 66 回日本癌学会総会(2007.10.3 横浜)
 - 22) Kohno Y, Nakayama T, Toguchida J, et al. Relationship among CLDN7, ELF3, and Snail in the formation of the epithelial structures in synovial sarcomas. 第 5 回SIROT(2007.8.31 Marrakech)
 - 23) Furu M, Nakayama T, Toguchida J, et al. Isolation and functional analysis of a novel protein identified as the prognostic factor in spindle cell sarcomas. 第 5 回 SIROT (2007.8.31 Marrakech)
 - 24) 光野芳樹、中山富貴、戸口田淳也、他:滑膜肉腫の上皮構造形成におけるCLDN7、ELF3 およびSnailの関連性について. 第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2007.7.12 甲府)
 - 25) 大塚聖視、中山富貴、戸口田淳也、他:培養骨肉腫細胞のもつ間葉系幹細胞様の多分化能. 第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2007.7.12 甲府)
 - 26) 布留守敏、中山富貴、戸口田淳也、他:紡錘形軟部肉腫における生命予後関連因子としての新規遺伝子C7059 の単離と機能解析. 第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2007.7.12 甲府)
 - 27) 戸口田淳也、中山富貴、他:網羅的遺伝子発現解析からの紡錘形細胞肉腫における生命予後関連因子の単離. 第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2007.7.12 甲府)
 - 28) Otsuka S, Nakayama T, Toguchida J, et al. Some osteosarcomas have multidirectional differentiation potential suggested that these cells may derive directly from mesenchymal stem cells. 第 5 回ISSCR(2007.6.19 Cairns)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
中山 富貴 (NAKAYAMA TOMITAKA)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80335273
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号: 40273502