

Figure 2. Characteristics of colon cancer cell lines with cancer stem cell properties. **(A):** Schematic representation of the process for the establishment of colon cancer cell lines. **(B):** Phase contrast microscopy of the cells in the LGR5⁺ cell lines. Cells were collected from xenografts of PLR59 and PLR123 after more than 10 passages in NOG mice and cultured under an adherent culture condition. Bar: 20 μ m. **(C):** Histology of the tumors derived from the LGR5⁺ cells from PLR59 and PLR123 xenografts. Ten or single LGR5⁺ cells from the adherent cultures of the cells derived from PLR59 and PLR123 xenografts were subcutaneously injected into NOG mice. Bar: 50 μ m. **(D):** Expression of CSC markers. The primary cells from xenografts of PLR59 and PLR123 after more than 10 passages in NOG mice (upper) and the LGR5⁺ cells cultured under an adherent culture condition (lower) were analyzed by flow cytometry. Shadow, Fluorescent intensities after staining with the indicated antibodies or ALDH activity; Open, Fluorescent intensities after staining with control isotype antibody or ALDH activity with an ALDH inhibitor. **(E):** Symmetric division of the LGR5⁺ cells. The LGR5⁺ cells stained with PKH67 dye were cultured for 72 hr and examined by fluorescent microscopy. Bar: 20 μ m. **(F):** Symmetrical (upper) and asymmetrical (lower) divisions of the LGR5⁺ cells in the presence or absence of matrigel and FBS. Photographs of the cells were taken after single division (left) and after two or three divisions (right). The LGR5⁺ cells were cultured for 48 to 72 hr and stained with the anti-LGR5 antibody. Bar: 20 μ m.

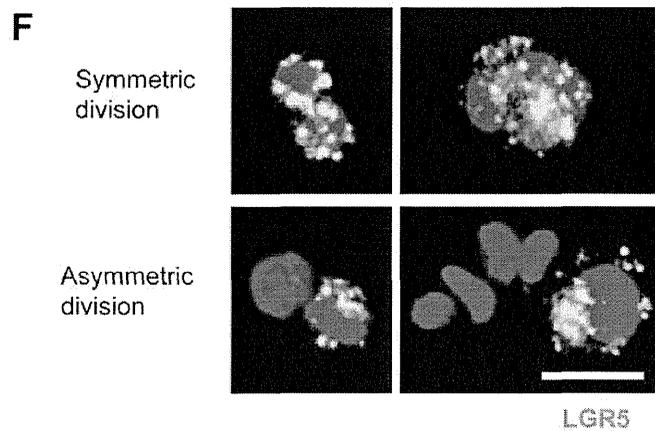
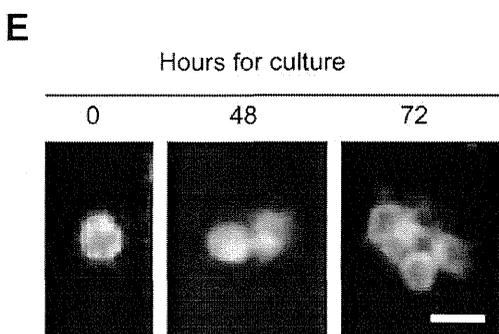
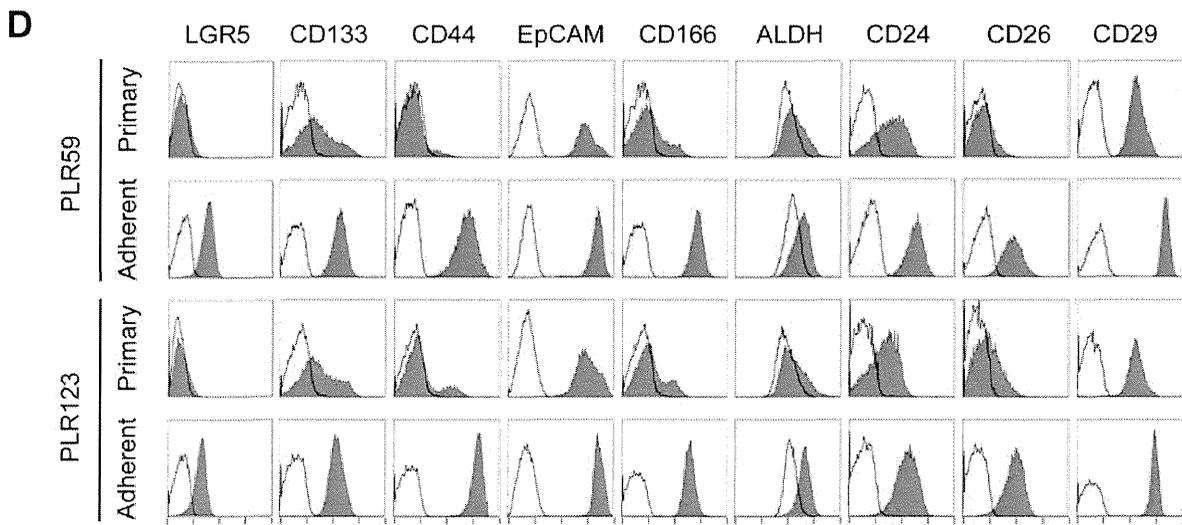
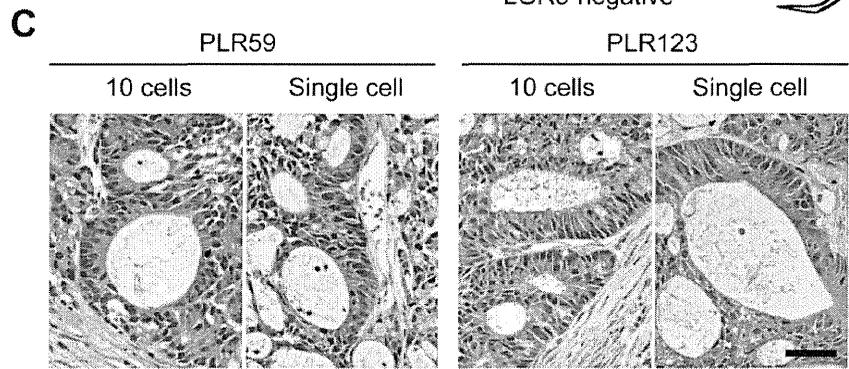
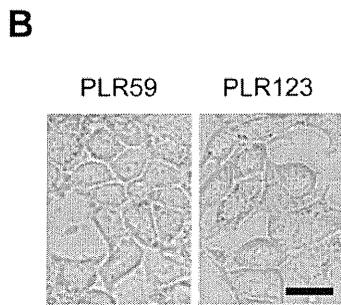
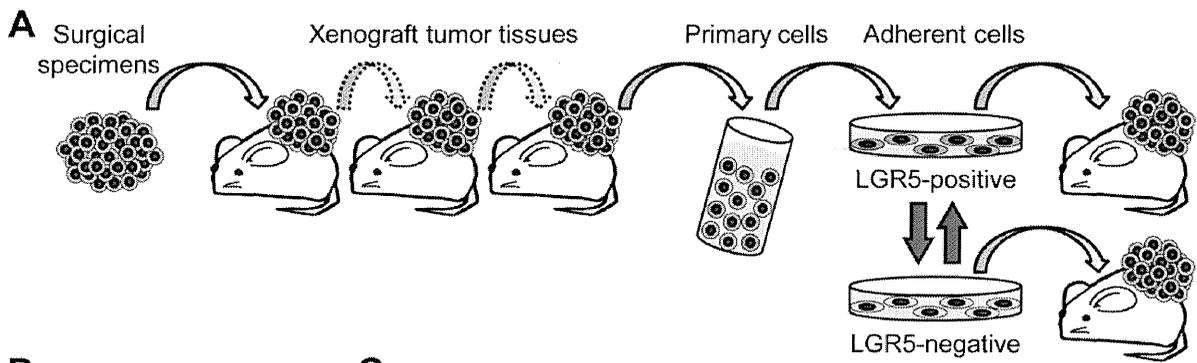


Figure 3. Colony forming activity and tumorigenicity of the sorted LGR5⁺ and the LGR5⁻ cells. (A): Flow cytometry analysis of the sorted LGR5⁺ and LGR5⁻ populations from the primary cells of PLR123 xenograft generated by the inoculation of the LGR5⁺ cells. Percentages indicate the purity of the sorted cell population. (B): Tumor formation by the sorted LGR5⁺ and the LGR5⁻ cells. One thousand cells of the sorted LGR5⁺ and the LGR5⁻ populations suspended in matrigel were subcutaneously inoculated into NOG mice, and tumor volume was measured. Mean \pm standard deviation of 6 tumors is shown. (C): Flow cytometry analysis of the primary cells from the PLR123 xenograft after staining with anti-LGR5 antibody together with anti-CD133, anti-CD166 or anti-CD44 antibody. (D): Flow cytometry analysis of the cells in the sorted LGR5⁻/CD133⁻, LGR5^{-low}/CD133⁺ and LGR5⁺/CD133⁺ populations from the primary cells of the PLR123 xenograft. Percentages indicate the purity of the sorted cell population. (E): Colony forming activity of the sorted LGR5⁻/CD133⁻, LGR5^{-low}/CD133⁺ and LGR5⁺/CD133⁺ cells. Ten thousand cells of the sorted cells were seeded on matrigel. Number of colonies after culturing the cells for 6 days was determined. Mean \pm standard deviation in triplicate experiments is shown.

