

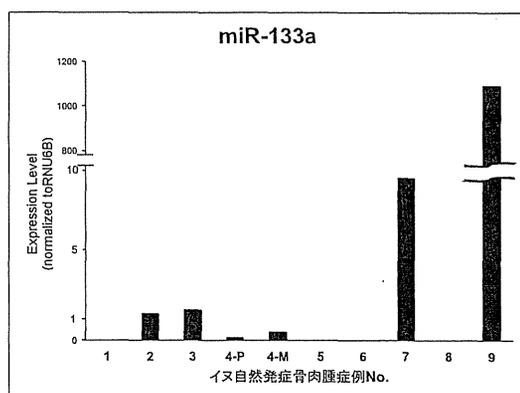
症例No.	犬種	年齢	性別	原発部位	病理組織	投与方法	miR-133a 腫瘍内	治療経過 (S-TuD投与後)	予後
1	ジャーマン・シェパード	9	♂	左前肢遠位	骨肉腫	静脈		生存(1年)	CDF
2	アイリッシュ・セッター	10	♂	左上腕骨近位端	骨肉腫	静脈	1.2182	死亡(4ヶ月)	DOD
3	バグ	11	♀	左大腿骨近位	骨肉腫	静脈	1.4028	生存(8ヶ月)	CDF
4	チワワ	8	♂	左後肢近位	悪性間葉系腫瘍	静脈	0.1223	転移(1年)	AWD
5	ウイペット	12	♀	右大腿骨骨頸部	骨肉腫	静脈		生存(5ヶ月)	CDF
6	ミニチュア・シュナウザー	7	♀	右下顎	骨肉腫	動脈		生存(8ヶ月)	CDF
7	ゴールデンレトリバー	6	♂	左下顎骨近位	骨肉腫	静脈/動脈	7.4653	生存(7ヶ月)	CDF
8	雑種	15	♂	上顎骨遠位	骨肉腫	動脈		死亡(8ヶ月)	DOD
9	ドーベルマン	9	♂	右第5肋骨	骨肉腫	静脈	1091.6	死亡(4ヶ月)	DOD

NED; no evidence of disease, AWD; alive with disease, DOD; dead of disease

表 1 症例データ

C. 研究結果

本研究班のイヌ自然発症肉腫に対して S-TuD-133a 投与を行った症例の一覧を表 1 に示した。登録された症例の内、手術検体が確保可能であった 5 症例、6 検体での腫瘍内



miR-133a 発現レベルを図 1 に示した。6 検体の miR-133a 発現レベルは様々であった。

図 1 腫瘍内 miR-133a 発現 (症例 1、5、6、8 は検体なし)

症例 No.4 では、初発時の検体と転移時の検体の比較が行え (いずれも S-TuD-133a 投与後)、転移時は初発時と比較して、腫瘍内 miR-133a の発現が上昇していた。

また他の症例と比較して腫瘍内 miR-133a の発現レベルが異常高値であった症例 No.9 は、断脚後 4 ヶ月で死亡しており非常に予後不良の症例であった。

しかし、No.2 のように発現レベルが他と比較して高値でなくても予後不良である症例も認められた。

いずれの症例も S-TuD-133a 投与前の腫瘍組織また正常組織の確保が出来ず、症例毎、症例間の十分な比較が行えていない。

D. 考察

これまでの先行研究で、骨肉腫のがん幹細胞分画に関与し、ヒト骨肉腫でその腫瘍内発現が有意な予後不良因子であることが明らかとなった miR-133a について、本研究ではイヌ自然発症肉腫症例においてその腫瘍内発現レベルを検討した。

症例数が 5 例と非常に少ない中での検討であるが、症例 No.4、9 では、ヒト同様にイヌ肉腫症例でも miR-133a 発現レベルが悪性度に相関している結果が得られた。

しかし、本研究には以下の問題点が挙げられる。

1. S-TuD-133a 投与前の検体がなく、miR-133a 発現レベルと予後の検討が行えない。
2. S-TuD-133a 投与前の検体がなく、S-TuD-133a 投与後との比較による miR-133a 発現レベルの比較、有効性効果の検証が行えない。
3. 正常組織検体がなく、腫瘍部での発現レベルの比較・検討が出来ない。
4. 治療開始後、断脚後の経過観察期間が短い。

イヌ自然発症肉腫においても、ヒト骨肉腫と同様に miR-133a が予後不良因子であるのかどうか、そして S-TuD-133a による治療効果があるのかどうか、を正しく検証するためには、

上述の問題点を解決することが必須である。

E. 結論

イヌ自然発症肉腫症例の腫瘍内 miR-133a 発現レベル、また S-TuD-133a 投与による発現レベルの推移を検証することは、並行して行っている S-TuD-133a 投与による治療効果を評価する上で重要である。

