

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591721

研究課題名 (和文) 骨肉腫の予後を規定するメチロームの網羅的解析

研究課題名 (英文) Exhaustive methylome analysis to identify the factor of prognosis of osteosarcoma

研究代表者

青山 朋樹 (AOYAMA TOMOKI)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90378886

研究成果の概要：

骨肉腫の治療成績は飛躍的に進歩し、専門施設における 5 年生存率は約 70%まで向上してきた。しかし最近 10 年間での進歩はなく、残る 30%は症例の既存の治療法に対して抵抗性である。さらに初診時にすでに遠隔転移を生じている症例 (以後 M1 症例) の予後は著しく不良であり、5 年生存率は 10-40%にまで低下する。この見地から、これまで M1 症例の生物学的特徴について、ゲノムレベルのいくつかの研究がなされているが未だ共通した特質は明らかにされていない。本研究では近年発生、癌化、分化へ深く関与していることが明らかにされつつある DNA メチル化に着目し、これまで数個の遺伝子について断片的に行われてきた解析を、ゲノム全体のメチル化プロファイル (以下メチロームと称する) の解析を通して、骨肉腫 M1 症例の特質を解明することを行った。

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：整形外科学・再生医学

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：骨肉腫、メチローム、M1、メチル化、エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫の治療成績は画像診断の進歩、化学療法薬剤の開発により飛躍的に進歩し、専門施設における 5 年生存率は約 70%まで向上してきた。しかし最近 10 年間での進歩はなく、残る 30%は症例の既存の治療法に対して抵抗性である。さらに多くの予後報告では除外されている、初診時にすでに遠隔転移を生じている症例 (以後 M1 症例) の予後は著しく不良であり、5 年生存率は 10-40%にまで低下する (J Clin Oncology 21, 2011-8, 2003)。M1 症

例は骨肉腫全体の 20%を占め、M1 症例の病態を究明することは骨肉腫全体の治療成績の向上にもつながると考えられる。この見地から、これまで M1 症例の生物学的特徴について、ゲノムレベルのいくつかの研究がなされているが未だ共通した特質は明らかにされていない。

2. 研究の目的

これまで M1 症例の生物学的特徴について、ゲノムレベルのいくつかの研究がなされて

いるが未だ共通した特質は明らかにされていない。本研究では近年発生、癌化、分化へ深く関与していることが明らかにされつつある DNA メチル化に着目し、これまで数個の遺伝子について断片的に行われてきた解析を、ゲノム全体の網羅的メチル化プロファイル（以下メチロームと称する）の解析を通して、骨肉腫 M1 症例の特質を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

M1 症例 2 例 (KS690T1, KS1300T1) と正常試料 (ヒト骨髄間質細胞) から高純度 DNA を抽出し、ChIP on Chip 及びビーズアレイによる網羅的メチル化遺伝子解析を行い、候補遺伝子の絞り込みを行い RT-PCR で発現を比較した。具体的な手法を以下に記す。

ホルムアルデヒドで DNA-蛋白複合体をクロソリンクさせた後に超音波破砕機を用いて DNA を 100-2000bp に断片化する。次に抗メチル化シトシン抗体を用いて、シトシン 5' 位がメチル化修飾されている領域の DNA 蛋白複合体を免疫沈降法にて回収する。同時に抗体を用いずに免疫沈降をおこなったものをコントロールとして作成する。これらの DNA 蛋白複合体の蛋白を分解し、それぞれ残った DNA 断片を蛍光標識し 20,000 個のヒト遺伝子転写調節領域をスポットしたプロモーターアレイ (GLAS-H20K-Chip Human Promoter Array) 上に競合ハイブリダイズさせ、スキャナーにて蛍光検出する。この蛍光強度を解析することで M1 症例において特異的にメチル化修飾を受けている遺伝子転写調節領域候補を抽出する。

4. 研究成果

M1 症例 2 例における ChIP on Chip 法を用いた転移に関与するメチル化修飾遺伝子の網羅的解析を行った。この結果、M1 症例 1 例でメチル化されている遺伝子は 485 個、もう 1 例では 1184 個で、共通しているのは 75 遺伝子であった (図 1)。