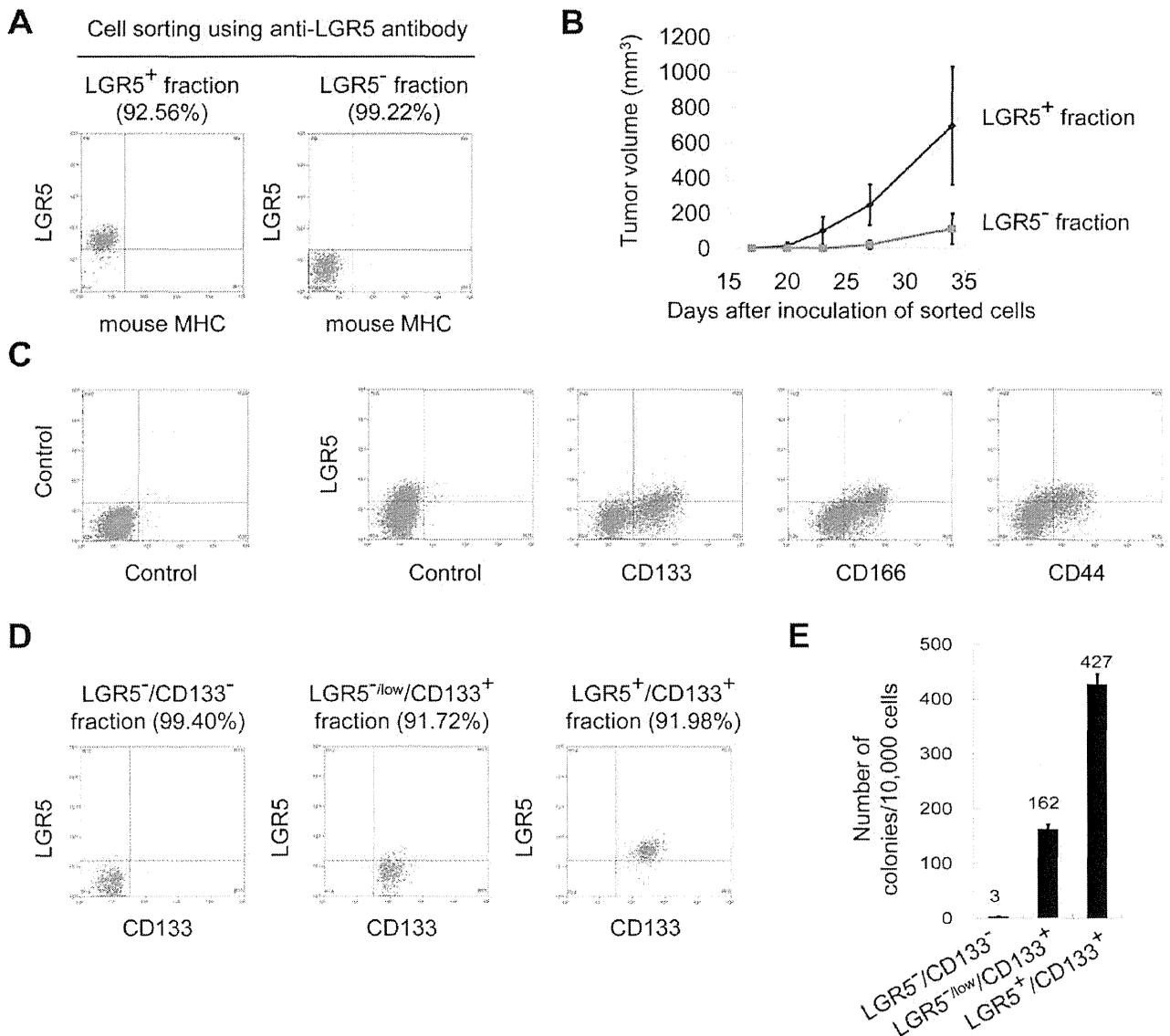


Figure 4. Transition of the colon CSCs between LGR5⁺ and LGR5⁻ states *in vitro*. **(A):** Immunostaining of LGR5 after treatment of the LGR5⁺ cells with irinotecan. The adherent LGR5⁺ cells from PLR123 xenografts cultured in the presence of irinotecan became LGR5 negative. The drug resistant LGR5⁻ cells were re-seeded and further cultured in the absence of irinotecan for the indicated days. The LGR5⁺ cells appeared 4 days after the re seeding and increased by 8 days. Bar: 50 μ m. **(B):** Expression of CSC markers. The LGR5⁺ cells from the adherent cultures from PLR123 xenografts before (top) and after treatment with irinotecan (middle) were analyzed by flow cytometry. Cells re-seeded after irinotecan treatment (bottom) were also analyzed. Shadow, Fluorescent intensities after staining with the indicated antibodies or ALDH activity; Open, Fluorescent intensities after staining with control isotype antibody or ALDH activity with an ALDH inhibitor. **(C):** Interconversion of the LGR5⁺ and LGR5⁻ states *in vitro*. LGR5⁺ cells collected by flow cytometry were seeded by limiting dilutions and cultured under an adherent culture condition in the presence of irinotecan for 3 days. Drug resistant LGR5⁻ cells that had been treated with irinotecan were seeded by limiting dilutions and cultured under an adherent culture condition for 4 days. The cells were stained with anti-LGR5 antibody to confirm the expression of LGR5. LGR5 was visualized by PE-labeled anti-mouse IgG (red) or by AlexaFluor 488-labeled anti-mouse IgG (green). **(D):** Ki67 staining of the LGR5⁺ and drug resistant LGR5⁻ cells. *In vitro* cultures of the LGR5⁺ cells and the drug resistant LGR5⁻ cells obtained by the treatment of the adherent LGR5⁺ cells with irinotecan were double stained with the anti-LGR5 antibody and an anti-Ki67 antibody. Bar: 50 μ m.

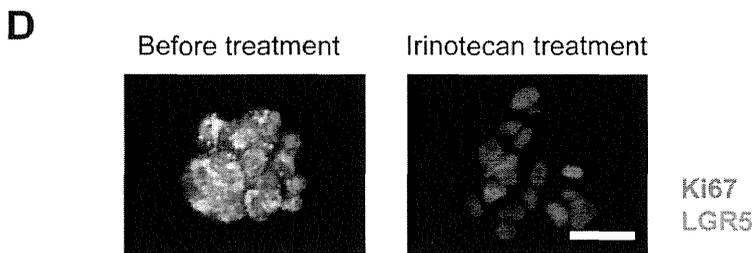
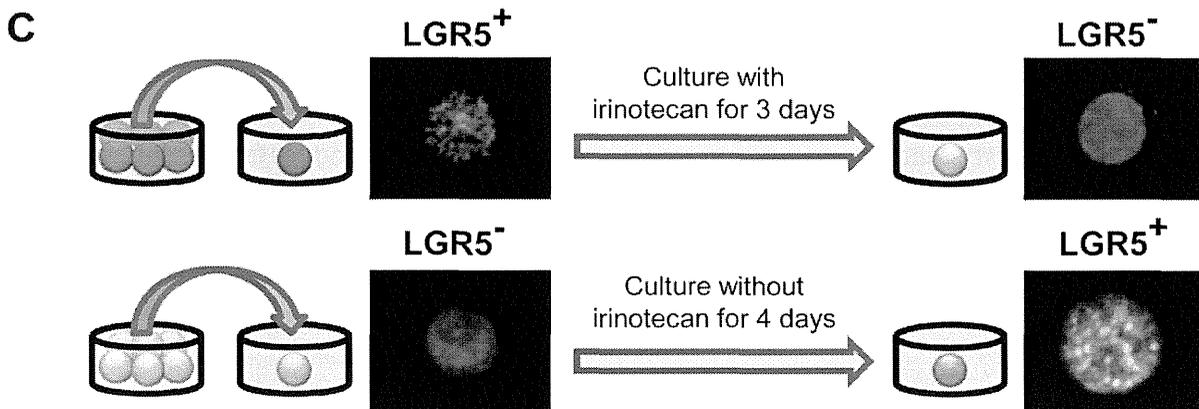
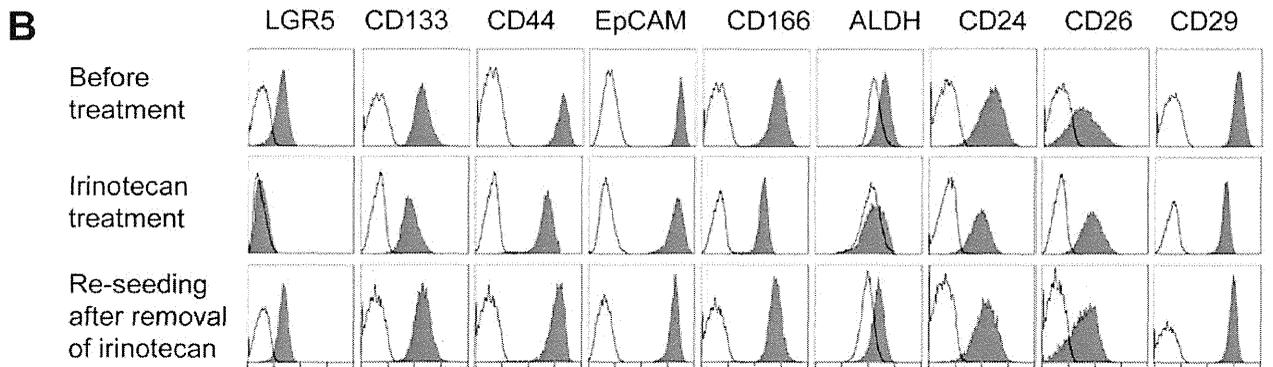
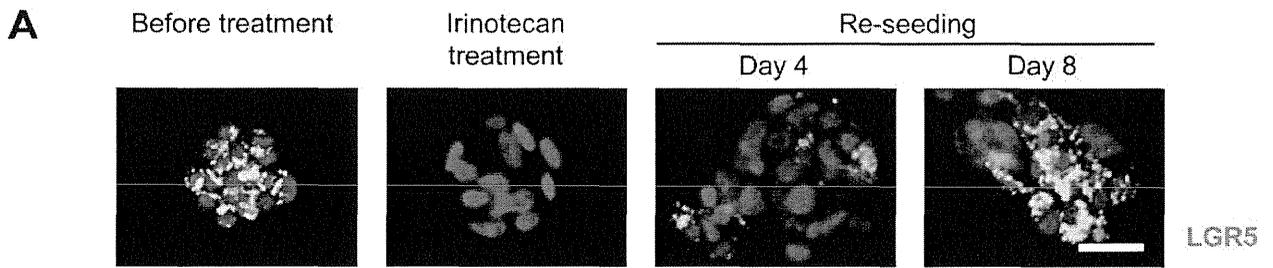