本研究で、miR-133a 発現レベルがイヌ肉腫の悪性度と相関する症例を認めた。しかし、症例数が少なく、また経過観察期間も短いため、最終的な結論を導くにはデータの蓄積が必要である。

Proof of concept (POC) のためには、D. 考察で挙げた問題点をクリアするためイヌ自然発症骨肉腫症例の S-TuD-133a 投与前の腫瘍組織を確保し、投与後と miR-133a 発現レベルを比較すること、また正常組織と比較することが必須であり、東京農工大学附属動物医療センター伊藤博先生の協力の基、症例、検体の確保が急務である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai Akira, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. *Stem Cells*, 32:959-973, 2014
2. Fujiwara T, Kawai A, Nezu Y, Fujita Y, Kosaka N, Ozaki T, Ochiya T. Circulating microRNAs in sarcoma: potential biomarkers for diagnosis and targets for therapy. *Chemotherapy*, 3:1000123, 2014
3. Fujiwara T, Kunisada T, Takeda K, Uotani K, Yoshida A, Ochiya T, Ozaki T. MicroRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers. *Biomed Res Int*, 2014:592868, 2014
4. Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. *RPN2* gene confers osteosarcoma cell

malignant phenotypes and determines clinical prognosis. *Mol Ther Nucleic Acids*, 3:e189, 2014

5. Osaki M, Kosaka N, Okada F, Ochiya T. Circulating microRNAs in drug safety assessment for hepatic and cardiovascular toxicity: the latest biomarker frontier? *Mol Diagn Ther*, 18:121-126, 2014

2. 学会発表

1. Ochiya T. 「Direct Detection Of Extracellular Vesicles In Human Serum By ExoScreen System」. Expectations of the first meeting of International Society for Extracellular Vesicles, ISEV 2013, Boston, USA. April 15-21
2. Ochiya T. 「Exosomes as a Novel Diagnostic and Therapeutic Tool for Cancer」. World CTC, Berlin, Germany. April 23-27, 2013
3. 「がん転移を制御する新規標的因子:エクソソームの性状解析と治療戦略」、落谷孝広、第 18 回癌と遺伝子・大分外科フォーラム(2013.6.4 大分)
4. 「Functional Imaging of Cancer-Specific Exosomes In Tumor Metastasis」、落谷孝広、19th 日本遺伝子治療学会(2013.7.3 岡山)
5. 「遺伝子導入技術に基づく分子イメージング」、落谷孝広、29th 日本 DDS 学会学術集会(2013.7.4-5 京都)
6. 「分子がん転移研究の新たな潮流:エクソソームによる前転移ニッシュの実態解明」、落谷孝広、22th 日本がん転移学会学術集会・総会(2013.7.10-12 長野)
7. 「Exosome による遺伝情報の水平伝達の発見をもたらすインパクト」、落谷孝広、第 5 回 ライフサイエンスセミナー(2013.7.17 東京)
8. 「エクソソームによるがんの浸潤転移の解明と Liquid Biopsy への応用」、落谷孝広、第 10 回 日本病理学会カンファレンス 2013 六甲山、(2013.8.2 神戸)
9. 「細胞間コミュニケーションの新たな担い手「エクソソーム」の正体と診断治療への応用」、落谷孝広、34th 日本炎症・再生医学会、(2013.7.2 京都)
10. 「Exosome による遺伝情報の水平伝達と疾病診断治療治療への応用」、落谷孝広、

- 29th 日本 DDS 学会、(2013.7.4 京都)
11. 「エクソソームの基礎と最新の話題」、落谷孝広、京都大学再生医科学研究所・講演(2013.8.8-9 京都)
 12. 「がん微小環境エクソソームと腫瘍血管新生」、落谷孝広、第 21 回日本血管生物医学学会学術集会(2013.9.26-28 大阪)
 13. 「エクソソーム診断の可能性と展望」、落谷孝広、第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会(2013.10.2 横浜)
 14. 「体液中の細胞外分泌顆粒による新規がんバイオマーカーの開発」、落谷孝広、第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会(2013.10.3-5 横浜)
 15. 「Exosomes/microRNA-mediated cancer metastasis: A novel approach for cancer diagnosis and treatment」、落谷孝広、75th 日本血液学会学術集会(2013.10.10-13 札幌)
 16. 分泌型 miRNA/エクソソームによる疾患の診断・治療、落谷孝広、55th 日本神経学会学術大会(2014.5.20-22 福岡)
 17. エクソソームによる新しいシグナル伝達機構の解明、落谷孝広、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術(2014.6.18-20 北海道)
 18. 体液中の細胞外分泌顆粒による新規がんバイオマーカーの開発、落谷孝広、第 52 回日本癌治療学会学術集会(2014.8.28 横浜)
 19. がん細胞が分泌する新規体液診断マーカー:エクソソーム、落谷孝広、第 34 回日本分子腫瘍マーカー研究会(2014.9.24 横浜)
 20. がんの代謝を制御する細胞外分泌顆粒の解析、落谷孝広、第 87 回日本生化学会大会(2014.10.15-18 京都)
 21. 「体液中の細胞外分泌顆粒による新規がんバイオマーカーの開発」、落谷孝広、第 146 回日本医学会総会シンポジウム(2014.12.18 東京)
 22. Ochiya T. 「ExoScreen provides a new diagnostic tool for circulating exosomes」. ISEV Exosome 2014, Australia.Melbourne. February 2-6, 2014
 23. Ochiya T. 「Role of miRNAs in the pathogenesis of liver disease」. APASL2014, Australia.Brisbane. March 12-17, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