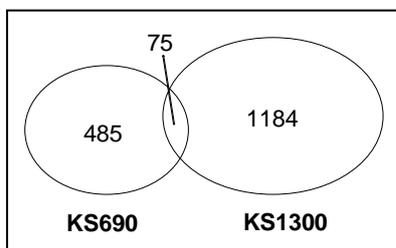


図 1. M1 症例 2 例におけるメチル化遺伝子数

この中には癌腫において予後との関連が明らかにされている Protocadherin 20

(PCDH20), Insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit (IGFALS) などが含まれていた。(表 1, 図 2)

表 1. 共通でメチル化修飾を受けていた遺伝子のうち上位 20 遺伝子

IGFALS	Insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit
MAEA	Macrophage erythroblast attacher
OSR1	Oxidative-stress responsive 1
MAN1A1	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1
PKNOX2	PBX/knotted 1 homeobox 2
KCNH6	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related),
ZNF469	
TMPO	Thymopoietin
RNF166	Ring finger protein 166
LOC389806	
CRSP7	Cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 7, 70kDa
LOC342979	Hypothetical LOC342979
PRIC285	Peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285
PAK2	P21 (CDKN1A)-activated kinase 2
MGC34648	Family with sequence similarity 76, member A
SDK1	Sidekick homolog 1 (chicken)
RDH14	Retinol dehydrogenase 14 (all-trans/9-cis/11-cis)
CDC20	

この PCDH20, IGFALS を RT-PCR にて解析した結果、骨肉腫 M1 症例についてはメチル化陽性と判定された遺伝子の mRNA 発現は認めず、正常の骨髄間質細胞では発現を認めた (図 2)。

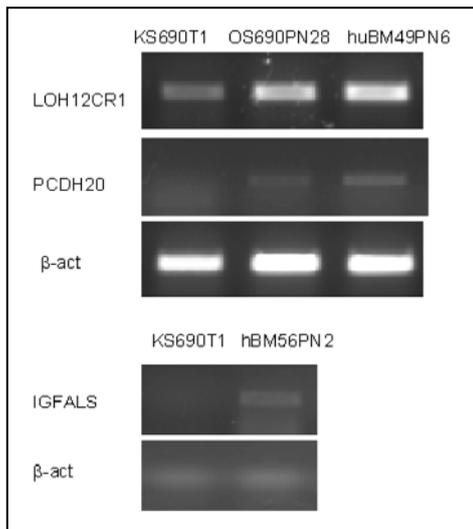


図 2. 腫瘍組織 (KS690T1)、腫瘍細胞株 (OS690PN28)、ヒト正常骨髄間質細胞 (huBM49PN6) における LOH12CR1, PCDH20, IGFALS の mRNA 発現 (RT-PCT) .

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 6 件)

- ① 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, 405-12, 2009. 査読有
- ② Ishibe T, Nakayama T, Aoyama T, Nakamura T, Toguchida J. Neuronal differentiation of synovial sarcoma and its therapeutic application. *Clin Orthop Relat Res.* 466, 2147-55, 2008. 査読有
- ③ Aoyama T, Okamoto T, Kohno Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Ito K, Jin Y, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Cell-specific epigenetic regulation of ChM-I gene expression: crosstalk between DNA methylation and histone acetylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 365, 124-30, 2008. 査読有
- ④ Fukiage K, Aoyama T, Shibata KR, Otsuka S, Furu M, Kohno Y, Ito K, Jin Y, Fujita S, Fujibayashi S, Neo M, Nakayama T,

Nakamura T, Toguchida J. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 indicates the differentiation potential of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 365(3):406-12. 査読有