Figure 5. Identification of drug resistant LGR5⁻ cells and transition of the colon CSCs between LGR5⁺ and LGR5⁻ states *in vivo*. **(A)**: DNA microarray. RNA was prepared from the primary cells from xenografts, LGR5⁺ cells, and drug resistant LGR5⁻ cells derived from PLR59 and PLR123 were analyzed by Affymetrix U133. Heat map of 20 genes whose expression was markedly upregulated in the drug resistant LGR5⁻ cells as compared to the LGR5⁺ cells (left) and that of 20 genes whose expression was increased in both LGR5⁺ and drug resistant LGR5⁻ cells as compared to the primary cells from the xenografts (right) are shown. **(B)**: Expression of HLA-DMA and EREG in LGR5⁺ and drug resistant LGR5⁻ cells. The LGR5⁺ (left) and drug resistant LGR5⁻ cells (right) derived from PLR123 xenografts were stained with anti-LGR5 antibody (top), anti-HLA-DMA antibody (middle), and anti-EREG antibody (bottom). Bar: 10 μ m. **(C)**: Transition from drug resistant LGR5⁻ cells to LGR5⁺ cells during the early process of tumor development. The drug resistant LGR5⁻ cells derived from PLR123 xenografts were injected into NOG mice, and the tumors derived from the drug resistant LGR5⁻ cells were stained with anti-LGR5, anti-HLA-DMA, and anti-EREG antibodies. Arrow: weakly staining of LGR5 on Day 1. Two typical types of cells are shown. Partial convert: moderate staining of LGR5 with weakly staining of HLA-DMA on Day 5. Convert: strong staining of LGR5 with no staining of HLA-DMA on Day 5. Bar: 10 μ m. **(D)**: Reconstitution of tumor hierarchy from the drug resistant LGR5⁻ cells. Histology (upper) and immunostaining with the anti-LGR5 and E-cadherin antibodies (lower) are shown. Bar: 50 μ m. **(E)**: Tumor volume of the xenografts. The LGR5⁺ cell of PLR123 were subcutaneously injected into NOG mice, and the mice were administered irinotecan (120 mg/kg/day) 12, 15 and 18 days after the inoculation of the tumor cells. Tumor volume of the control mice (black line) and that of the mice which received irinotecan (red line) are shown. Each value represents mean \pm standard deviation (n=5). **(F)**: Histology and immunostaining for LGR5, HLA-DMA and EREG of the tumors after treatment of irinotecan. Sections of the xenografts in (E) were excised from the mice at the indicated days after the inoculation of the LGR5⁺ cells and stained with HE, anti-LGR5 antibody, anti-HLA-DMA antibody, or anti-EREG antibody. Bar: 25 μ m. **(G)**: Ki67 staining of the LGR5⁺ and the HLA-DMA⁺ cells in xenografts. The sections of the xenografts excised from the mice 21 days after the inoculation of the LGR5⁺ cells with or without treatment of irinotecan were double stained with anti-Ki67 antibody and anti-LGR5 antibody or anti-HLA-DMA antibody. Arrows: LGR5⁺/Ki67⁺ cells, Arrow heads: HLA-DMA⁺/Ki67⁻ cells. Bar: 25 μ m.

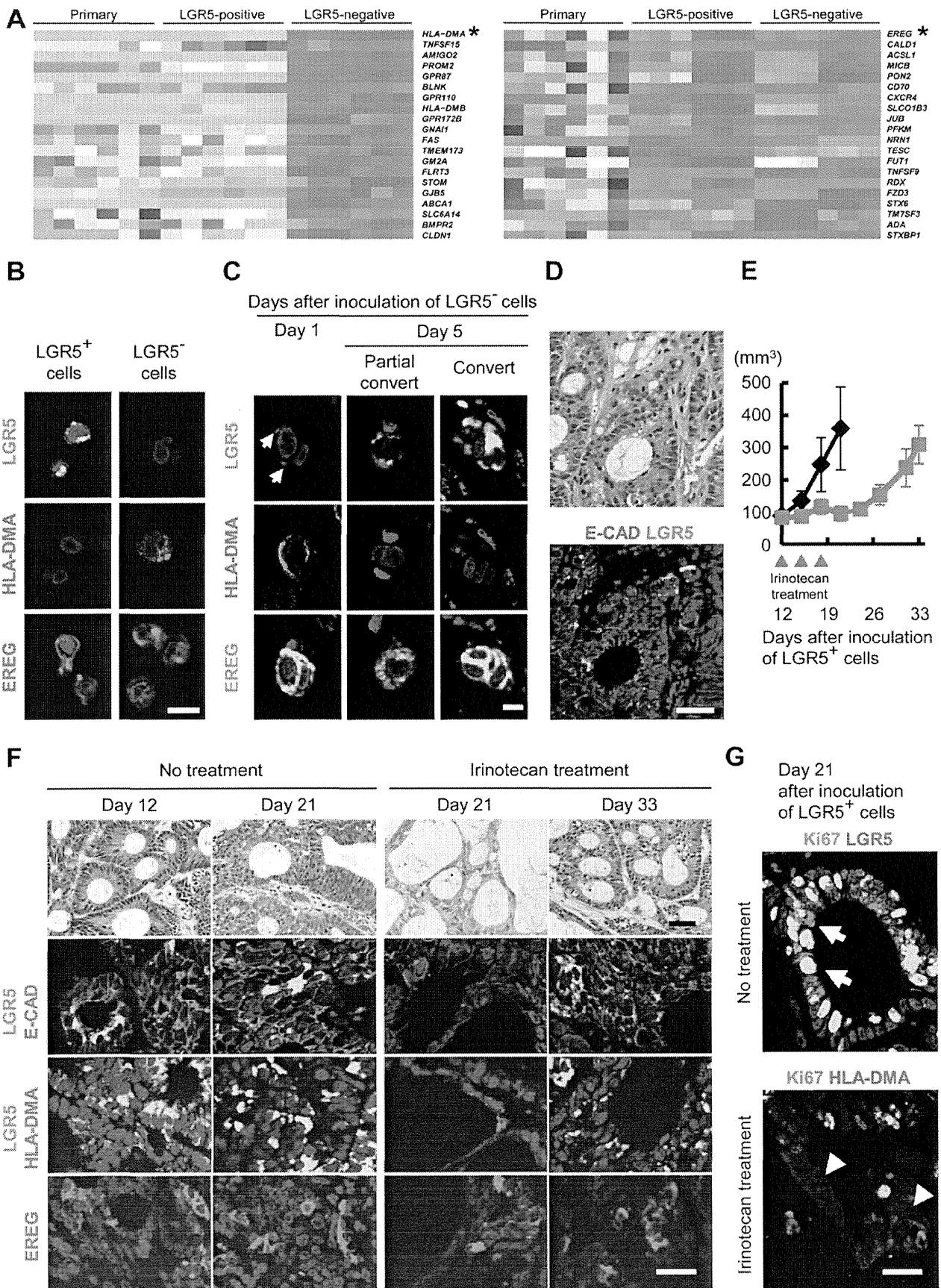
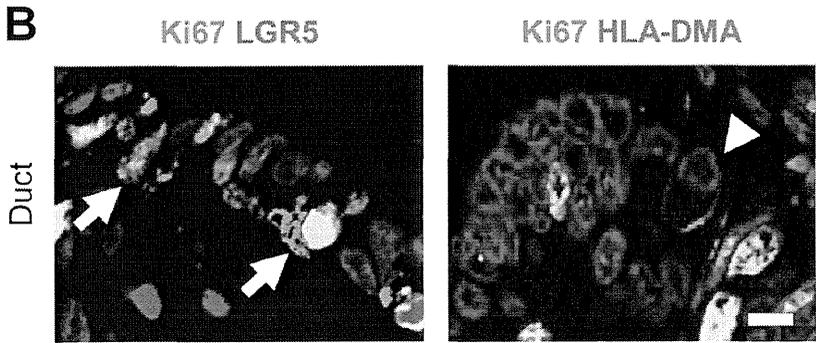
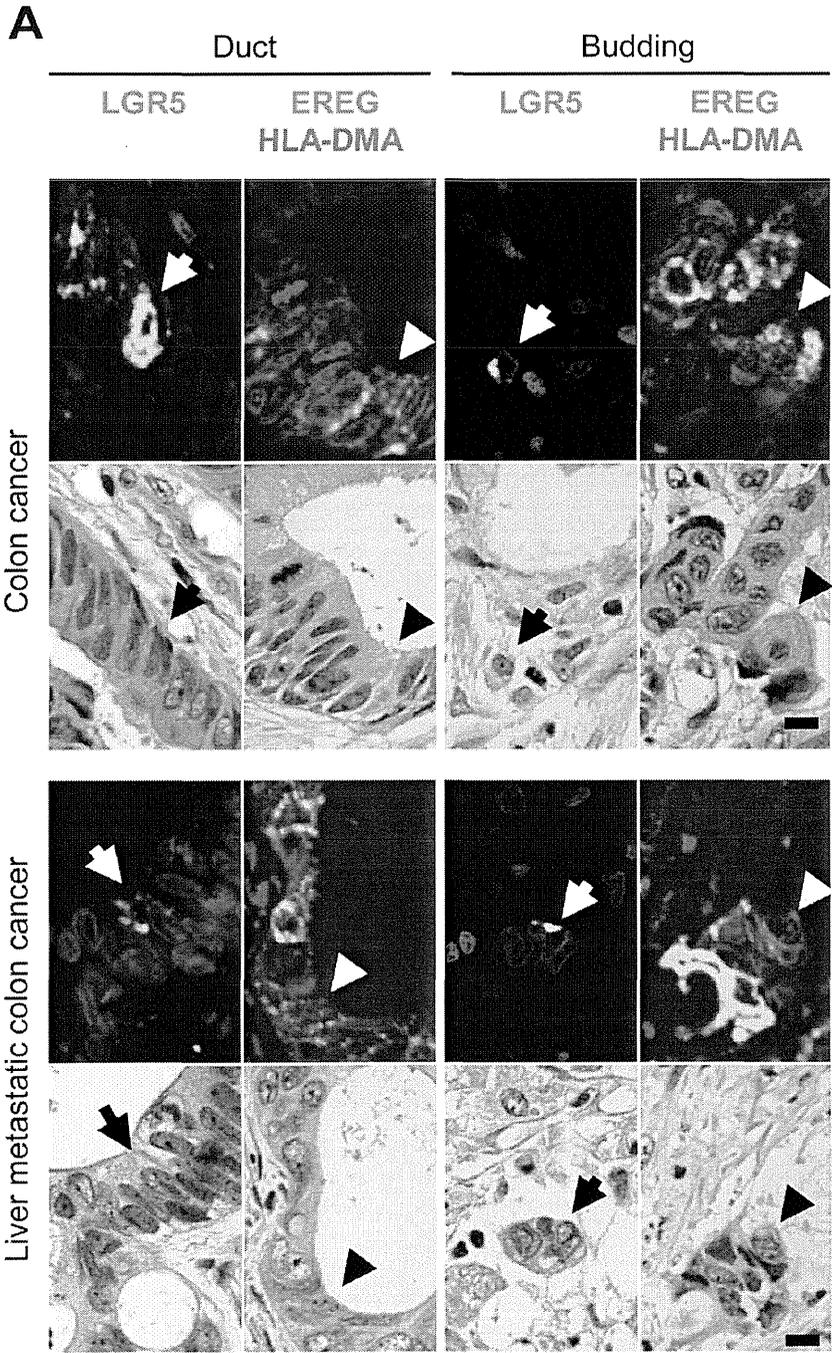