- 1.特許取得
特になし。
- 2.実用新案登録
特になし。
- 3.その他
特になし。

イヌ自然発症骨肉腫 D-TuD-133a 投与モデルの microRNA-133a 濃度

研究分担者 根津 悠 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野

研究要旨

共同研究者が骨肉腫の悪性形質に関与すると報告した microRNA-133a(Stem Cells. 2013) に対する国内開発された S-TuD-133a (ジーンデザイン社) の発現抑制効果を、イヌ自然発症骨肉腫症例に点滴投与することにより評価した。イヌ自然発症骨肉腫 6 症例に対して S-TuD-133a を断脚前後に点滴静注し経時的に採取した血液を用い、その血清中 miR-133a の発現量を qRT-PCR を用いて検証した。

S-TuD-133a 投与前の血清中 miR-133a 発現レベルは予後との相関を認めなかったが、正常犬の発現レベルと比較すると高い傾向にあった。また S-TuD-133a 投与前後における血清中 miR-133a 発現レベルの推移の検証では、S-TuD-133a 投与前と比較して投与後(断脚前)で有意に発現レベルが低下していた($p < 0.05$)。しかし断脚後 S-TuD-133a 投与を継続しても血清 miR-133a の発現レベルが再度上昇してくる症例も認めた。イヌ骨肉腫の 1 年生存率は 30-60%と報告されており、現在のところ断脚後経過観察期間が 1 年未満の症例がほとんどであり、S-TuD-133a の効果また上昇してきた症例での再発・転移を評価することで、より詳細な解析・検討が可能であると考察された。

A. 研究背景、目的
(背景)

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株におけるがん幹細胞分画を単離し、その悪性形質に関与する microRNA として miR-133a を同定した。さらに、locked nucleic acid (LNA) による miR-133a 機能阻害により、薬剤耐性や浸潤能などのがん幹細胞分画における悪性形成の制御を、in vitro、in vivo において見出してきた。また平成24年度には、Synthetic Toxig Decoy (S-TuD) 大量合成プロトコールの基盤技術を開発し、また miR-133a の複数の標的遺伝子を介して浸潤能の改善を引き起こしていることを報告した。そして昨年度は、S-TuD-133a の有効性を in vitro で検証し、LNA 同様に骨肉腫細胞株 143B において有意に浸潤能を抑制することを示した。また S-TuD 合成の効率化、そして S-TuD-133a の安全性・毒性試験を行ってきた。

骨肉腫がん幹細胞分画から同定された、悪性形質に関与する miR-133a は、革新的な治療標的分子と成り得ると考えられる。そして国内開発された S-TuD は、そのシーズとして

大きな可能性を秘めている。

本研究では、イヌ自然発症骨肉腫症例に対して S-TuD-133a を点滴静注し、経時的に採血を行い、血清中 miR-133a の発現レベルの推移を確認することにより、S-TuD-133a の発現抑制効果を検討した。

B. 研究方法

イヌ自然発症骨肉腫 6 症例に対して、S-TuD-133a (ジーンデザイン社、0.1mg/kg/回) を断脚前後に点滴静注し、経時的に採血を行い、その血清中 miR-133a 発現量を qRT-PCR を用いて測定した(なお technical normalization として cel-miR-39 を用いた)。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて東京農工大学動物実験指針(平成18年環境省告示第88号、平成18年厚生労働省通知、文部科学省告示第七十一号を含んでいる)に従って行った。個々の症例については獣医師主導型で行い同意を得ている。研究内容については、同大学の倫理委員会の審査・承認を得ており研究の適正性を確保した。

症例No.	犬種	年齢	性別	原発部位	病理組織	投与方法	miR-133a		治療経過 (S-TuD投与後)	予後
							腫瘍内	血清中		
1	ジャーマン・シェパード	9	♂	左前肢遠位	骨肉腫	静脈		0.01310	生存(1年)	CDF
2	アイリッシュ・セッター	10	♂	左上脛骨近位端	骨肉腫	静脈	1.2182	0.03629	死亡(4ヶ月)	DOD
3	バグ	11	♀	左大腿骨近位	骨肉腫	静脈	1.4028	1.2449	生存(8ヶ月)	CDF
4	チワワ	8	♂	左後肢近位	悪性間葉系腫瘍	静脈	0.1223		転移(1年)	AWD
5	ワイペット	12	♀	右大腿骨頸部	骨肉腫	静脈		0.11228	生存(5ヶ月)	CDF
6	ミニチュア・シュナウザー	7	♀	右下顎	骨肉腫	動脈			生存(8ヶ月)	CDF
7	ゴールデンレトリバー	6	♂	左下顎骨近位	骨肉腫	静脈/動脈	7.4653	0.40994	生存(7ヶ月)	CDF
8	雑種	15	♂	上顎骨遠位	骨肉腫	動脈			死亡(8ヶ月)	DOD
9	ドーベルマン	9	♂	右第5肋骨	骨肉腫	静脈	1091.6	0.09521	死亡(4ヶ月)	DOD

NED; no evidence of disease, AWD; alive with disease, DOD; dead of disease

表 1 イヌ S-TuD-133a 投与症例

C. 研究結果

i) S-TuD-133a 投与前血清中 miR-133a 発現量

図 1 に症例毎の投与前血清中 miR-133a の qRT-PCR の結果を示した。その発現レベルと表 1 に示す予後との間に相関は認めなかった。しかし、正常犬 6 症例との比較では、骨肉腫症例では血清中 miR-133a の発現が高い傾向にあった(図 2)。

図 1 イヌ骨肉腫症例 S-TuD 投与前血清中 miR-133a

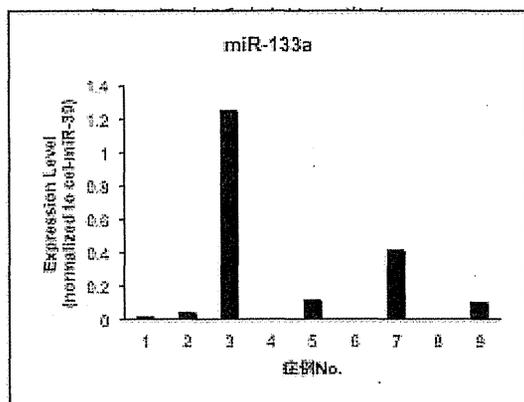
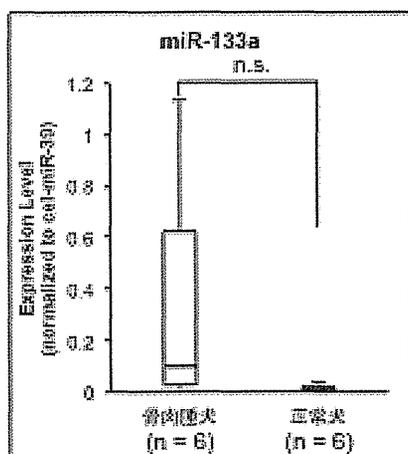


図 2 骨肉腫症例と正常犬との血清中 miR-133a の比較



ii) S-TuD-133a 投与前後 miR-133a 発現推移

S-TuD-133a 投与前と比較すると手術前(1回または 2 回投与後)では、有意に血清中 miR-133a の発現レベルが低下していた($p < 0.05$)。しかし、断脚後 1.5 ヶ月、3 ヶ月では有意差を認めず、図 3-2 に示す様に断脚後に発現が再度上昇する症例も認めた。

図 3 S-TuD-133a 投与前後の血清 miR-133a の推移

図 3-1

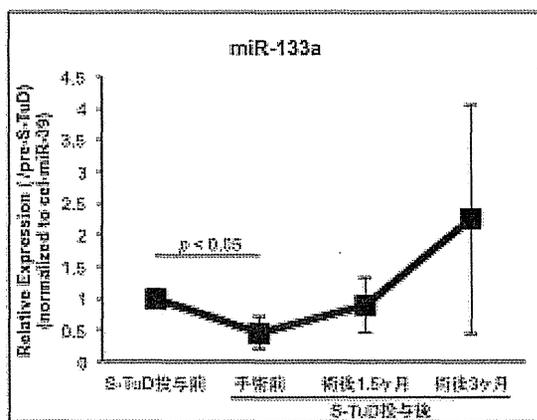
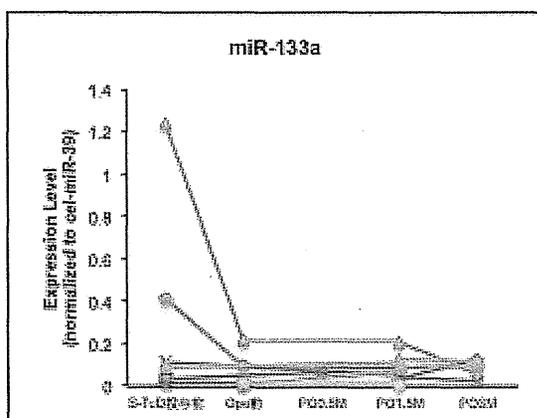


図 3-2



D. 考察

これまでの先行研究で、骨肉腫のがん幹細胞分画に関与し、*in vitro* で悪性化に寄与することが明らかとなった miR-133a であるが、本研究ではイヌ自然発症骨肉腫において S-TuD-133a を投与することにより生体内での効果を検討した。

C. 研究結果 i) に示した様に S-TuD 投与前の血清中 miR-133a の発現レベルについては予後との相関を認めなかったが、正常犬との比較では骨肉腫症例では血清中 miR-133a 発現レベルは高い傾向にあり、ヒト骨肉腫と同様にイヌでも悪性形質に寄与している可能性が示唆された。

また C. 研究結果 ii) で示した様に S-TuD 投与前後の血清中 miR-133a の発現レベル推移の検討では、投与前と比較して投与後・断脚前で有意に発現レベルが低下していた。しかしながら、断脚後 S-TuD-133a 投与継続した症例でも血清中 miR-133a の発現レベルが上昇してくる例も認められた。

イヌ骨肉腫の 1 年生存率は 30-60% であり (2010. Interzoo)、また現在までのところ経過観察期間が 1 年未満の症例がほとんどであることから、今後長期的に経過を観察することにより S-TuD-133a のイヌでの有効性を検証することが必要である。

E. 結論

自然発症骨肉腫犬では血清中 miR-133a の発現レベルが高値であった。また S-TuD-133a 投与により血清中 miR-133a の発現レベルが抑えられる症例が見られた。しかし S-TuD-133a の有効性の確立には、今後の長期的な経過観察が必須である。

F. 研究発表

1. 論文発表
関連発表なし
2. 学会発表
関連発表なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

骨肉腫臨床検体の解析

研究分担者 尾崎 敏文 岡山大学大学院整形外科

研究要旨

ヒト骨肉腫臨床材料を用い miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析をおこなうことを目的として、岡山大学整形外科における材料収集および発現解析を行った。前年度は 45 例のパラフィン包埋標本を収集し、RNA を抽出した。miR-133a および RUN-6B 発現量を測定した結果、全ての症例において miRNA 発現を確認することが可能であった。定量 PCR にて発現解析を解析し、それぞれの予後との相関性を解析したところ、miR-133a の高発現が患者の overall survival および metastasis-free survival の予後不良と有意に相関していることが明らかになった。本年度は 25 例の凍結標本を収集し、miR-133a の標的遺伝子 annexin A2 (ANXA2) の発現解析を行った。定量 PCR にて発現解析を解析し、それぞれの予後との相関性を解析したところ、ANXA2 の高発現が患者の overall survival および metastasis-free survival の予後良好と相関する傾向が明らかになった。miRNA とその標的遺伝子の発現バランスが共に予後に影響している可能性が示唆された。

A. 研究背景、目的
(背景)

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株においてがん幹細胞分画を単離し、ヒト骨肉腫手術検体におけるがん幹細胞分画の存在とその分画におけるmiR-133a高発現を見出してきた。近年、ヒト悪性腫瘍におけるがん幹細胞マーカー発現率と患者の予後との間に負の相関があることが報告されつつある。したがって、ヒト骨肉腫組織における miR-133a 発現の臨床病理学的意義を明らかにすること、さらに miR-133a の標的遺伝子群の同定および臨床病理学的因子と比較検討は、骨肉腫の発生および進展のメカニズムを明らかにする上で極めて重要であるのみならず、骨肉腫の治療方針決定や予後予測の観点からも有用性が高い。このような背景を基に、複数の施設から集められた多数のヒト骨肉腫臨床材料を用い、miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析を行うことを目的とした。臨床材料は、国立がん研究センター中央病院および鳥取大学に加え岡山大学も参画し、本研究分担者は岡山大学における臨床材料を用いた検討を担当する。

B. 研究方法

岡山大学医学部において保管されている、ヒト骨肉腫原発巣切除組織の凍結保存検体の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、2000年～2012年に手術を施行された標本(25例)を収集可能であった。それぞれの検体より RNA 抽出を行い、miR-133a の標的遺伝子である Annexin A2 (ANXA2) お

よび β -actin の発現量を測定し、臨床経過との関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて、文部科学省および厚生労働省による疫学研究に関する倫理指針に従って行った。事前の十分な説明と自由意思による同意に基づいた研究を行い、個人情報 は徹底して保護した。患者情報を記載しているデータファイルは、暗証番号を使用し研究者個人しか使用できないようにした。また、本研究の開始に関しては、事前に当大学の倫理委員会により審査及び承認を得ることで研究の適正性を確保した。

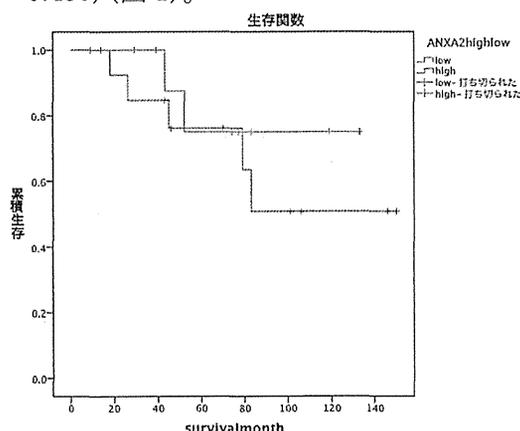
C. 研究結果

2000～2012年に岡山大学整形外科で治療を行った25症例のヒト骨肉腫切除標本の凍結標本を収集した。患者群の内訳は、男性11例、女性14例、平均年齢31歳であった。

これらの検体より常法にて RNA を抽出した。Real-time PCR にて β -actin 発現量を測定した結果、いずれの発現も確認可能であることを確認した。

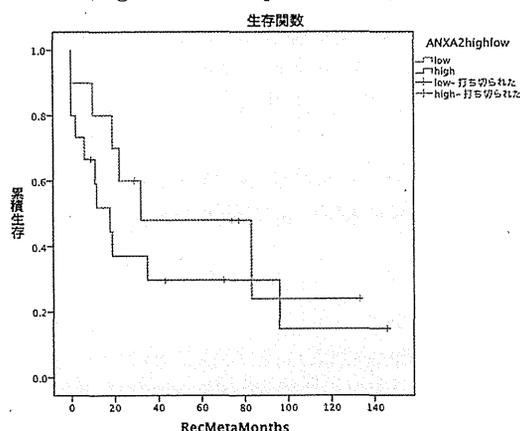
ANXA2 の発現と臨床情報との関連性を統計学的に解析した結果、ANXA2 の発現高値と患者予後良好が相関する傾向にあることが判明した。ANXA2 の cut off point は ROC 曲線を作成し、Youden-Index により統計学的に算出した。設定した cut off point を基準に overall survival を Kaplan-Meier 法により解析した結果、ANXA2 高値を示す患者群の予後は ANXA2 低値を示す患者群の予後よりも良

好である傾向が示され、10年全生存率はそれぞれ75%、50%であった(log-rank test: $p = 0.430$) (図1)。



(図1) ANXA2の発現に基づく overall survival (Kaplan-Meier analysis)

同様に、Disease-free survivalをKaplan-Meier法により解析した結果、ANXA2高値を示す患者群の予後はANXA2低値を示す患者群の予後よりも良好である傾向にあり、5年無病生存率はそれぞれ48%、30%であった(log-rank test: $p = 0.320$)。



(図3) ANXA2の発現に基づく Disease-free survival (Kaplan-Meier analysis)

D. 考察

主任研究者のグループにより、国立がん研究センターで採取された臨床検体において、miR-133a発現と臨床予後との間に負の相関があることが明らかとなっている。同時に、miR-133aの一部の標的遺伝子発現と臨床予後との間に正の相関関係があることが明らかとなっている。

miR-133aの標的遺伝子群のうち、ANXA2

は骨肉腫細胞において最も浸潤性を制御する遺伝子であることが、共同研究者である藤原らにより特定されている。このANXA2遺伝子発現高値は、国立がん研究センターにおける骨肉腫症例の予後良好と有意な相関関係にあった。本研究では、岡山大学における患者予後との解析を行った結果、ANXA2遺伝子発現高値は、有意差はみられなかったものの、患者予後良好と相関する傾向にあることが判明した。本研究においてはRNAが良好な条件で保存されていた対象患者の除外により対象患者数が少なかったことが原因の一つと考えられた。

本研究班で鳥取大学の尾崎は、臨床病理学的因子の中でも骨肉腫患者の予後を規定する肺転移に着目し、骨肉腫原発巣におけるANXA2発現との関連性を検索した結果、肺転移陰性例の多くがANXA2陽性例であるのに対し、肺転移陽性症例の75%がANXA2陰性例であり、ANXA2発現低下が肺転移促進に関与している可能性が示唆された。但し、統計学的有意差を得るには至らず、稀少サンプル数の影響と考えられた。

今後は更なる患者数で骨肉腫におけるANXA2の発現意義を転移予測マーカー等の観点から明らかにすると共に、miR-133a発現量との関連性を併せて検討する必要がある。

E. 結論

ヒト骨肉腫原発巣において、miR-133aの標的分子であるANXA2の発現低下が、予後不良に関与することが示唆された。miR-133a機能阻害による骨肉腫への新たな治療法を開発する上で、ANXA2がそのメカニズムを明らかにするための重要な分子となる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ①Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis. Mol Ther Nucleic Acids. 2014 2;3:e189
- ②Fujiwara T, Kunisada T, Takeda K, Uotani K, Yoshida A, Ochiya T, Ozaki T. microRNAs in soft tissue sarcomas: overview

of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers. Biomed Res Int. 2014:592868.

③Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. Stem Cells. 2014 32(4):959-973

④Nakada E, Sugihara S, Kunisada T, Ozaki T. Long-term follow-up of resection-replantation for sarcoma in the distal radius. J Orthop Sci. 2014 19(5):832-837.

⑤国定 俊之, 武田 健, 藤原 智洋, 柳井 広之, 尾崎 敏文. 【切除縁評価法の問題点: 悪性骨腫瘍】日整会誌. 2014 88(9):558-594

⑥藤原 智洋, 武田 健, 国定 俊之, 尾崎 敏文. 【軟部腫瘍の診療における評価法の活用】関節外科 2014 33(10):182-210

2. 学会発表

①骨肉腫患者治療後の長期的問題点

武田 健, 国定 俊之, 長谷井 嬢, 上原 健敬, 大森 敏規, 尾崎 敏文.

第 88 回日本整形外科学会学術総会.

(2014/5/22-25) 神戸・神戸国際会議場

②AYA 世代の進行期肉腫の治療戦略 進行期骨肉腫 AYA 患者に対する緩和ケアチームの早期介入. 国定 俊之, 武田 健, 松岡 順治, 尾崎 敏文

第 27 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 (2014/7/17-18) 大阪・大阪国際会議場

③がん治療の個別化における形成外科の役割、期待と現状 骨軟部悪性腫瘍の治療 診断・切除・再建. 尾崎 敏文, 国定 俊之, 武田 健, 藤原 智洋, 長谷川 健二郎, 木股 敬裕. 第 52 回日本癌治療学会

(2014/8/28-30) 横浜・パシフィコ横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

骨肉腫臨床検体の解析

研究分担者 尾崎 充彦 鳥取大学医学部病態生化学分野

研究要旨

ヒト骨肉腫臨床材料を用い miR-133a の標的分子であるアネキシン A2 発現解析をおこなった。鳥取大学に保管されているヒト骨肉腫切除標本 10 例のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を収集し、アネキシン A2 発現を免疫組織化学的に検索し、臨床病理学的因子との関連性を検討した。骨肉腫におけるアネキシン A2 陽性腫瘍細胞は、類骨形成能の高い領域で多く観察された。検討に用いた骨肉腫10例において、アネキシン A2 陽性例および陰性例はそれぞれ 5 例ずつであった。アネキシン A2 陽性例は、肺転移陽性群において 4 例中1例(25.0%)、一方肺転移陰性例群において 6 例中 4 例(66.7%)と前者で低値を示した。以上より、ヒト骨肉腫原発巣において、miR-133a 発現がその標的分子であるアネキシン A2 発現を低下させ、肺転移促進性に関与することで予後不良となることが示唆され、骨肉腫における miR-133a 機能阻害の有用性を示唆する結果となった。

A. 研究背景、目的
(背景)

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株においてがん幹細胞分画を単離し、さらにヒト骨肉腫手術検体においてもがん幹細胞分画が存在し、その分画でmiR-133aが高発現していることを見出してきた。さらに、本研究事業実施期間においてmiR-133aの標的分子としてアネキシンA2を同定した。かかる所見は、ヒト骨肉腫細胞におけるmiR-133a発現亢進は、アネキシンA2発現を低下させ、結果として悪性化へ関与している可能性が示唆される。したがって、ヒト骨肉腫組織におけるアネキシンA2発現を検索し、臨床病理学的因子と比較検討することは、骨肉腫の発生および進展のメカニズムを明らかにする上で極めて重要であるのみならず、骨肉腫の治療方針決定や予後予測の観点からも有用性が高い。このような背景を基に、miR-133a機能阻害の有用性を裏付けるため、複数のヒト骨肉腫臨床材料を用い、腫瘍細胞におけるアネキシンA2の発現解析をおこなうことを目的とした。

B. 研究方法

鳥取大学医学部において保管されている、ヒト骨肉腫原発巣切除組織のホルマリン固定・パラフィン包埋標本 10 例を対象にした。これらの症例に関する臨床データをファイルから抽出し、年齢・性別・発生部位・組織型・初診時転移の有無と部位・術前/術後化学療法の内容(種類のみ)・化学療法奏功性・術後

転移の有無を抽出した。この患者群は男性 3 例、女性 7 例、平均年齢 16.1 歳で、発生部位は大腿骨 5 例、脛骨 2 例、腓骨 2 例、上腕骨 1 例であった。

対象としたパラフィン包埋ブロックを薄切および脱パラフィン後、抗アネキシン A2 抗体を用いて免疫組織化学をおこなった。腫瘍細胞におけるアネキシン A2 陽性細胞を検索し、陽性細胞率 10%以上の症例を陽性例、他方 10%未満の症例を陰性例とした。臨床病理学的因子と比較検討し、アネキシン A2 発現の意義を検索した。

(倫理面への配慮)