- ⑤ Shima Y, Okamoto T, Aoyama T, Yasura K, Ishibe T, Nishijo K, Shibata KR, Kohno Y, Fukiage K, Otsuka S, Uejima D, Nakayama T, Nakamura T, Kiyono T, Toguchida J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-ras(Val12). *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(1):60-66. 査読有
- ⑥ Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Kohno Y, Ito K, Fujibayashi S, Neo M, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells.* 2007;25(9):2371-82. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 青山朋樹、光野芳樹、大塚聖視、吹上謙一、布留守敏、伊藤錦哉、長山聡、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 内因性ヒストンテール修飾因子によるコンドロモジュリン-I遺伝子発現制御機構の解析 BMB2007 2007. 12. 13 横浜市
- ② 吹上謙一、青山朋樹、柴田弘太郎、大塚聖視、布留守敏、伊藤錦哉、中村孝志、戸口田淳也 骨髄間質細胞における CD106/VCAM-1 の発現制御と機能意義 第 7 回日本再生医療学会総会 2008. 3. 13 名古屋市
- ③ 青山朋樹、光野芳樹、大塚聖視、吹上謙一、布留守敏、伊藤錦哉、長山聡、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 内因性ヒストンテール修飾因子によるコンドロモジュリン-I遺伝子発現制御機構の解析 第 21 回日本軟骨代謝学会 2008. 3. 21 京都市
- ④ 布留守敏、長山聡、梶田洋一郎、青山朋樹、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 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 浜松市
- ⑤ 青山朋樹、大塚聖視、石部達也、布留守敏、吹上謙一、光野芳樹、伊藤錦哉、金永輝、梶田洋一郎、那須 輝、長山聡、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 分化誘導プロファイルを用いた肉腫細胞の起源へのアプローチ第41回 日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2008. 7. 17 浜松市
- ⑥ 金 永輝、青山朋樹、布留守敏、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也。肉腫におけるras遺伝子の変異解析。第67回日本癌学会学術集会 2008. 10. 28 名古屋市
- ⑦ 布留守敏、長山聡、梶田洋一郎、青山朋樹、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 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. 23-24 京都市
- ⑧ 布留守敏、長山聡、梶田洋一郎、青山朋樹、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 肉腫における転移関連新規因子C7059の機能解析 第67回日本癌学会学術集会 2008. 10. 28-30 名古屋市
- ⑨ 戸口田淳也、大塚聖視、石部達也、青山朋樹、中山富貴、大塚隆信、中村孝志 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関連するものなのか 第67回日本癌学会学術集会 2008. 10. 28-30 名古屋市
- ⑩ 長山 聡、布留守敏、青山朋樹、久保 肇、渡辺 剛、片桐豊雅、中村祐輔、戸口田淳也、坂井義治 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回日本癌学会学術集会 2008. 10. 28-30 名古屋市
- ⑪ 金 永輝、青山朋樹、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 軟部肉腫におけるRas遺伝子群の点突然変異解析 第31回近畿肉腫研究会 2008. 12. 13 豊岡市
- ⑫ Seiji Otsuka, Tomoki Aoyama, Roberts Kotaro Shibata, Yasuko Shima, Kenichi Fukiage, Tomitaka Nakayama, Takashi Nakamura, Takanobu Otsuka, Junya Toguchida Multipledirectional differentiation property like mesenchymal stem cells of osteosarcomas in vitro and in vivo. CTOS 13th Annual Meeting 2007. 11. 1 Seattle, USA
- ⑬ Yoshiki Kohno, Satoshi Nagayama, Tomoki Aoyama, Tomitaka Nakayama, Takashi

Nakamura, Junya Toguchida Snail is a negative regulator controlling the construction of epithelial structure in SS. CTOS 13th Annual Meeting 2007. 11. 1 Seattle, USA

- ⑭ Moritoshi Furu, Satoshi Nagayama, Tatsuya Ishibe, Yasuko Shima, Daisuke, Uejima, Tomoki Aoyama, Tomitaka Nakayama, Takashi Nakamura, Toyomasa Katagiri, Yusuke Nakamura, Junya Toguchida Isolation and functional analysis of a novel protein associated with the distant metastasis of spindle cell sarcomas. CTOS 13th Annual Meeting 2007. 11. 1 Seattle, USA
- ⑮ Tomoki Aoyama, Kenichi Fukiage, Kotaro R Shibata, Seiji Otsuka, Yoshiki Kohno, Kinya Ito, Yonghui Jin, Akira Nasu, Michiko Ueda, Satoshi Nagayama, Takashi Nakamura, Junya Toguchida. Intrinsic epigenetic regulators determine the expression of lineage-specific gene in mesenchymal stem cells. ISSCR 6th Annual Meeting. 2008. 6. 11 Philadelphia, USA

[その他]
ホームページ等
<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/ca02/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 朋樹 (AOYAMA TOMOKI)
京都大学・再生医科学研究所・助教
研究者番号：90378886

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし