

study in which the specimens of post-chemotherapy and metastasis have been analyzed. This is an important aspect remaining to be addressed to confirm the clinical significance of this research.

Despite the inconsistency in the definition and the CSC markers, new approaches have to be developed to overcome the most lethal characteristics, such as chemoresistance and metastasis. The final problem deals with targeting and killing these cells. Several suggestions and trials demonstrated in this chapter are summarized below.

1) Inhibition of the self-renewal pathway: The major focus has been on developmental signaling pathways, including Hedgehog, Notch, and Wnt, and novel agents inhibiting these pathways that have been used to target CSCs in multiple diseases. Clinical trials using inhibitors of the Hedgehog pathway (GDC-0449, PF-04449913, BMS-833923, IPI-926, and TAK-441), Notch pathway (RO4929097, BMS-906024, and MK0752), Wnt pathway (PRI-724 and telomerase [GRN163L]) have begun to emerge, but their efficacy against CSC function remains to be determined (Rasheed et al. 2011). Since little has been tried on sarcomas, novel trials against sarcomas would be expected. 2) Inhibition of the other molecular pathways: Although not reached to clinical trials, MEK inhibitor has been proposed for osteosarcoma CSC treatment. The evidences on the activation of MAPK pathways have emerged also in the other cancers. Then, multiple pathways including self-renewal or the other molecular pathways might be associated with the CSC phenotypes. Therefore, the most influential pathways should be discussed in each type of sarcomas. However, we have no idea how many pathways are enough to be inhibited for regulation of CSC phenotypes. Further analysis above single molecular pathways would be required. 3) Antibody drugs: Targeting antibodies specific to CSCs would be the ideal approach for the elimination of CSCs. However, a commonly used marker in CSC studies, CD133 (also known as prominin) for example, has been implied as a normal stem cell marker. Thus, targeting CD133 has the potential for significant side effects. This makes it difficult to target on the reported markers of CSCs, so that the novel markers that specify only cancer cells would be required. 4) microRNA: The use of a natural miRNA to suppress the CSC phenotypes is also a promising possibility as a new therapeutic strategy for the treatment of CSCs. miRNA also possesses the potential for use as a biomarker. The development of biomarker strategies that quantify CSCs in a serial fashion may provide novel endpoints to monitor CSC-based clinical trials. 5) Immunotherapy: The CTL-based immunotherapy targeting on SP cells has been recently proposed. Further analysis including in vivo assay or the strategy targeting on the other CSC markers would raise expectations for sarcoma treatments. 6) Others: The other alternatives include oncolytic viruses that seem to be well suited to eliminate CSCs because the viruses are

cytotoxic and not subject to the drug efflux, such as ABC transporters and defective apoptotic signaling (Cripe et al. 2009). Virotherapy could also be used to sensitize tumor cells to radiation and as tools for immunotherapy (Thorne et al. 2010). Furthermore, the stem cell niche should be analyzed and targeted because of the implications of their essential role in deciding the stem cell fate and resistance to therapeutic drugs.

CSC studies on sarcoma are in their infancy compared to studies of carcinomas and hematopoietic malignancy. In this regard, we hope for the increasing preclinical and clinical trials of targeting on sarcoma CSCs. Researchers would have to continue their efforts to provide better prognosis for many sarcoma patients all over the world.

Acknowledgments

This work was supported in part by a grant-in-aid for the Third-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control of Japan; a grant-in-aid for Scientific Research on Priority Areas Cancer from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology; and the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation of Japan.

References

- Adhikari, A.S., N. Agarwal, B.M. Wood, C. Porretta, B. Ruiz, R.R. Pochampally, and T. Iwakuma. 2010. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Res* 70: 4602–4612.
- Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, and M.F. Clarke. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3983–3988.
- Alison, M.R., S.M. Lim, and L.J. Nicholson. 2010. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol* 27.
- Altieri, D.C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3: 46–54.
- Ambroziak, W., G. Izaguirre, and R. 1999. Pieterszko. Metabolism of retinaldehyde and other aldehydes in soluble extracts of human liver and kidney. *J Biol Chem* 274: 33366–33373.
- Aogi, K., A. Woodman, V. Urquidi, D.C. Mangham, D.T. arin, and S. Goodison. 2000. Telomerase activity in soft-tissue and bone sarcomas. *Clin Cancer Res*. 6: 4776–4781.
- Aoyama, T., T. Okamoto, S. Nagayama, K. Nishijo, T. Ishibe, K. Yasura, T. Nakayama, T. Nakamura, and J. Toguchida. 2004. Methylation in the core-promoter region of the chondromodulin-I gene determines the cell-specific expression by regulating the binding of transcriptional activator Sp3. *J Biol Chem* 279: 28789–28797.
- Armstrong, L., M. Stojkovic, I. Dimmick, S. Ahmad, P. Stojkovic, N. Hole, and M. Lako. 2004. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 22: 1142–1151.
- Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770–776.

- Aryee, D.N., S. Niedan, M. Kauer, R. Schwentner, I.M. Bennani-Baiti, J. Ban, K. Muehlbacher, M. Kreppel, R.L. Walker, P. Meltzer, C. Poremba, R. Kofler, and H. Kovar. 2010. Hypoxia modulates EWS-FLI1 transcriptional signature and enhances the malignant properties of Ewing's sarcoma cells *in vitro*. *Cancer Res* 70: 4015–4023.
- Avilion, A.A., S.K. Nicolis, L.H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126–140.
- Awad, O., J.T. Yustein, P. Shah, N. Gul, V. Katuri, A. O'Neill, Y. Kong, M.L. Brown, J.A. Toretsky, and D.M. Loeb. 2010. High aldh activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to *ews-flil* inhibition. *PLoS One* 5: e13943.
- Bacci, G., S. Ferrari, F. Bertoni, P. Ruggieri, P. Picci, A. Longhi, R. Casadei, N. Fabbri, C. Fornii, M. Versari, and M. Campanacci. 2000. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the Istituto Ortopedico Rizzoli according to the Istituto Ortopedico Rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol* 18: 4016–4027.
- Baksh, D., and R.S. Tuan. 2007. Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 212: 817–826.
- Banas, A., T. Teratani, Y. Yamamoto, M. Tokuhara, F. Takeshita, M. Osaki, M. Kawamata, T. Kato, H. Okochi, and T. Ochiya. 2008. IFATS collection: *in vivo* therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 26: 2705–2712.
- Barker, N., M. Huch, P. Kujala, M. van de Wetering, H.J. Snippert, J.H. van Es, T. Safo, D.E. Stange, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, S. van den Brink, J. Korving, A. Abo, P.J. Peters, N. Wright, R. Poulsom, and H. Clevers. 2010. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units *in vitro*. *Cell Stem Cell* 6: 25–36.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
- Basu-Roy, U., E. Seo, L. Ramanathapuram, T.B. Rapp, J.A. Perry, S.H. Orkin, A. Mansukhani, and C. Basilico. 2011. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2011.405
- Bennani-Baiti, I.M., D.N. Aryee, J. Ban, I. Machado, M. Kauer, K. Muehlbacher, G. Amann, A. Llombart-Bosch, and H. Kovar. 2011. Notch signalling is off and is uncoupled from HES1 expression in Ewing's sarcoma. *J Pathol* 225: 353–363.
- Bielack, S., B. Kempf-Bielack, D. Schwenzler, T. Birkfellner, G. Delling, V. Ewerbeck, G.U. Exner, N. Fuchs, U. Göbel, N. Graf, U. Heise, K. Helmke, A.R. von Hochstetter, H. Jürgens, R. Maas, N. Münchow, M. Salzer-Kuntschik, J. Treuner, U. Veltmann, M. Werner, W. Winkelmann, A. Zoubek, and R. Kotz. 1999. Neoadjuvant therapy for localized osteosarcoma of extremities: results from the Cooperative osteosarcoma study group COSS of 925 patients. *Klin Padiatr* 211: 260–270.
- Bolós, V., J. Grego-Bessa, and J.L. de la Pompa. 2007. Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* 28: 339–363.
- Brady, M.S., G. Perino, G. Tallini, P. Russo, and J.M. Woodruff. 1996. Malignant mesenchymoma. *Cancer* 77: 467–473.
- Carpentino, J.E., M.J. Hynes, H.D. Appelman, T. Zheng, D.A. Steindler, E.W. Scott, and E.H. Huang. 2009. Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer Res* 69: 8208–8215.
- Catton, C., B. O'Sullivan, R. Bell, N. Laperriere, B. Cummings, V. Fornasier, and J. Wunder. 1996. Chordoma: Long-term follow-up after radical photon irradiation. *Radiother Oncol* 41: 67–72.
- Cha, E.J. 2011. Dedifferentiated liposarcoma of the small bowel mesentery presenting as a submucosal mass. *World J Gastrointest Oncol* 3: 116–118.

- Chambers, P.W., and C.P. Schwinn. 1979. Chordoma. A clinicopathologic study of metastasis. *Am J Clin Pathol* 72: 765–776.
- Charafe-Jauffret, E., C. Ginestier, F. Iovino, C. Tarpin, M. Diebel, B. Esterni, G. Houvenaeghel, J.M. Extra, F. Bertucci, J. Jacquemier, L. Xerri, G. Dontu, G. Stassi, Y. Xiao, S.H. Barsky, D. Birnbaum, P. Viens, and M.S. Wicha. 2010. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res.* 16: 45–55.
- Chiba, T., S. Miyagi, A. Saraya, R. Aoki, A. Seki, Y. Morita, Y. Yonemitsu, O. Yokosuka, H. Taniguchi, H. Nakauchi, and A. Iwama. 2008. The polycomb gene product *bmi1* contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68: 7742–7749.
- Cheng, J.X., B.L. Liu, and X. Zhang. 2009. How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? *Cancer Treat Rev* 35: 403–408.
- Chiyomaru, T., H. Enokida, S. Tatarano, K. Kawahara, Y. Uchida, K. Nishiyama, L. Fujimura, N. Kikkawa, N. Seki, and M. Nakagawa. 2010. miR-145 and miR-133a function as tumor suppressors and directly regulate *FSCN1* expression in bladder cancer. *Br J Cancer* 102: 883–891.
- Chugh, R., H. Tawbi, D.R. Lucas, J.S. Biermann, S.M. Schuetze, and L.H. Baker. 2007. Chordoma: the nonsarcoma primary bone tumor. *Oncologist* 12: 1344–1350.
- Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, and G.M. Wahl. 2006. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339–9344.
- Clevers, H. 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 17: 313–319.
- Collins, A.T., P.A. Berry, C. Hyde, M.J. Stower, and N.J. Maitland. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65: 10946–10951.
- Cripe, T.P., P.Y. Wang, P. Marcato, Y.Y. Mahller, and P.W. Lee. 2009. Targeting cancer-initiating cells with oncolytic viruses. *Mol Ther* 17: 1677–1682.
- Croce, C.M. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10: 704–714.
- Dahlin, D.C., and J.W. Beabout. 1971. Dedifferentiation of lowgrade chondrosarcomas. *Cancer* 28: 461–466.
- Da Silva Meirelles, L., T.T. Sand, R.J. Harman, D.P. Lennon, and A.I. Caplan. 2009. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng Part A* 15: 221–229.
- David, E., F. Blanchard, M.F. Heymann, G. De Pinieux, F. Gouin, F. Rédini, and D. Heymann. 2011. The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumor Growth and also a Source of New Therapeutic Targets. *Sarcoma* 2011: 932451.
- De Giovanni, C., L. Landuzzi, G. Nicoletti, P.L. Lollini, and P. Nanni. 2009. Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Future Oncol* 5: 1449–1475.
- De Jong, J., and L.H. Looijenga. 2006. Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: history and future. *Crit Rev Oncog* 12: 171–203.
- Di Fiore, R., A. Santulli, R.D. Ferrante, M. Giuliano, A. De Blasio, C. Messina, G. Pirozzi, V. Tirino, G. Tesoriere, and R. Vento. 2009. Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-stem cells by long-term 3-aminobenzamide treatment. *J Cell Physiol* 219: 301–313.
- Ding, Y., E.A. Boguslawski, B.D. Berghuis, J.J. Young, Z. Zhang, K. Hardy, K. Furge, E. Kort, A.E. Frankel, R.V. Hay, J.H. Resau, and N.S. Duesbery. 2008. Mitogen-activated protein kinase signaling promotes growth and vascularization of fibrosarcoma. *Mol Cancer Ther* 7: 648–658.
- Dorfman, H.D., and B. Czerniak. 1995. Bone cancers. *Cancer* 75: 203–210.
- Downing, J.R., A. Khandekar, S.A. Shurtleff, D.R. Head, D.M. Parham, B.L. Webber, A.S. Pappo, M.G. Hulshof, W.P. Conn, and D.N. Shapiro. 1995. Multiplex RT-PCR assay

- for the differential diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Am J Pathol* 146: 626–634.
- Duester, G., F.A. Mic, and A. Molotkov. 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143–144: 201–210.
- Eilber, F.C., M.F. Brennan, F.R. Eilber, J.J. Eckardt, S.R. Grobmyer, E. Riedel, C. Forscher, R.G. Maki, and S. Singer. 2007. Chemotherapy is associated with improved survival in adult patients with primary extremity synovial sarcoma. *Ann Surg* 246: 105–113.
- Engin, F., Z. Yao, T. Yang, G. Zhou, T. Bertin, M.M. Jiang, Y. Chen, L. Wang, H. Zheng, R.E. Sutton, B.F. Boyce, and B. Lee. 2008. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med* 14: 299–305.
- Entz-Werle, N., L. Marcellin, M.P. Gaub, E. Guerin, A. Schneider, P. Berard-Marec, C. Kalifa, L. Brugiere, H. Pacquement, C. Schmitt, M.D. Tabone, C. Jeanne-Pasquier, P. Terrier, F. Dijoud, P. Oudet, P. Lutz, and A. Babin-Boilletot. 2005. Prognostic significance of allelic imbalance at the c-kit gene locus and c-kit overexpression by immunohistochemistry in pediatric osteosarcomas. *J Clin Oncol* 23: 2248–2255.
- Entz-Werle, N., M.P. Gaub, T. Lavaux, L. Marcellin, N. Metzger, P. Marec-Berard, C. Schmitt, L. Brugiere, C. Kalifa, M.D. Tabone, H. Pacquement, P. Gentet, P. Lutz, P. Oudet, and A. Babin. 2007. KIT gene in pediatric osteosarcomas: could it be a new therapeutic target? *Int J Cancer* 120: 2510–2516.
- Esiashvili, N., M. Goodman, and R.B. Marcus Jr. 2008. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol* 30: 425–430.
- Esnaola, N.F., B.P. Rubin, E.H. Baldini, N. Vasudevan, G.D. Demetri, C.D. Fletcher, and S. Singer. 2001. Response to chemotherapy and predictors of survival in adult rhabdomyosarcoma. *Ann Surg* 234: 215–223.
- Evans, H.L., A.G. Ayala, and M.M. Romsdahl. 1977. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* 40: 818–831.
- Evans, H.L. 1979. Liposarcoma: a study of 55 cases with reassessment of its classification. *Am J Surg Pathol* 3: 507–523.
- Farshid, G., M. Pradhan, J. Goldblum, and S.W. Weiss. 2002. Leiomyosarcoma of somatic soft tissues: a tumor of vascular origin with multivariate analysis of outcome in 42 cases. *Am J Surg Pathol* 26: 14–24.
- Ferguson, W., and A. Goorin. 2001. Current treatment of osteosarcoma. *Cancer Invest* 19: 292–315.
- Ferraresi, V., C. Nuzzo, C. Zoccali, F. Marandino, A. Vidiri, N. Salducca, M. Zeuli, D. Giannarelli, F. Cognetti, and R. Biagini. 2010. Chordoma: clinical characteristics, management and prognosis of a case series of 25 patients. *BMC Cancer* 10: 22.
- Ferrari, A., G. Bisogno, R. Alaggio, G. Cecchetto, P. Collini, A. Rosolen, C. Meazza, P. Indolfi, A. Garaventa, L. De Sio, P. D'Angelo, P. Tamaro, M. Casanova, and M. Carli. 2008. Synovial sarcoma of children and adolescents: the prognostic role of axial sites. *Eur J Cancer* 44: 1202–1209.
- Ferrari, S., E. Palmerini, E.L. Staals, M. Mercuri, B. Franco, P. Picci, and G. Bacci. 2009. The treatment of nonmetastatic high grade osteosarcoma of the extremity: review of the Italian Rizzoli experience. Impact on the future. *Cancer Treat Res* 152: 275–287.
- Fibbe, W.E. 2002. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 61: ii29–31.
- Fletcher, C.D.M., K.K. Unni, and F. Mertens. 2002. World Health Organisation classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. IARC Press, Lyon, France.
- Fleming, G.F., P.S. Heimann, J.K. Stephens, M.A. Simon, M.K. Ferguson, R.S. Benjamin, and B.L. Samuels. 1993. Dedifferentiated chordoma. Response to aggressive chemotherapy in two cases. *Cancer* 72: 714–718.

- Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4: 267–274.
- Fuchs, D., V. Daniel, M. Sadeghi, G. Opelz, and C. Naujokat. 2010. Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 1098–1104.
- Fujii, H., K. Honoki, T. Tsujiuchi, A. Kido, K. Yoshitani, and Y. Takakura. 2009. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int J Oncol* 34: 1381–1386.
- Furlong, M.A., T. Mentzel, and J.C. Fanburg-Smith. 2001. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adults: a clinicopathologic study of 38 cases with emphasis on morphologic variants and recent skeletal muscle-specific markers. *Mod Pathol* 14: 595–603.
- Galli, R., U. Borello, A. Gritti, M.G. Minasi, C. Bjornson, M. Coletta, M. Mora, M.G. De Angelis, R. Fiocco, G. Cossu, and A.L. Vescovi. 2000. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 3: 986–991.
- Geller, D.S., and R. Gorlick. 2010. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin Adv Hematol Oncol* 8: 705–718.
- Gelderblom, H., P.C. Hogendoorn, S.D. Dijkstra, C.S. van Rijswijk, A.D. Krol, A.H. Taminau, and J.V. Bovée. 2008. The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist* 13: 320–329.
- Gibbs, C.P., V.G. Kukekov, J.D. Reith, O. Tchigrinova, O.N. Suslov, E.W. Scott, S.C. Ghivizzani, T.N. Ignatova, and D.A. Steindler. 2005. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7: 967–976.
- Gidekel, S., G. Pizov, Y. Bergman, and E. Pikarsky. 2003. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 4: 361–370.
- Goodell, M.A., M. Rosenzweig, H. Kim, D.F. Marks, M. DeMaria, G. Paradis, S.A. Grupp, C.A. Sieff, R.C. Mulligan, and R.P. Johnson. 1997. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3: 1337–1345.
- Gregory, C.A., H. Singh, A.S. Perry, and D.J. Prockop. 2003. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 278: 28067–28078.
- Gronthos, S., S.E. Graves, S. Ohta, and P.J. Simmons. 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84: 4164–4173.
- Guo, L., R.C. Zhao, and Y. Wu. 2011. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 39: 608–616.
- Gupta, P.B., T.T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R.A. Weinberg, and E.S. Lander. 2009. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138: 645–659.
- Halldorsson, A., S. Brooks, S. Montgomery, and S. Graham. 2009. Lung metastasis 21 years after initial diagnosis of osteosarcoma: a case report. *J Med Case Reports* 3: 9298.
- Heddleston, J.M., Z. Li, J.D. Lathia, S. Bao, A.B. Hjelmeland, and J.N. Rich. 2010. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 102: 789–795.
- Henriksen, J., M. Stabell, L.A. Meza-Zepeda, S.A. Lauvrak, M. Kassem, and O. Myklebost. 2010. Identification of target genes for wild type and truncated HMGA2 in mesenchymal stem-like cells. *BMC Cancer* 10: 329.
- Hermann, P.C., S.L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J.W. Ellwart, M. Guba, C.J. Bruns, and C. Heeschen. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1: 313–323.
- Hess, D.A., T.E. Meyerrose, L. Wirthlin, T.P. Craft, P.E. Herrbrich, M.H. Creer, and J.A. Nolte. 2004. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 104: 1648–1655.
- Higinbotham, N.L., R.F. Phillips, H.W. Farr, and H.O. Hustu. 1967. Chordoma. Thirty-five year study at Memorial Hospital. *Cancer* 20: 1841–1850.

- Hirotsu, M., T. Setoguchi, Y. Matsunoshita, H. Sasaki, H. Nagao, et al. 2009. Tumor formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells. *Br J Cancer* 101: 2030–2037.
- Honoki, K., H. Fujii, A. Kubo, A. Kido, T. Mori, Y. Tanaka, and T. Tsujiuchi. 2010. Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol Rep* 24: 501–505.
- Honoki, K. 2010. Do stem-like cells play a role in drug resistance of sarcomas? *Expert Rev Anticancer Ther* 10: 261–270.
- Huang, X., and J. Saint-Jeannet. 2004. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Developmental Biology* 275: 1–11.
- Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17: 548–558.
- Ibrahim, S.F., A.H. Diercks, T.W. Petersen, and G. van den Engh. 2007. Kinetic analyses as a critical parameter in defining the side population (SP) phenotype. *Exp Cell Res* 313: 1921–1926.
- Ischenko, I., H. Seeliger, M. Schaffer, K.W. Jauch, and C.J. Bruns. 2008. Cancer stem cells: how can we target them? *Curr Med Chem* 15: 3171–3184.
- Iwasaki, H., and T. Suda. 2009. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Sci* 100: 1166–1172.
- James, G., M. Crocker, A. King, I. Bodi, A. Ibrahim, and B.P. Chitnavis. 2008. Malignant triton tumors of the spine. *J Neurosurg Spine* 8: 567–573.
- Jamil, N., S. Howie, and D.M. Salter. 2010. Therapeutic molecular targets in human chondrosarcoma. *Int J Exp Pathol* 91: 387–393.
- Jedlicka, P. 2010. Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. *Int J Clin Exp Pathol* 19 3: 338–347.
- Jones, R.L., C. Fisher, O. Al-Muderis, and I.R. Judson. 2005. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur J Cancer* 41: 2853–2860.
- Jiang, X., Y. Gwyne, D. Russell, C. Cao, D. Douglas, L. Hung, H. Kovar, T.J. Triche, E.R. Lawlor. 2010. CD133 expression in chemo-resistant Ewing sarcoma cells. *BMC Cancer* 26 10: 116.
- Katoh, M., C. Shaw, Q. Xu, N. Van Driessche, T. Morio, H. Kuwayama, S. Obara, H. Urushihara, Y. Tanaka, and G. Shaulsky. 2004. An orderly retreat: Dedifferentiation is a regulated process. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7005–7010.
- Kawamoto, E.H., N. Weidner, R.M. Agostini Jr, and R. Jaffe. 1987. Malignant ectomesenchymoma of soft tissue report of two cases and review of the literature. *Cancer* 59: 1791–1802.
- Kawai, A., J. Woodruff, J.H. Healey, M.F. Brennan, C.R. Antonescu, and M. Ladanyi. 1998. SYT-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma. *N Engl J Med* 338: 153–160.
- Kelly, S.E., A. Di Benedetto, A. Greco, C.M. Howard, V.E. Sollars, D.A. Primerano, J.V. Valluri, and P.P. Claudio. 2010. Rapid selection and proliferation of CD133+ cells from cancer cell lines: chemotherapeutic implications. *PLoS One* 5: e10035.
- Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 126–139.
- Kosaka, N., H. Iguchi, and T. Ochiya. 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 101: 2087–2092.
- Kubo, T., T. Sugita, S. Shimose, T. Matsuo, K. Arihiro, and M. Ochi. 2008. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its relationship to tumor angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumors. *J Bone Joint Surg Br* 90: 364–370.
- Kuhn, N.Z., and R.S. Tuan. 2010. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* 222: 268–277.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, and J.E. Dick. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645–648.
- Le Douarin, N.M., G.W. Calloni, and E. Dupin. 2008. The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle* 7: 1013–1019.

Current Organ Topics:	<p>Musculoskeletal Tumor 骨・軟部 腫瘍</p> <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 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} (*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

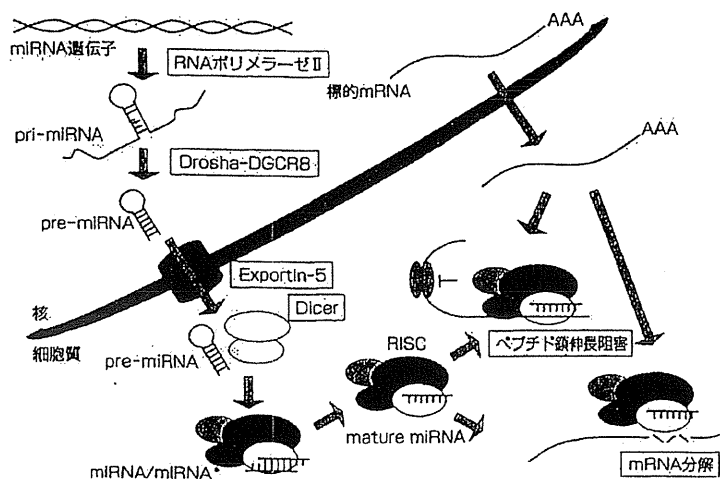


図 1 MicroRNA 生成および作用機構
miRNA*: 分解される RNA 鎖

表 1 骨腫瘍における microRNA の発現異常

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 D2, 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)	HMGA2	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	
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 と相関する 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ことを報告している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。予後と相関する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、転移と相関する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と相関する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