Figure 6. Antitumor activity of anti-EREG antibody. **(A):** Histology (upper) and immunostaining for EREG (lower) of the tumors. The adherent LGR5⁺ cells derived from PLR123 xenografts were intravenously injected into NOG mice. Tumors were dissected on the indicated days after inoculation of tumor cells. Photographs of typical large and small nodules are shown. Bar: 50 μ m. **(B to D):** Numbers and histology of tumors in lung. SCID-beige mice were intravenously injected with the adherent LGR5⁺ cells derived from PLR123 xenografts. The anti-EREG antibody was administered every week for 5 times starting from 3 days after the tumor inoculation. Lung of the animals were resected and examined histologically with 11 cross sections of the lung per animal (n=10 for control group and n=9 for anti-EREG antibody injected group). Number of tumor nodules per animal is shown in (B). Each symbol represents individual animal. Total numbers of tumor nodules in each group of the mice with the indicated sizes are shown in (C). Yellow column; under 100 μ m, Green column; 100 - 200 μ m, Red column; over 200 μ m. Histology of the tumors with or without administration of anti-EREG antibody are shown in (D). Bar: 200 μ m.

Figure 7. Presence of LGR5⁺ and LGR5⁻ cells in colon cancer and liver metastatic colon cancer from patients. **(A):** The same section of the primary and liver metastatic colon cancer tissues from patients was stained with HE or antibodies against LGR5, HLA-DMA and EREG. LGR5⁺ and EREG⁺/HLA-DMA⁺ cells are detected in both ductal structures and budding areas of the primary and liver metastatic tumors. LGR5⁺ cells present as a single cell are also found in the interstitium. Similar patterns of the staining were observed in several tumor tissues from different patients. Arrows indicate typical LGR5⁺ cells and arrow heads indicate typical LGR5⁻/EREG⁺/HLA-DMA⁺ cells. Bar: 10 μ m. **(B):** Ki67 staining of the LGR5⁺ and the HLA-DMA⁺ cells in colon cancer tissues from patients. The sections of the primary colon cancer tissues from patients in (A) were double stained with an anti-Ki67 antibody and anti-LGR5 antibody or anti-HLA-DMA antibody. Arrows: LGR5⁺/Ki67⁺ cells, Arrow head: HLA-DMA⁺/Ki67⁻ cells. Bar: 10 μ m.



Current Organ Topics:	Musculoskeletal Tumor 骨・軟部 腫瘍
	<p>I. 骨軟部腫瘍における microRNA の最新の知見と臨床応用への挑戦</p> <p>藤原 智洋^{*1,2,3}, 川井 章^{*1}, 小坂 展慶^{*2}, 尾崎 敏文^{*3}, 落谷 孝広^{*2}</p> <p>(^{*1}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, ^{*2}国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野, ^{*3}岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体機能再生・再建学講座 整形外科)</p>

[Jpn J Cancer Chemother 40(3):305-313, March, 2013]

はじめに

がんにおける microRNA (miRNA) 研究がますます盛んになっている。miRNA は蛋白質の遺伝子配列 (code) をもたない non-coding RNA (ncRNA) の一つで、細胞内の遺伝子発現抑制 (遺伝子サイレンシング) を引き起こす、いわゆる RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) 分子である。miRNA が発見されたのは 1993 年で、Lee らが線虫のある蛋白質の遺伝子をコードする mRNA に結合してその翻訳を阻害する小さな RNA を発見したことに端を発する。その後、この miRNA が種を越えて保存され、複数の mRNA を標的とし、その発現を抑えることが明らかとなった。これまでに 1,000 個以上のヒト miRNA が同定され、今後は 2,000 個以上にも及ぶだろうと予測されている¹⁾。

miRNA は約 18~25 塩基長の一本鎖 RNA であり、その生合成は核内で RNA ポリメラーゼにより miRNA 一次転写産物 (primary-miRNA: pri-miRNA) に転写されることから始まり、drosha によって切りだされて約

60~70 塩基長の precursor-miRNA (pre-miRNA) として exportin-5 によって核外へ輸送される (図 1)。細胞質に移動した pre-miRNA は dicer により 22 塩基程度の二本鎖 miRNA に切断され、一本鎖に分離して蛋白質複合体である RNA-induced silencing complex (RISC) と結合し、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域に相補的に結合することで蛋白への翻訳を阻害している²⁾。miRNA はこのように多段階の過程によって成熟し機能することから、この様々な段階における異常ががん発生と深く関与していることが明らかとなり、がんにおいて発現亢進を示す miRNA (oncomiR) と発現低下を示す miRNA (tumor-suppressor-miR) が存在することが明らかになった²⁾。

がん細胞における miRNA の発現パターンはがん細胞の種類によって特徴的であり、この発現の特徴を利用したがんの診断や予後予測、新規治療に利用する研究が現在注目されている³⁾。骨軟部腫瘍の領域においてもすでにこのような臨床応用の可能性を示唆する報告が相次い

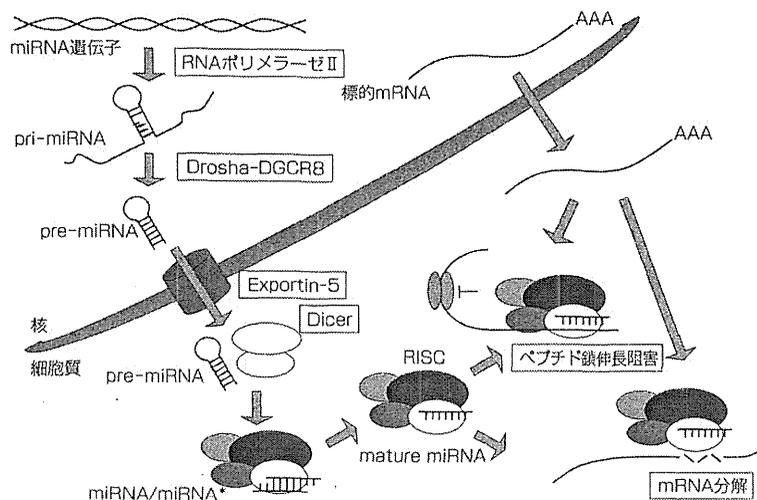


図 1 MicroRNA 生成および作用機構
miRNA* : 分解される RNA 鎖

表 1 骨腫瘍における microRNA の発現異常

組織型	miRNAs	腫瘍内 発現	関連する性質	標的遺伝子	文献	
骨肉腫	miR-135b, -150, -542-5p, -652	高	—	—	Lulla ら, 2011	
	miR-654, -370	高	—	IRS1	Stabley ら, 2010	
	miR-34a	低	腫瘍増殖, 転移	CDK6, E2F3, cyclin E2, BCL2, c-Met	He ら, 2009 Yan ら, 2012	
	miR-192, -215	低	細胞周期	CDKN1A/p21	Braun ら, 2008	
	miR-31	低	腫瘍増殖	E2F2	Creighton ら, 2010	
	miR-140	高*	化学療法抵抗性	HDAC4	Song ら, 2009	
	miR-215	高*	化学療法 (MTX) 抵抗性	DHFR, TYMS	Song ら, 2010	
	miR-92a, -99b, -132, -193a-5p, -422a	高*	化学療法 (IFO) 抵抗性	—	Gougelet ら, 2011	
	miR-21	高	遊走能・浸潤能	RECK	Ziyan ら, 2011	
	miR-183	低	遊走能・浸潤能	ezrin	Zhu ら, 2012	
	miR-199-3p	低	増殖能・浸潤能	mTOR, STAT3	Duan ら, 2011	
	miR-143	低**	浸潤能	MMP13	Osaki ら, 2011	
	miR-125b	低	増殖能・遊走能	STAT3	Liu ら, 2011	
	miR-382, -369-3p, -544, -134	低	アポトーシス	cMYC	Thayanithy ら, 2012	
	miR-16	低	腫瘍形成能, 化学療法抵抗性	—	Jones ら, 2012	
	miR-27a, -181	高	腫瘍形成能, 遊走能・浸潤能	—	Jones ら, 2012	
	Ewing 肉腫	miR-100, -125b, -22, -221/222, -27a, -29a	低	腫瘍増殖, 浮遊腫瘍塊形成能 (EWS-Fli1 と相関)	IGF-1, -1R	McKinsey ら, 2011
		miR-145	低	腫瘍増殖, 浮遊腫瘍塊形成能 (EWS-Fli1 と正の feedback loop を形成)	Fli1	Ban ら, 2011
		let-7a	低	腫瘍増殖 (EWS-Fli1 と相関)	HMG2A	De Vito ら, 2011
		miR-708	低	腫瘍増殖, 化学療法 (DOX, VP-16) 抵抗性 (EWS-Fli1 と相関)	EYA3	Robin ら, 2012
miR-34a		低*	化学療法抵抗性, 予後と相関	—	Nakatani ら, 2012	
脊索腫	miR-1, -206	低	腫瘍増殖	MET, HDAC4	Duan ら, 2010	

MTX: メトトレキサート, IFO: イフォスファミド, DOX: ドキソルビシン, VP-16: エトポシド, —: 未発表もしくは未特定,
*: 化学療法抵抗性を示す腫瘍における発現, **: 高転移株における発現

でいる。本稿では、これまで様々な知見が蓄積されている骨軟部腫瘍にかかわる microRNA の研究の現状を概説し、臨床応用への可能性を論じる。

1. 骨軟部腫瘍における miRNA の発現異常

2004年にB細胞慢性リンパ球性白血病にてmiR-15, -16の関与が報告されて以来、ハイスループットなreal-time PCRやmiRNAマイクロアレイによるmiRNAの網羅的な発現プロファイル解析によって、miRNAプロファイルには組織特異性があることが示されてきた⁴⁾。骨軟部腫瘍におけるmiRNA発現解析は、2008年にSubramanianらが計7亜型〔滑膜肉腫、横紋筋肉腫(胎児型、胞巣型、多形型)、平滑筋肉腫、消化管間質腫瘍、脂肪肉腫〕の肉腫27例のプロファイリングを報告したことに発する⁵⁾。その後、様々な組織ごとに解析が行われ、Sarverらはsarcoma microRNA expression database (S-MED)として報告している⁶⁾。このような発現解析だけでなく、それぞれの組織におけるmiRNAの機

能解析に基づいた報告が続いている。以下に各組織別におけるこれまでの知見をまとめる。

1) 骨腫瘍(表1)

a. 骨肉腫

骨軟部腫瘍領域においては最も多くの解析が行われている。①正常組織と腫瘍組織、骨芽細胞株と骨肉腫細胞株などの組み合わせによる発現解析だけでなく、②既知の遺伝子の発現異常との関連、③化学療法抵抗性、④浸潤・転移能などの特性に基づいた発現解析がなされ⁷⁾、核酸医薬としての可能性を動物治療モデルを用いて検証されている。①骨芽細胞株とヒト骨肉腫組織との比較において、Lullaらは後者でmiR-135b, -150, -542-5p, -652が発現高値を示すことを報告した⁸⁾。Stableyらはヒト骨肉腫細胞株を移植した腫瘍においてmiR-654, -370が異常発現を示し、骨肉腫で発現の高いIGF1Rと関連するIRS1がmiR-370の標的遺伝子である可能性を示した⁹⁾。②骨肉腫の発生においてがん抑制遺伝子p53の発現異

常が古くから知られているが、p53の発現に関連したmiRNAとして、miR-31, -34 family, -192, -194, -215が報告されている。Heらは骨肉腫においてmiR-34a, -34b, -34cが発現低値を示し、それらの発現を回復させることにより標的遺伝子であるCDK6, E2F3, cyclin E2, BCL2を介してG₁ arrestやアポトーシスが引き起こされることを確認した¹⁰⁾。YanらはこのうちmiR-34aがc-Metの発現抑制を介して腫瘍形成および転移を抑制すると報告している¹¹⁾。BraunらはmiR-193, -215が骨肉腫細胞株U2OSにおいてcell cycle arrestを引き起こすことを示しており¹²⁾、一方でCreightonらはmiR-31の導入により骨肉腫細胞株の増殖が抑制されたと報告している¹³⁾。③化学療法奏効性に関するmiRNAとして、SongらはmiR-140を同定し、このmiRNAを細胞株に導入することで化学療法抵抗性が促進されることを確かめている¹⁴⁾。同グループはmiR-215もメトトレキサートに対する治療抵抗性に関与することを報告している¹⁵⁾。Gougeletらは、27例の骨肉腫パラフィンブロックを解析し、イホスファミドに対する奏効群と非奏効群でmiR-92a, -99b, -132, -193a-5p, -422aの発現の違いがみられ、これらのmiRNAがMAP kinase, TGF- β , Wnt経路を介して細胞周期、浸潤能、骨吸収を制御することを示した¹⁶⁾。④浸潤・転移能に関する解析では、miR-21, -183, -199-3p, -143が特定されている。Ziyanらは骨肉腫においてmiR-21が高発現していることを見だし、MG-63細胞株にて発現阻害を行うと遊走能と浸潤能が抑制されることを示した¹⁷⁾。またZhuらはmiR-183がezrinを標的遺伝子として上述したmiR-21と同様の機能を有することを示している¹⁸⁾。一方、Duanらは骨芽細胞株と骨肉腫細胞株を用いた発現解析によりmiR-199-3pが後者で低発現していることを見だし、その細胞内導入によりMET, mTOR, STAT3, MCL-1, BCLを抑制して細胞増殖および遊走能を抑制することを示した¹⁹⁾。LiuらもmiR-125bがSTAT3を介して同様の機能を有することを報告している²⁰⁾。また、Osakiらは骨肉腫高転移細胞株143Bとその親株である低転移細胞株HOSを比較した発現解析から、miR-143が高転移細胞株で発現が低く、細胞内に導入することにより浸潤能を抑制することを見だし²¹⁾、次項に示す動物治療モデルを用いて核酸医薬としての可能性を検討している。

b. Ewing肉腫

Ewing肉腫の90%以上に染色体転座t(11;22)がみられ、その転座の結果、異常な融合遺伝子EWS-Fli1が生じることがこの肉腫の特徴である。この融合遺伝子によって発現抑制されるmiRNAはmiR-100, -125b,

-22, -221/222, -27a, -29a, -145と多岐にわたるが²²⁾、特にmiR-145はこの融合遺伝子自体を標的とし、EWS-Fli1と正のfeedback loopを形成することが知られている²³⁾。EWS-Fli1はlet-7aも標的としており、このがん抑制性let-7aはHMGA2を標的とすることで肉腫形成に関与することが報告されている²⁴⁾。さらにこの融合遺伝子はmiR-708の発現を抑制することでDNA修復機能を有する標的遺伝子EYA3を上昇させ、化学療法奏効性も制御していることがわかった²⁵⁾。予後と関連するmiRNAとしてはmiR-34aが特定されており、NakataniらはmiR-34aの発現底値が予後不良に相関し、細胞株におけるmiR-34の強制発現により化学療法に対する奏効性の向上がみられたことを報告している²⁶⁾。

c. 脊索腫

細胞株と臨床検体を用いた解析により、DuanらはmiR-1, -206が脊索腫において発現低値を示していることを報告している²⁷⁾。特にmiR-1の強制発現により脊索腫細胞の増殖を抑制し、転移と関連するMETとHDAC4の発現を低下させることが示されている。

2) 軟部腫瘍(表2)

a. 脂肪肉腫

組織学的亜型として、異型脂肪腫様腫瘍(atypical lipomatous tumor: ALT)/高分化型脂肪肉腫(well differentiated liposarcoma: WDLs)、脱分化型脂肪肉腫(dedifferentiated liposarcoma:DDLs)、粘液型脂肪肉腫(myxoid liposarcoma)、円形細胞型脂肪肉腫(round cell liposarcoma)、多形型脂肪肉腫(pleomorphic liposarcoma)、混合型脂肪肉腫(mixed-type liposarcoma)に分類され、このうち脱分化型脂肪肉腫と粘液型脂肪肉腫におけるmiRNAの発現異常が報告されている。Ugrasらは正常脂肪組織、高分化型脂肪肉腫、脱分化型脂肪肉腫に対するRNAシーケンシングおよびマイクロアレイ解析により、脱分化型脂肪肉腫においてmiR-21, -26aが発現高値を、miR-143, -145が発現低値を示すことを見いだした。miR-143はBCL2, topoisomerase 2A(TOP2A), protein regulator of cytokinesis 1(PRC1), polo-like kinase 1(PLK1)を抑制し、腫瘍増殖およびアポトーシスを促進することが確認された²⁸⁾。ZhangらはmiR-155が脱分化型脂肪肉腫において高発現し、 β -catenin経路とcyclin D1と関連するcasein kinase 1 α (CK1 α)が標的遺伝子であることを示した²⁹⁾。Taylorらは脱分化型脂肪肉腫においてメチル化によりmiR-193bが抑制されていることを見いだした³⁰⁾。Hisaokaらは脂肪分化を抑制するcalreticulin(CALR)が脱分化型脂肪肉腫で高発現し、それを標的とするmiR-1257が発現低値を示していることを報告した³¹⁾。粘液型脂肪肉腫にお

表 2 軟部腫瘍における microRNA の発現異常

組織型	miRNAs	腫瘍内 発現	関連する性質	標的遺伝子	文献
脂肪肉腫	miR-21, -26a (DDL5)	高	—	—	
	miR-143, -145 (DDL5)	低	腫瘍増殖, アポトーシス	BCL2, TOP2A, PRC1, PLK1	Ugras ら, 2011
	miR-155 (DDL5)	高	腫瘍増殖	CK1 α	Zhang ら, 2012
	miR-193b (DDL5)	低	メチル化	—	Taylor ら, 2011
	miR-1257 (DDL5)	低	脂肪分化阻害	CALR	Hisaoka ら, 2012
線維肉腫	miR-486 (MLS)	低	腫瘍増殖	PAI-1	Borjigin ら, 2012
	miR-520c, -373	高	腫瘍増殖, 遊走能	mTOR, SIRT1	Liu ら, 2012
平滑筋肉腫	miR-409-3p	低	腫瘍増殖, 血管新生	angiogenin	Weng ら, 2012
	miR-1, -133a, -133b (四肢・後腹膜)	高	—	—	Subramanian ら, 2008
	miR-17-92 cluster (子宮)	高	—	—	Danielson ら, 2010
横紋筋肉腫	let-7 (子宮)	高	腫瘍増殖	HMGA2	Shi ら, 2008
	miR-221 (子宮)	高	—	—	Nuovo ら, 2008
	miR-1, -133	低	腫瘍増殖, 筋分化	—	Rao ら, 2010
	miR-206	低	腫瘍増殖, 筋分化, 予後良好と相関	c-Met	Taulli ら, 2009
	miR-335 (ARMS)	高	—	CHFR, HAND1	Subramanian ら, 2008
	miR-29	低	腫瘍増殖, 筋分化	YY-1	Wang ら, 2008
	miR-183	高	腫瘍促進	EGR1, PTEN	Sarver ら, 2010
	miR-17-92 cluster (ARMS)	高	予後不良と相関	—	Reichek ら, 2011
	miR-485-3p	低*	化学療法抵抗性	NF-YB	Chen ら, 2011
	血管肉腫	miR-515-3p, -515-5p, -517a, -517c, -518b, -519a, -522	高	—	—
滑膜肉腫	miR-183	高	—	EGR1, PTEN	Sarver ら, 2010
	let-7e, miR-99b, miR-125a-3p	高	腫瘍増殖	HMGA2, SMARCA5	Hisaoka ら, 2011
悪性末梢神経鞘腫	miR-143	低	腫瘍増殖	ERK5, SSX1	Subramanian ら, 2008
	miR-34a	低	アポトーシス	MYCN, E2F2, CDK4	Subramanian ら, 2010
	miR-214	高	—	PTEN	Subramanian ら, 2010
	miR-10b	高	腫瘍増殖, 遊走能・浸潤能	neurofibroma	Chai ら, 2010
	miR-21	高	アポトーシス	PDCD4	Itani ら, 2012
軟部腫瘍	miR-204	低	腫瘍増殖, 遊走能・浸潤能	HMGA2	Gong ら, 2012
	miR-210	—	予後と発症年齢に相関	—	Greither ら, 2012

DDL5: 脱分化型脂肪肉腫, MLS: 粘液型脂肪肉腫, ARMS: 胞巣型横紋筋肉腫, —: 未発表もしくは未特定,

*: 化学療法抵抗性を示す腫瘍における発現

いては、融合遺伝子 TLS-CHOP が miR-486 の抑制を介してその標的である plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) を活性化させ、腫瘍増殖に寄与していることが Borjigin らにより示されている³²⁾。

b. 線維肉腫

HT1080 細胞株における発現解析の報告のみにとどまるが、Liu と Wilson は同細胞株において発現が亢進している miR-520c と miR-373 が mTOR および SIRT1 を標的とし、結果的に MMP9 の発現を亢進させ、細胞の遊走能や増殖を促進させていることを示した³³⁾。それに対し Weng らは、miR-409-3p が HT1080 細胞株において angiogenin を抑制し、腫瘍増殖および血管新生、ひいては転移を抑える可能性を論じている³⁴⁾。

c. 平滑筋肉腫

Subramanian らは良性のカウンターパートに当たる平滑筋腫との発現比較において、筋発生や筋分化にかかわる miR-1, -133a, -133b が四肢、後腹膜発生の平滑筋肉腫で高発現していることを示した⁵⁾。Danielson らは子宮発生平滑筋肉腫において、正常子宮組織と比べて miR-17-92 cluster が高発現を示していると報告した³⁵⁾。一方 Shi らは let-7 とその標的遺伝子である HMGA2 の関係性が平滑筋腫の悪性化に寄与することを報告した³⁶⁾。また、Nuovo らは miR-221 の発現が子宮平滑筋腫 15 例中 13 例に認められ、平滑筋腫およびまれな良性転移性平滑筋腫との鑑別方法の一つとなり得ると発表している³⁷⁾。

d. 横紋筋肉腫

組織学的に胎児型 (embryonal type), 胞巣型 (alveolar type), 多形型 (pleomorphic type) に大別され, 組織別の発現解析が行われている。また, その発生が骨格筋前駆細胞由来と考えられていることから, 筋原性にかかわる miRNA の発現解析も行われている。Rao らは miR-1, -133 が胎児型および胞巣型横紋筋肉腫細胞株において発現底値を示すことを報告した³⁸⁾。Taulli, Yan らは miR-206 が横紋筋肉腫細胞株の筋への分化を促進しつつ腫瘍形成を抑制し³⁹⁾, 横紋筋肉腫においては c-Met を標的として抑制していることを示した⁴⁰⁾。胞巣型横紋筋肉腫においては miR-335 の発現が高く, 本組織型に特徴的な遺伝子相互転座である PAX3-FKHR の主因となる PAX3 の下流で機能し, 筋分化に関与する MEST に近接した遺伝子座に位置することを Subramanian らは示している⁵⁾。筋発生に関与しない miRNA として, miR-29 が横紋筋肉腫で発現低値を示し, miR-183 が発現高値を示していることを Wang ら⁴¹⁾, Sarver ら⁴²⁾ は報告している。予後に相関する miRNA として, miR-17-92 cluster の発現高値が胞巣型横紋筋肉腫の予後と相関し⁴³⁾, miR-206 の発現低値が進行期症例の予後不良と相関することが知られている⁴⁴⁾。化学療法奏効性に関与する miRNA としては miR-485-3p が報告されている。Chen らは Rh30 細胞株における miR-485-3p の強制発現により NF-YB が抑制され topoisomerase II の発現が上昇することで, 化学療法抵抗性が改善することを明らかにした⁴⁵⁾。

e. 血管肉腫

前述した S-MED では miR-515-3p, -515-5p, -517a, -517c, -518b, -519a, -522 の発現が他の肉腫と比べて高値を示すことが記載されているが, それらの機能については解析されていない⁶⁾。

f. 滑膜肉腫

滑膜肉腫は SS18-SSX 融合遺伝子の発現を特徴とするが, SS18-SSX はがん抑制遺伝子 EGFR1 の発現を抑制していることが以前より知られていた。その分子機構の解明を目的として, Sarver らは miR-183 がこの EGFR1 を標的として発現を抑制し, がん促進性 miRNA として機能することを明らかにした⁴²⁾。また Hisaoka らは遺伝子転座を示す肉腫における miRNA のマイクロアレイ解析のなかで, let-7e, miR-99b, miR-125-3p を含む 21 種類の miRNA が滑膜肉腫において発現高値を示すことを報告した⁴⁶⁾。特に let-7e, miR-99b の阻害剤による機能解析においては, HMGA2 と SMARCA5 の発現上昇を介して腫瘍増殖が抑制されることが示された。Subramanian は, 滑膜肉腫において発現が低

い miRNA として miR-143 を特定し, これが腫瘍増殖を促進させる ERK5 (MAPK7) だけでなく SSX1 も標的遺伝子とすることを明らかにしている⁵⁾。

g. 悪性末梢神経鞘腫 (malignant peripheral nerve sheath tumor: MPNST)

Subramanian らは良性のカウンターパートである神経線維腫 (neurofibroma: NF) との miRNA プロファイリングから, MPNST の腫瘍組織において miR-34a が低値を示し, p53 不活化とともに腫瘍形成に寄与する可能性を報告した⁴⁷⁾。MPNST 細胞株にこの miR-34a を導入することによりアポトーシスが促進されることが確認された。また, MPNST の腫瘍組織においては miR-214 が高値を示していることが判明し, TWIST1 による miR-214 の賦活化とその標的である PTEN の抑制が腫瘍形成に寄与していることが示された。一方, Itani らは NF に比べ MPNST で miR-21 が有意に発現高値を示し, programmed cell death protein 4 (PDCD4) を標的としてアポトーシスを制御していることを明らかにした⁴⁸⁾。Chai らは NF1 患者の神経線維腫由来の Schwann 細胞と MPNST 由来の腫瘍細胞において miR-10b が高発現しており, その発現抑制により細胞増殖, 遊走能, 浸潤能が抑制されると報告した⁴⁹⁾。また, Gong らは MPNST において LOH が高率にみられる遺伝子座から発現する miR-204 が低値を示し, Ras 経路や HMGA2 発現を促進していることを見いだしている⁵⁰⁾。

h. その他

成人発症軟部腫瘍 78 例における miRNA 解析では, 低酸素状態で発現が制御される miR-210 の発現と女性軟部腫瘍患者の予後および男性軟部腫瘍患者における発症年齢が相関関係にあることが示されている⁵¹⁾。

2. 新規治療戦略への応用

がんにおける発現異常が次々と報告されるなか, miRNA の臨床応用をめざした研究も成果を遂げている。miRNA を標的としたがん治療の開発戦略は, (1) がんで発現亢進している miRNA の機能を阻害する方法, (2) がんで発現抑制されている miRNA を補充する方法に大別される。以下に miRNA 機能阻害および miRNA 補充によるそれぞれの治療に向けたこれまでの知見を述べる (図 2)。

1) miRNA 機能阻害による治療法

miRNA の機能阻害法として発現している miRNA に相補的に結合し, その機能を減弱させる方法が開発されている。これらの阻害剤が細胞内および血中で安定性を維持するためには各塩基に対する化学修飾が必要で, その修飾方法の違いにより, ① anti-miRNA antisense oligonucleotide (AMO), ② miRNA sponge, ③ miRNA

eraser, ④ tough decoy などが開発されている⁵²⁾。そのうち現在最も広く用いられているのは AMO で、① 2'-O-methylated (2'-O-Me) RNA, ② locked nucleic acid (LNA), ③ antagomiR, ④ 2'-methoxyethylated RNA などが報告されている⁵³⁾。先行しているのは LNA の開発で、リボ核酸の五炭糖の 2' 位と 4' 位とがメチレン架橋 (O-CH₂-架橋) され、コンフォメーションを N 型となるよう化学修飾されることにより対象核酸分子とのハイブリダイゼーションが強化されている⁵³⁾。すでにデンマークのサンタリス・ファーマ社が慢性 C 型肝炎に対する治療薬として応用しており、同社は LNA 誘導体を利用した miR-122 の阻害剤の投与により C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制することに成功し、第 II 相臨床試験に入っている⁵⁴⁾。また、われわれのグループも LNA を用いた miRNA 阻害による骨肉腫がん幹細胞性質制御を目的とした前臨床試験を試みている。このように miRNA

を対象にした医薬品開発も目覚ましい進展をみせており、骨軟部腫瘍に対する応用も期待される。

2) miRNA 補充による治療法

miRNA の補充法は、疾患患部で発現低下した miRNA を合成した miRNA の注入で回復させる方法である。細胞内で内因性の機構を利用しながら成熟した miRNA ヘプロセッシングさせることで、その機能を発揮することができる⁵²⁾。合成核酸分子の構造には、これまで開発されてきた siRNA 医薬と同様の二本鎖 RNA 分子と、dicer による切断を受ける前の構造であるヘアピン型一本鎖 pre-miRNA があげられる。

Osaki らはこの方法を用いて骨肉腫の肺転移抑制をねらった前臨床試験を展開している。前述したように、彼らはヒト骨肉腫高転移細胞株と低転移細胞株を比較し、前者で発現が低くかつ細胞の浸潤能に關与する miR-143 を同定した。さらに骨肉腫自然肺転移モデルマウスへの経静脈的 miR-143 全身投与により、原発巣の増殖には影響しないものの肺転移巣形成を抑制した(図 3)²¹⁾。またその機序として、miR-143 の補充により骨肉腫細胞内におけるマトリックスプロテアーゼ 13 (MMP13) 蛋白質量が減少し、肺転移形成を抑制することが示された²¹⁾。このようにすでに骨肉腫における miRNA 補充による治療の可能性が示されており、臨床応用が期待される。

核酸医薬の生体投与においては、腫瘍に薬剤を送達させるためのドラッグデリバリーシステム (DDS) の確立が重要な鍵となる。リポソーム表面の糖鎖修飾を行い、細胞特異性や血中安定性を改良した微小粒子⁵⁵⁾、血液脳関門を通過できる RVG ペプチド⁵⁶⁾、ウイルスベクター

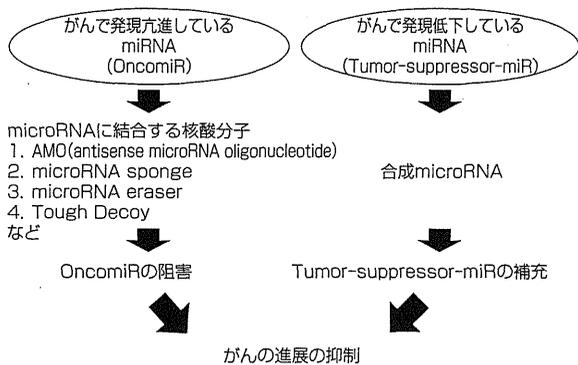
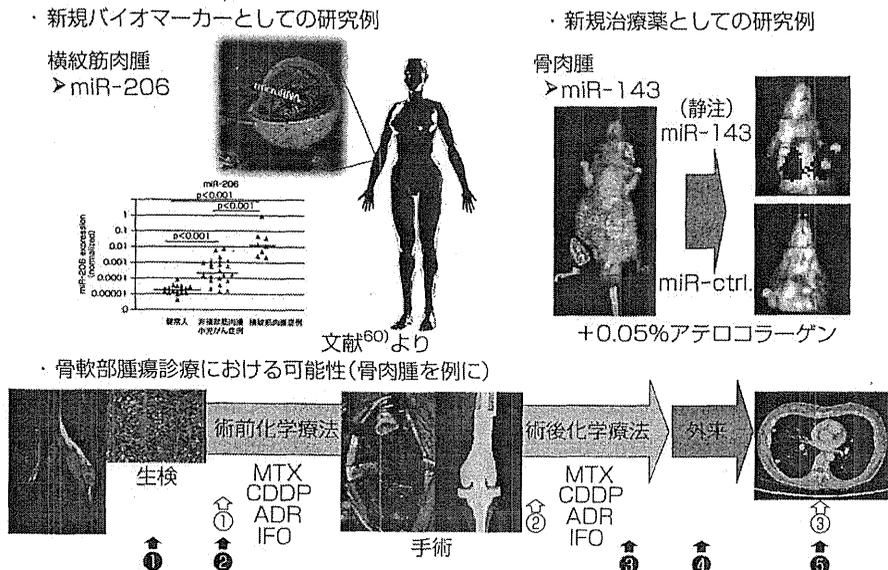


図 2 MicroRNA 発現量調整によるがん治療戦略 (文献⁵²⁾より改変)



バイオマーカーとしての可能性: ①鑑別診断, ②化学療法奏効性評価, ③治療効果判定, ④微小転移巣検索, ⑤転移巣治療効果判定
治療薬としての可能性: ①術前補助療法, ②術後補助療法, ③転移巣に対する補助療法

図 3 骨軟部腫瘍における新規バイオマーカーおよび新規治療薬としての可能性

などの種々の検討がなされてきているが、まだ決定的な DDS の技術は確立していない。Ochiya らのグループはアテロコラーゲンをを用いた核酸医薬の DDS 開発を行ってきており、全身投与に用いる DDS として優れた特性を示している⁵⁷⁾。アテロコラーゲンはウシ真皮由来の I 型コラーゲンの N, C 両末端を除き抗原性を低下させた蛋白で、正に荷電している。したがって毒性および免疫原性は低く、かつ負電荷をもつ核酸分子と静電的に結合し複合体を形成することで生体内で極めて安定に組織へ移行し、核酸分子とともに細胞内へ導入されることも明らかになっている。前述の miR-143 による肺転移抑制効果もこのアテロコラーゲンを DDS として用いており、マウスモデルにおける効果が実証されている²¹⁾。核酸医薬の臨床応用に向けた安全性および組織特異性を有する DDS の開発進展が望まれる。

3. 新規バイオマーカーとしての応用

miRNA はバイオマーカー開発への応用も期待されている。近年、がん細胞から miRNA が分泌され、血中に安定して存在することがわかってきた。この「分泌型 miRNA」を診断や予後予測に利用する研究が様々ながん種で試みられている。Yamamoto らは肝がんにおいて発現が上昇する miR-500 を同定し、肝がんの除去により血中から消失することを明らかにした⁵⁸⁾。また、Kuroda らはリンパ腫の患者群で miR-92a が低下していることを見だし、治療モニターとしても優れていることを示した⁵⁹⁾。

骨軟部腫瘍領域においては、Miyachi らが横紋筋肉腫患者における新規血清腫瘍マーカーの候補となる miRNA を特定している⁶⁰⁾。非横紋筋肉腫小児がん症例や健康人に比べ、横紋筋肉腫症例の患者血清において miR-206 の発現が有意に上昇していることが示された。さらに、治療前後のペア血清が得られている症例においては治療後に miR-206 の発現低下を認め、後に再発した症例ではその発現の再上昇が観察された⁶¹⁾。骨軟部腫瘍領域においても診断および治療モニターとしての分泌型 miRNA の有用性が示唆されてきている (図 3)。

そもそも血清には多くの RNase が存在し血清中の RNA は短時間で分解されると考えられてきたため、なぜ血中に安定して miRNA が存在するのかという新たな課題が提起されている。血清中に存在する核酸は、脂質二重膜やアポトーシス小体によって保護されていることがわかり、さらに免疫細胞どうしの細胞間情報伝達に用いられている直径 30~100 nm ほどのエクソソーム (exosome) のなかに miRNA が存在することも明らかになった⁶²⁾。これらが血液などの体液中に分泌されると考えられており、分泌型 miRNA の謎に迫る一つの手掛