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, PRCL1, 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	
	let-7 (子宮)	高	腫瘍増殖	HMGA2	Shi ら, 2008	
横紋筋肉腫	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	—	—	Sarver ら, 2010
		miR-183	高	—	EGR1, PTEN	Sarver ら, 2010
滑膜肉腫	let-7e, miR-99b, miR-125a-3p	高	腫瘍増殖	HMGA2, SMARCA5	Hisaoka ら, 2011	
	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	
悪性末梢神経鞘腫	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	
	miR-204	低	腫瘍増殖, 遊走能・浸潤能	HMGA2	Gong ら, 2012	
軟部腫瘍	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肉腫 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関与する 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

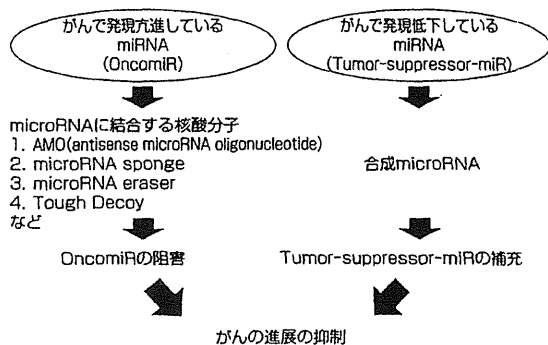
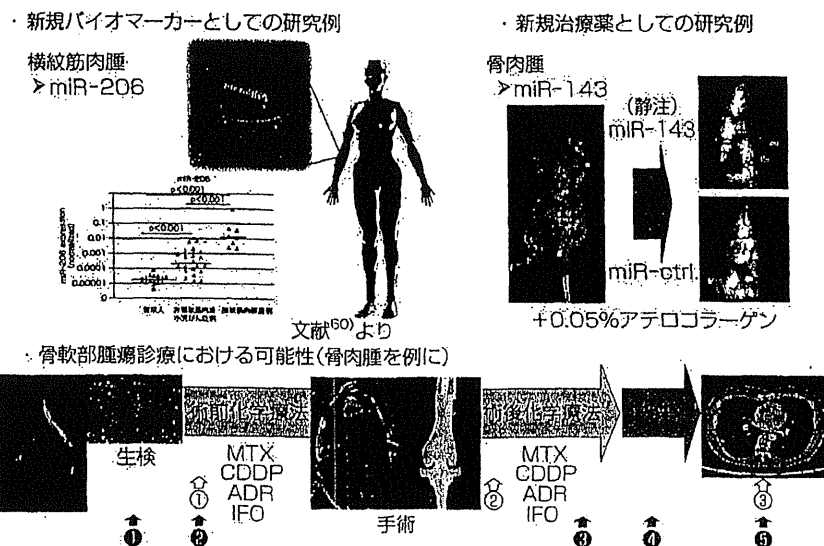


図 2 MicroRNA 発現量調整によるがん治療戦略 (文献⁵²⁾より改変)



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 研究の動向を見逃さない。

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-34 α 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) Ziyan 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-FLI1 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 caretulin 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 EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res* 70(23): 9570-9580, 2010.
- 43) Reichel 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*

- Pharmacol* 79(4):735-741, 2011.
- 46) Hisaoka M, Matsuyama A, Nagao Y, *et al*: Identification of altered MicroRNA expression patterns in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 50(3):137-145, 2011.
 - 47) Subramanian S, Thayanithy V, West RB, *et al*: Genome-wide transcriptome analyses reveal p53 inactivation mediated loss of miR-34a expression in malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol* 220(1):58-70, 2010.
 - 48) Itani S, Kunisada T, Morimoto Y, *et al*: MicroRNA-21 correlates with tumorigenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) via programmed cell death protein 4 (PDCD4). *J Cancer Res Clin Oncol* 138(9):1501-1509, 2012.
 - 49) Chai G, Liu N, Ma J, *et al*: MicroRNA-10b regulates tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Cancer Sci* 101(9):1997-2004, 2010.
 - 50) Gong M, Ma J, Li M, *et al*: MicroRNA-204 critically regulates carcinogenesis in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro Oncol* 14(8):1007-1017, 2012.
 - 51) Greither T, Würfl P, Grochola L, *et al*: Expression of microRNA 210 associates with poor survival and age of tumor onset of soft-tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 130(5):1230-1235, 2011.
 - 52) 尾崎充彦, 落谷孝広: [RNA 医学・医療 あらたな診断・治療を拓く] RNA を利用する新しい医薬・医療 microRNA 医薬によるがん治療への展開 がん転移モデルに対する miRNA の核酸医薬としての検証を中心に. 医のあゆみ 238(5):524-528, 2011.
 - 53) Gandellini P, Profumo V, Folini M, *et al*: MicroRNAs as new therapeutic targets and tools in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 15(3):265-279, 2011.
 - 54) Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, *et al*: Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327(5962):198-201, 2010.
 - 55) Li W and Szoka FC Jr: Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res* 24(3):438-449, 2007.
 - 56) Kumar P, Wu H, McBride JL, *et al*: Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448(7149):39-43, 2007.
 - 57) Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, *et al*: New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat Med* 5(6):707-710, 1999.
 - 58) Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, *et al*: MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers* 14(7):529-538, 2009.
 - 59) Ohyashiki K, Umezumi T, Yoshizawa S, *et al*: Clinical impact of down-regulated plasma miR-92a levels in non-Hodgkin's lymphoma. *PLoS One* 6(2):e16408, 2011.
 - 60) Miyachi M, Tsuchiya K, Yoshida H, *et al*: Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 400(1):89-93, 2010.
 - 61) 宮地 充, 土屋邦彦, 浅井大介・他: 筋特異的 microRNA は横紋筋肉腫の新規血清腫瘍マーカーである. 日整会誌 85(6):S848, 2011.
 - 62) Valadi H, Ekström K, Bossios A, *et al*: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9(6):654-659, 2007.
 - 63) 窪田大介, 末原義之, 藤原智洋・他: microRNA マイクロアレイを用いた骨肉腫化学療法奏効性予測バイオマーカーの開発. 日整会誌 86(6):S967, 2012.

REVIEW

Proteomic approach toward personalized sarcoma treatment: Lessons from prognostic biomarker discovery in gastrointestinal stromal tumor

Tadashi Kondo¹, Yoshiyuki Suehara², Kazutaka Kikuta³, Daisuke Kubota^{1,2}, Takashi Tajima^{1,4}, Kenta Mukaiharu^{1,2}, Hiroshi Ichikawa^{1,5} and Akira Kawai⁶

¹ Division of Pharmacoproteomics, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan

² Department of Orthopedic Surgery, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

³ Department of Orthopedic Surgery, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

⁴ Department of Orthopedic Surgery, Kyorin University, Tokyo, Japan

⁵ Division of Digestive and General Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

⁶ Division of Musculoskeletal Oncology, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

Sarcomas range from curable tumors to those causing death via metastasis and recurrence. Thus, there is an urgent need for biomarker identification in order to assess the degree of malignancy, predict prognosis, and evaluate possible therapies. Various proteomic approaches and different clinical materials have been used to this end, and candidate biomarkers have been reported for the different types of sarcomas. However, the sample size used in these biomarker studies was generally insufficient, and thus far, no biomarker has been proved useful in clinics. Given that sarcomas are rare, biomarker validation in this setting is more challenging than in other malignancies. In gastrointestinal stromal tumor, adjuvant therapy has proven to be effective. However, only 40% patients experience metastasis after curative surgery alone, and the rest of the patients may not need adjuvant therapy. Using a proteomic approach, we identified pftin (potassium channel tetramerization domain containing 12, KCTD 12) as a novel prognostic biomarker for sarcoma, and immunohistochemically confirmed its clinical usefulness by a multiinstitutional validation study. Here, we describe our experience and discuss the critical points in the discovery of this biomarker.

Received: August 14, 2012

Revised: October 11, 2012

Accepted: October 25, 2012

Keywords:

Biomarker / Sarcoma

1 Introduction

Sarcomas are defined as malignancies that originate from the nonepithelial tissues such as mesenchymal tissues. Sarcomas may occur anywhere in the human body including the bone, cartilage, fat, muscle, and vascular and neurogenic tissues. Thus, sarcomas are highly heterogeneous and are classified histogenetically. Although sarcomas are quite rare, accounting for only 1% of all malignancies, there are about

70 different subtypes of sarcomas, reflecting the variety in their tissues of origin [1]. Characterization of the molecular backgrounds of individual tumors is of great interest from the view of biological understanding and development of clinical applications.

Unique recurrent chromosomal translocations and genetic deregulations have been reported in sarcomas. These include somatic gene mutations of KIT and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) in gastrointestinal stromal tumor (GIST) [2–4]; deletions of hSNF5/INI1 gene in rhabdoid tumors [5]; and amplifications of MDM2 and cyclin-dependent kinase 4 in liposarcomas [6]. Reciprocal chromosomal translocation and chimeric genes are also frequently observed in sarcomas [1]. Genetic alterations deregulated the signaling in pathways, such as those in the insulin-like growth factor system, the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, mitogen-activated protein kinase pathway, mammalian

Correspondence: Professor Tadashi Kondo, Division of Pharmacoproteomics, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

E-mail: takondo@ncc.go.jp

Fax: +81-3547-5298

Abbreviations: GIST, gastrointestinal stromal tumor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor

target of rapamycin pathway, and Hedgehog pathway [7]. Such genetic abnormalities were considered in diagnosis and prognosis [8], and typical mutations in the tyrosine kinase KIT were targeted in GIST [9, 10]. Recently, the proteins binding to the chimeric gene product were also reported as a therapeutic target in Ewing sarcoma [11]. However, typical molecular backgrounds of unique genetic alterations have not been reported for most sarcomas.

Here, we utilize our experience from proteomic analysis of GIST and discuss the potentially important points of biomarker development. Proteomic study in sarcomas is a typical case of rare disease studies. Moreover, the experience in sarcoma proteomics could be applicable to the major cancers such as lung, breast, and liver cancer. It is because the number of samples available for basic study is often limited in all cases. It is also because if we focus on the specific subtypes of these malignancies according to their molecular phenotypes or specific clinical observations, the number of patients is profoundly diminished such as rare disease study.

2 General backgrounds of GIST

GIST is the most common primary mesenchymal malignancy of the gastrointestinal tract, with an incidence of approximately 15 per 1 000 000 people [12]. The clinical courses of GIST patients range from negligible in micro GIST to highly malignant and inoperable disease [13, 14]. The origin of GIST is Cajal cells, neuronal cells in the gut [3]. GIST is characterized by the presence of mutations in receptor tyrosine kinases. Approximately 80% of GISTs harbor an activating mutation in KIT and 10% in PDGFRA [12]. The use of imatinib mesylate (Gleevec; Novartis), a receptor tyrosine kinase inhibitor, in a patient with a recurrent, metastatic GIST was reported in 2001 [9], and use of this drug has been approved by the United States Food and Drug Administration [15]. Adjuvant imatinib mesylate treatment prolongs the time to recurrence, and patients exhibit longer survival times [16]. Estimation of the risk of recurrence becomes more important in the management of operable GIST, because approximately 60% of GIST patients can be cured by surgical resection alone and imatinib mesylate treatments may benefit only a limited number of patients [10]. Therefore, prognostic biomarkers will be useful to optimize the use of adjuvant treatment with imatinib mesylate. If we can identify those patients who can be cured by surgery alone we can avoid the use of imatinib mesylate, reducing the risk of possible side effects in patients who do not need the treatment and reducing costs. Moreover, as higher doses of imatinib mesylate contribute to increased progression-free survival [17], we could increase the dose of imatinib mesylate in those patients for whom a poor prognosis is predicted. Tumor size, mitosis count, and tumor site were considered to be important factors in the estimation of recurrence risk in the management of operable GIST, and the analysis of pooled population-based cohorts proved its efficacy [10]. However, there were no practical molecular

biomarkers that supported the mechanisms underlying the risk classifications, or that could be considered as independent prognostic parameters.

3 Proteomic approach to GIST and identification of pftin as a prognostic biomarker

We performed proteomic studies with the aim of identifying prognostic biomarker candidates [18]. Although proteomic approaches had been employed for biomarker discovery in many sarcomas [19], there was no report of proteomic biomarker studies in GIST until ours. Our previous study indicated that proteomic modalities such as 2D-DIGE could identify the proteins unique to GIST [20], suggesting that biomarkers for the malignant potential of GIST could be detected by such proteomic approaches. The outline of the experiment workflow is described in Fig. 1.

We compared the primary tumor tissues of eight patients who had metastases within 1 year after curative surgery with those of eight patients who did not have metastases during more than 2 years of observation [18]. In addition to the status of metastasis, we considered the risk classification such as the tumor size and the status of mitosis. The former patients were classified as the high-risk group, and the latter as the low- or intermediate-risk group [21]. This grouping was based on the previous report that GIST patients that were histologically classified as being at low or intermediate risk did not develop metastases within 2 years postsurgery, whereas GIST patients histologically classified as being at high risk developed metastases within 2 year postsurgery [21]. There was no statistical difference in the type of KIT mutation and original tumor site between the two groups [18].

2D-DIGE [22] with highly sensitive fluorescent dyes [23] was employed to create protein expression profiles [18]. In 2D-DIGE, the samples to be compared are labeled with different fluorescent dyes, mixed together, and separated by 2D gel electrophoresis [22]. We observed the proteins in a pI range between 4 and 7 and a molecular weight between 6 and 200 kDa [18]. The separation distance was 24 cm for isoelectric focusing, and 20 cm for molecular weight separation. Using 5 µg protein samples, we observed 1513 protein spots in a reproducible manner, and identified 43 protein spots with statistically significant differences in intensity between the sample groups. Proteins for all these 43 protein spots were identified by mass spectrometry. Among the identified proteins we found that one protein, namely pftin (potassium channel tetramerization domain containing 12, KCTD 12), appeared seven times in the samples from the better prognosis group (Figure 2). This led us to suggest that measuring pftin would be an efficient way of distinguishing patients with different prognoses.

Pftin was originally discovered as a gene in fetal cochlea and brain [24], and the origin of GIST is Cajal cells, neuronal cells in the gut [3]. Pftin has been reported as one

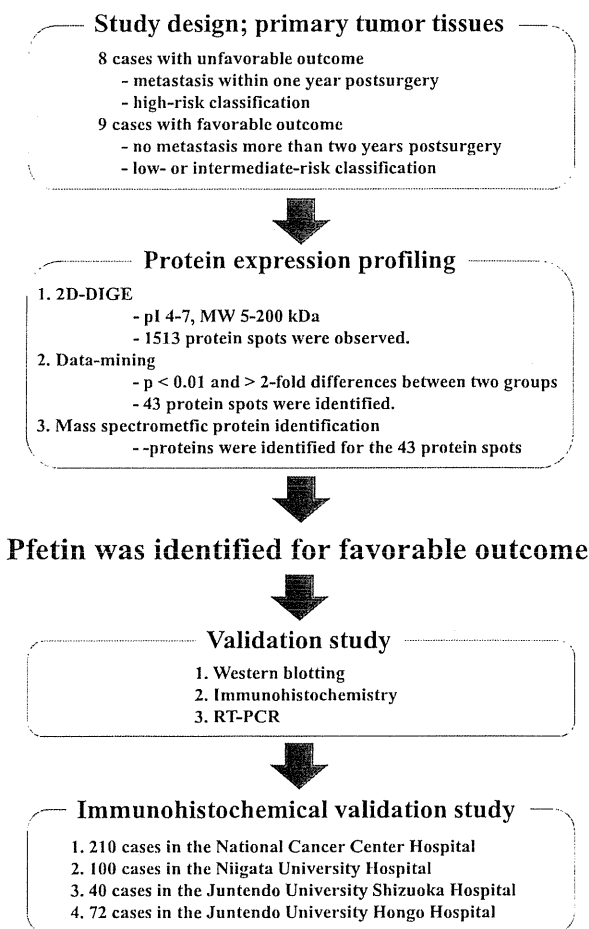


Figure 1. Overall view of biomarker study for pfetin expression in GIST. Note that we started proteomic studies using sophisticated proteomic methods, such as 2D-DIGE, and a small number of samples (17 cases) [18] and validated the results using simple immunohistochemistry in a relatively large number of samples, 381 cases [18,32–34].

of the genes regulating the left-right asymmetry in zebra fish [25, 26]. Genome-wide association analyses suggested the association of the pfetin loci with type 2 diabetes [27] and bipolar I disorder [28], but the underlying mechanisms linking pfetin to these diseases were not reported. Recent reports demonstrated that pfetin was involved with the auxiliary GABA_B receptor subunits in the brain [29, 30], and the responsible gene for chronic tinnitus [31]. The association of pfetin with malignancies was not established.

The correlation of higher expression of pfetin with favorable prognosis in GIST was confirmed by Western blotting and immunohistochemistry in the 17 patients who were included in the proteomic studies [18]. In all patients examined, the patients with pfetin-positive primary tumors did not have metastases at more than 2 years postsurgery. RT-PCR demonstrated that the expression of mRNA was statistically different between the two groups, but less significant

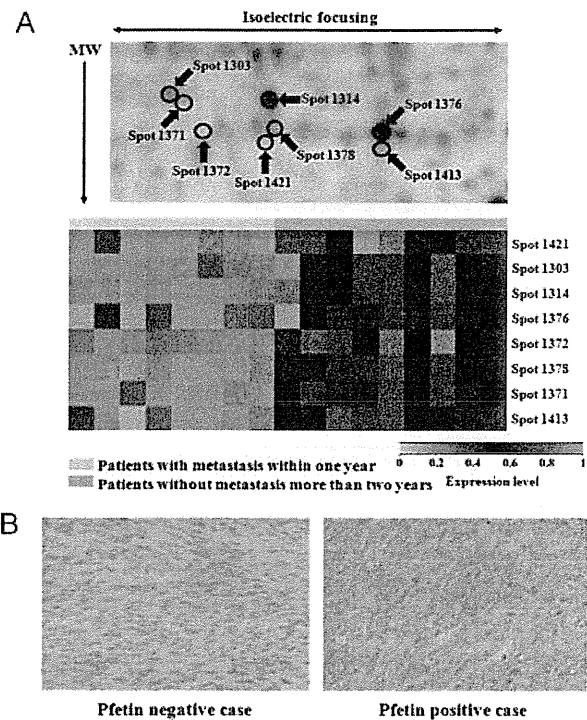


Figure 2. Pfetin expression in the primary tumor tissues of GIST patients. (A) The 2D images of pfetin protein spots and their intensities from the samples of GIST patients with different prognosis [18]. Upper panel: protein spots for pfetin in the 2D gel image, lower panel: heat map for pfetin protein spots. The whole 2D gel image was exhibited in our previous report [18]. The spot numbers are common in the upper and lower panels. Note that the protein spots for pfetin had higher intensity in the group of patients with a favorable prognosis. (B) Typical immunohistochemical images showing pfetin levels in the primary tumor tissues of the patients with GIST [18,32–34]. Left panel: pfetin-negative case, right panel: pfetin-positive case. Cases in which more than 20% of tumor cells were stained with the anti-pfetin antibody were considered to be pfetin positive, whereas those in which less than 20% of tumor cells were stained were considered to be pfetin negative [18,32–34].

than the differences at the protein expression level [18]. We immunohistochemically confirmed the prognostic value of pfetin in 210 GIST patients in the National Cancer Center Hospital; the 5-year metastasis-free survival rate was significantly higher in the pfetin-positive group than in the pfetin-negative group (93.9% versus 36.2%, $p < 0.0001$; log-rank test; Fig. 3A). Moreover, the pfetin expression could distinguish the patients according to metastasis state even in the low- or high-risk groups, and multivariate analyses showed that pfetin was an independent prognostic factor.

We further validated the prognostic value of pfetin in a different cohort. We developed an original monoclonal antibody against pfetin, and validated its performance in 159 cases at the National Cancer Center [32]. And using the original monoclonal antibody, we immunohistochemically confirmed the prognostic value of pfetin in 100 GIST patients at the Niigata

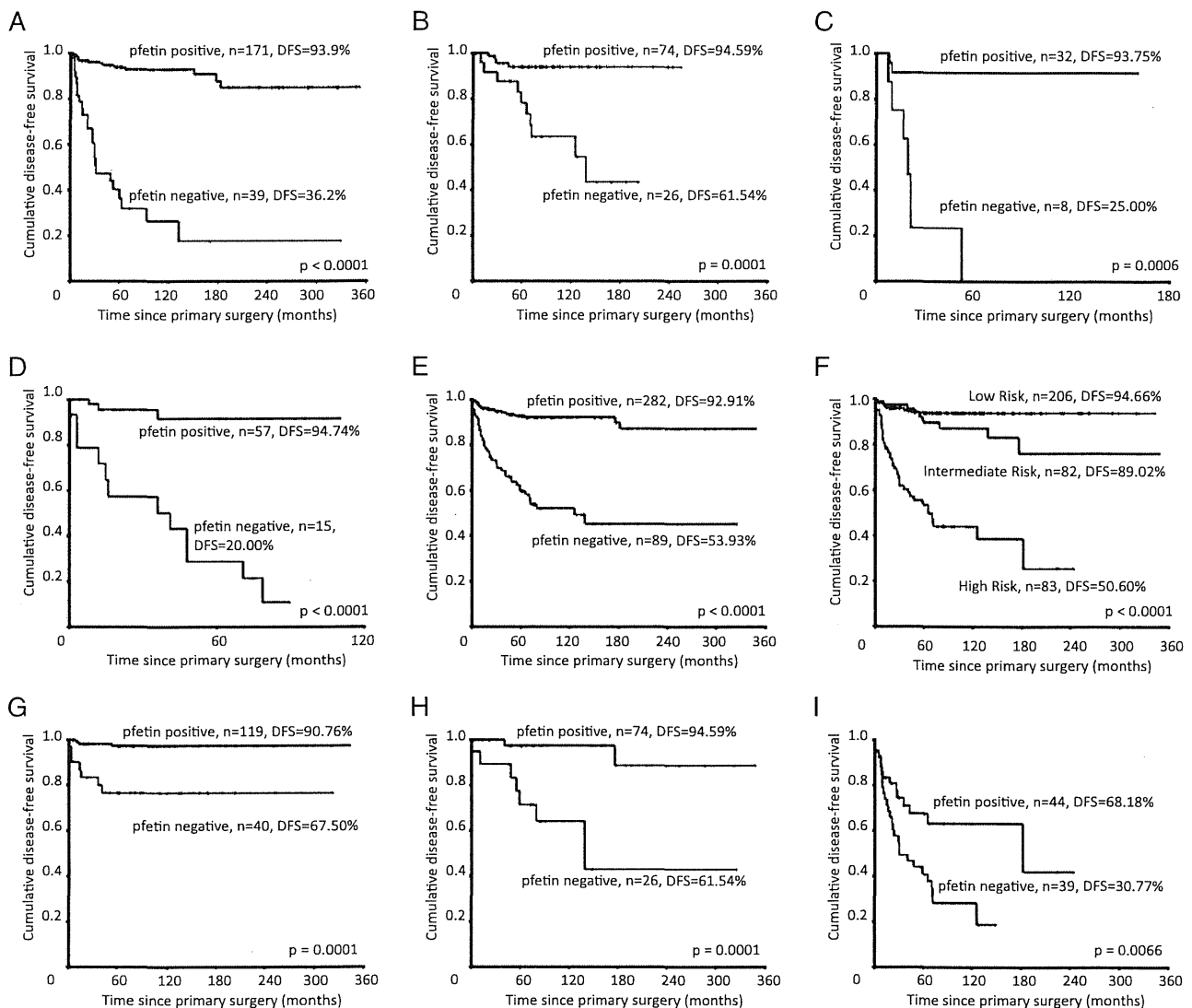


Figure 3. Kaplan–Meier data of pftin expression and clinical outcome of GIST patients. (A) Two hundred and ten cases in the National Cancer Center Hospital [18]. (B) Hundred cases in the Niigata University Hospital [32]. (C) Forty-two cases in the Juntendo University Shizuoka Hospital [33]. (D) Seventy-two cases in the Juntendo University Hongo Hospital [34]. (E) Meta-analyses of the results of immunohistochemical expression studies using monoclonal antibody in 371 patients in four hospitals [34]. Note that no patient in this study received adjuvant treatment with imatinib mesylate [18,32–34]. (F) The Kaplan–Meier curve is illustrated for 371 patients based on the risk classification group. Statistical significances were observed among each risk group. The Kaplan–Meier analyses estimated metastasis-free survival based on pftin expression in low-, intermediate-, and high-risk groups (G, H and I, respectively). The prognostic utilities of additional biomarker, DDX39, was immunohistochemically demonstrated.

University Hospital; the 5-year metastasis-free survival rate was significantly higher in the pftin-positive group than in the pftin-negative group (94.5% versus 80.7%, $p < 0.0001$; log-rank test; Fig. 3B) [32]. We continued the immunohistochemical validation study in two additional cohorts; 40 patients at the Juntendo University Shizuoka Hospital [33] and 72 patients at the Juntendo University Hongo Hospital [34]. The 5-year metastasis-free survival rate was significantly higher in the pftin-positive group than in the pftin-negative group (93.9% versus 36.2%, $p < 0.0001$; log-rank test) in the 40 patients (Fig. 3C) [33]. Immunohistochemical

study also demonstrated that the 5-year metastasis-free survival rate was 97.4% for the pftin-positive group and 20.0% for the pftin-negative group among the 72 GIST patients ($p < 0.0001$; log-rank test; Fig. 3D) [34]. In each cohort, pftin was shown to be an independent prognostic factor by multivariate analyses, and distinguished the GIST patients in the same risk classification groups according to their prognosis with statistical significances [18,32–34]. In total, we immunohistochemically confirmed the prognostic value of pftin in 371 GIST patients in four hospitals by using the monoclonal antibody. Metaanalyses of the prognostic value of pftin