かりとして研究が進んでいる。また、最近の研究から循環 miRNA を介した細胞間コミュニケーションの重要性に注目が集まっており、われわれは骨肉腫から分泌されたエクソソームが肺転移形成の手掛かりとなることを見だしている。エクソソーム自体を体液診断事業に活用しようとする海外のベンチャー企業の動きも活発化しており¹⁾、新規バイオマーカーならびに肉腫進行の謎に迫る分泌型 miRNA の研究進展が目まぐるしい。

おわりに

生体内で遺伝子発現を調節する RNA 干渉機構の発見以来、様々な疾患でその技術の臨床応用をめざした研究が遂行されている。骨軟部腫瘍領域においても、次世代医薬品と期待される核酸医薬としての miRNA 創薬の研究開発が盛んに行われている。多くの臨床試験において試用されている単一 pathway の阻害をねらった分子標的薬と異なり、複数の標的遺伝子を同時に制御する miRNA の生物学的特徴が腫瘍抑制にどこまで効果を示すか、大きな期待が寄せられる。表 1, 2 のように積み重なる miRNA の知見からいかにして critical な miRNA を抽出し、治療につなげられるかが課題となる。

また、骨軟部腫瘍の病理診断において、現行の疾患分類に当てはまらない症例も少なくないことが現状であり、疾患特異性をもつ miRNA による診断開発が期待される。化学療法奏効性および抵抗性を示す指標となり得ることも示されてきている⁶³⁾。miRNA 発現の汎用性のある評価方法の確立や知財の取り扱いなど解決すべき課題も残っているが、骨軟部腫瘍における診断・治療において新たなブレイクスルーとなる可能性を秘めた miRNA 研究の動向を見逃せない。

文 献

- 1) 新飯田俊平: 新たな核酸創薬への期待—マイクロ RNA 研究の最近の動向—. 科学技術動向 (124): 24-33, 2011.
- 2) Esquela-Kerscher A and Slack FJ: Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6(4): 259-269, 2006.
- 3) 小坂展慶, 井口晴久, 落谷孝広: miRNA 研究の最近の進歩—がん診断のマーカーとしての miRNA—分泌型 miRNA の機能と診断への応用. 生体の科学 61(4): 321-325, 2010.
- 4) 尾崎充彦: がん転移・浸潤に対する新たな治療戦略 05 microRNA によるがん転移の診断・治療. *メディカルバイオ* 6(3): 31-34, 2009.
- 5) Subramanian S, Lui WO, Lee CH, *et al*: MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene* 27(14): 2015-2026, 2008.
- 6) Sarver AL, Phalak R, Thayanithy V, *et al*: S-MED: sarcoma microRNA expression database. *Lab Invest* 90(5): 753-761, 2010.
- 7) Kobayashi E, Hornicek FJ and Duan Z: MicroRNA involvement in osteosarcoma. *Sarcoma* 2012: 2012.
- 8) Lulla RR, Costa FF, Bischof JM, *et al*: Identification of differentially expressed microRNAs in osteosarcoma. *Sarcoma* 2011: 2011.

- 9) Stabley D, Kamara D, Holbrook J, *et al*: Digital gene expression of miRNA in osteosarcoma xenografts: finding biological relevance in miRNA high throughput sequencing data. *J Biomol Tech* 21(3 Suppl): S25, 2010.
- 10) He C, Xiong J, Xu X, *et al*: Functional elucidation of MiR-34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. *Biochem Biophys Res Commun* 388(1): 35-40, 2009.
- 11) Yan K, Gao J, Yang T, *et al*: MicroRNA-34a inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells both in vitro and in vivo. *PLoS One* 7(3): e33778, 2012.
- 12) Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, *et al*: p53-responsive microRNAs 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res* 68(24): 10094-10104, 2008.
- 13) Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z, *et al*: Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. *Cancer Res* 70(5): 1906-1915, 2010.
- 14) Song B, Wang Y, Xi Y, *et al*: Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene* 28(46): 4065-4074, 2009.
- 15) Song B, Wang Y, Titmus MA, *et al*: Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Mol Cancer* 9: 96, 2010.
- 16) Gougelet A, Pissaloux D, Besse A, *et al*: Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. *Int J Cancer* 129(3): 680-690, 2011.
- 17) Ziyang W, Shuhua Y, Xiufang W, *et al*: MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration. *Med Oncol* 28(4): 1469-1474, 2011.
- 18) Zhu J, Feng Y, Ke Z, *et al*: Down-regulation of miR-183 promotes migration and invasion of osteosarcoma by targeting Ezrin. *Am J Pathol* 180(6): 2440-2451, 2012.
- 19) Duan Z, Choy E, Harmon D, *et al*: MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration. *Mol Cancer Ther* 10(8): 1337-1345, 2011.
- 20) Liu L, Li H, Li JP, *et al*: miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* 416(1-2): 31-38, 2011.
- 21) Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, *et al*: MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloproteinase-13 expression. *Mol Ther* 19(6): 1123-1130, 2011.
- 22) McKinsey E, Parrish JK, Irwin AE, *et al*: A novel oncogenic mechanism in Ewing sarcoma involving IGF pathway targeting by EWS/Flil-regulated microRNAs. *Oncogene* 30(49): 4910-4920, 2011.
- 23) Ban J, Jug G, Mestdagh P, *et al*: Hsa-mir-145 is the top EWS-FLI1-repressed microRNA involved in a positive feedback loop in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 30(18): 2173-2180, 2011.
- 24) De Vito C, Riggi N, Suva ML, *et al*: Let-7a is a direct EWS-FLI-1 target implicated in Ewing's sarcoma development. *PLoS One* 6(8): e23592, 2011.
- 25) Robin TP, Smith A, McKinsey E, *et al*: EWS/FLI1 regulates EYA3 in Ewing sarcoma via modulation of miRNA-708, resulting in increased cell survival and chemoresistance. *Mol Cancer Res* 10(8): 1098-1108, 2012.
- 26) Nakatani F, Ferracin M, Manara MC, *et al*: miR-34a predicts survival of Ewing's sarcoma patients and directly influences cell chemo-sensitivity and malignancy. *J Pathol* 226(5): 796-805, 2012.
- 27) Duan Z, Choy E, Nielsen GP, *et al*: Differential expression of microRNA (miRNA) in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression. *J Orthop Res* 28(6): 746-752, 2010.
- 28) Ugras S, Brill E, Jacobsen A, *et al*: Small RNA sequencing and functional characterization reveals MicroRNA-143 tumor suppressor activity in liposarcoma. *Cancer Res* 71(17): 5659-5669, 2011.
- 29) Zhang P, Bill K, Liu J, *et al*: MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1 α and enhances β -catenin signaling. *Cancer Res* 72(7): 1751-1762, 2012.
- 30) Taylor BS, DeCarolis PL, Angeles CV, *et al*: Frequent alterations and epigenetic silencing of differentiation pathway genes in structurally rearranged liposarcomas. *Cancer Discov* 1(7): 587-597, 2011.
- 31) Hisaoka M, Matsuyama A and Nakamoto M: Aberrant calreticulin expression is involved in the dedifferentiation of dedifferentiated liposarcoma. *Am J Pathol* 180(5): 2076-2083, 2012.
- 32) Borjigin N, Ohno S, Wu W, *et al*: TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 427(2): 355-360, 2012.
- 33) Liu P and Wilson MJ: miR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF- κ B factor in human fibrosarcoma cells. *J Cell Physiol* 227(2): 867-876, 2012.
- 34) Weng C, Dong H, Chen G, *et al*: miR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation, vascularization and metastasis by targeting angiogenin. *Cancer Lett* 323(2): 171-179, 2012.
- 35) Danielson LS, Menendez S, Attolini CS, *et al*: A differentiation-based microRNA signature identifies leiomyosarcoma as a mesenchymal stem cell-related malignancy. *Am J Pathol* 177(2): 908-917, 2010.
- 36) Shi G, Perle MA, Mittal K, *et al*: Let-7 repression leads to HMGA2 overexpression in uterine leiomyosarcoma. *J Cell Mol Med* 13(9B): 3898-3905, 2008.
- 37) Nuovo GJ and Schmittgen TD: Benign metastasizing leiomyoma of the lung: clinicopathologic, immunohistochemical, and micro-RNA analyses. *Diagn Mol Pathol* 17(3): 145-150, 2008.
- 38) Rao PK, Missiaglia E, Shields L, *et al*: Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *FASEB J* 24(9): 3427-3437, 2010.
- 39) Tauli R, Bersani F, Foglizzo V, *et al*: The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation. *J Clin Invest* 119(8): 2366-2378, 2009.
- 40) Yan D, Dong XDE, Chen X, *et al*: MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem* 284(43): 29596-29604, 2009.
- 41) Wang H, Garzon R, Sun H, *et al*: NF- κ B-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 14(5): 369-381, 2008.
- 42) Sarver AL, Li L and Subramanian S: MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGFR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res* 70(23): 9570-9580, 2010.
- 43) Reichek JL, Duan F, Smith LM, *et al*: Genomic and clinical analysis of amplification of the 13q31 chromosomal region in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res* 17(6): 1463-1473, 2011.
- 44) Missiaglia E, Shepherd C, Patel S, *et al*: MicroRNA-206 expression levels correlate with clinical behaviour of rhabdomyosarcomas. *Br J Cancer* 102(12): 1769-1777, 2010.
- 45) Chen CF, He X, Arslan AD, *et al*: Novel regulation of nuclear factor-YB by miR-485-3p affects the expression of DNA topoisomerase II α and drug responsiveness. *Mol*