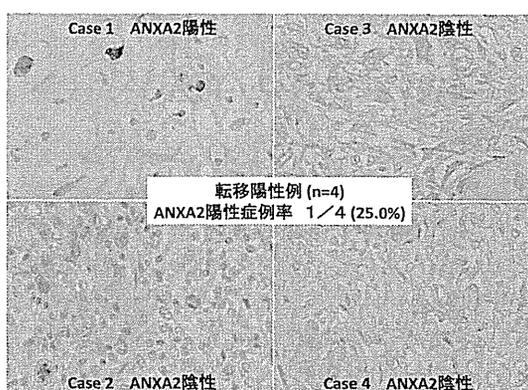
ヒト組織標本を用いた解析に関しては、保存されているパラフィンブロックを使用することを本学倫理審査委員会に申請し、承認を受けている(No.2312)。患者情報を記載しているデータファイルは、暗証番号を使用し研究者個人しか使用できないようにした。また、そのデータは全て施錠可能な部屋の中で管理した。

C. 研究結果

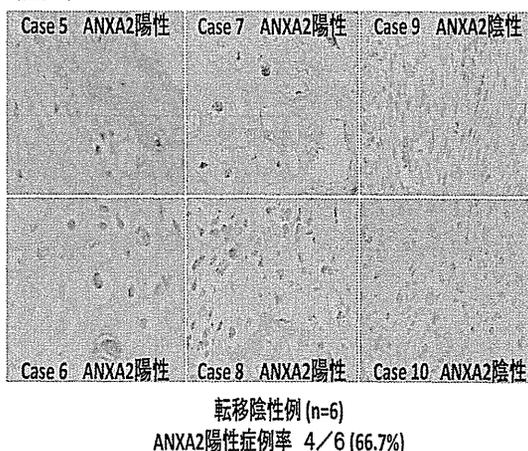
ヒト骨肉腫組織におけるアネキシン A2 発現は、腫瘍細胞の細胞膜および細胞質に観察された。アネキシン A2 陽性腫瘍細胞は、類骨形成能の高い部位で比較的多く観察される一方で、類骨形成が乏しいあるいは見られない部位では、ほとんど観察されなかった。本研究で解析した 10 例中、アネキシン A2 陽性例および陰性例はそれぞれ 5 例ずつであ

った。治療抵抗性を示し死亡に至った症例は5例であり、内4例は術後に肺転移を生じた。肺転移陽性症例4例におけるアネキシンA2陽性例は1例、陰性例は3例であった。一方、肺転移陰性症例6例におけるアネキシンA2陽性例は4例、陰性例は2例であった。換言すれば、アネキシンA2陽性例は、肺転移陽性群において4例中1例(25.0%、図1)、一方肺転移陰性例群において6例中4例(66.7%、図2)と前者で低値を示しており、アネキシンA2発現低下が肺転移に関与することが示唆された。稀少サンプル数のため統計学的な有意差は得るには至らなかった。アネキシンA2発現と、年齢、性別、発生部位、組織型には明らかな統計学的有意差はみられなかった。

(図1)



(図2)



D. 考察

主任研究者のグループにより、国立がん研究センターで採取された臨床検体において、miR-133a 発現と臨床予後との間に負の相関があることが明らかとなっている。さらに、アネキシンA2がmiR-133aの標的遺伝子として同定されたことから、miR-133a発現増加によるアネキシンA2発現低下が、予後不良に関与することが示唆される。本研究では、臨床病理学的因子の中でも骨肉腫患者の予後を規定する肺転移に着目し、骨肉腫原発巣におけるアネキシンA2発現との関連性を検索した結果、肺転移陰性例の多くがアネキシンA2陽性例であるのに対し、肺転移陽性症例の75%がアネキシンA2陰性例であり、アネキシンA2発現低下が肺転移促進に関与している可能性が示唆された。但し、統計学的有意差を得るには至らず、稀少サンプル数の影響と考えられた。今後は更なる患者数でヒト骨肉腫におけるアネキシンA2の発現意義を転移予測マーカー等の観点から明らかにすると共に、miR-133a発現量との関連性を併せて検討する必要がある。

E. 結論

ヒト骨肉腫原発巣において、miR-133aの標的分子であるアネキシンA2の発現低下が、肺転移促進性に関与することが示唆された。miR-133a機能阻害による骨肉腫への新たな治療法を開発する上で、アネキシンA2がそのメカニズムを明らかにするための重要な分子となる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Osaki M, Okada F, Ochiya T: MicroRNA therapy targeting cancer stem cells: A new paradigm for cancer treatment and prevention of tumor recurrence. Ther Deliv (in press)

Ohira T, Sunamura N, Nakayama Y, Osaki M, Okada F, Oshimura M, Kugoh H: miR-19b regulates hTERT mRNA expression through targeting PITX1 mRNA in melanoma cells. Sci Rep 3(5): 8201, 2015

2. 学会発表

尾崎充彦、平畑美緒、伊藤真保、神田裕介、落谷孝広、押村光雄、井藤久雄、岡田 太:ヒト骨肉腫細胞の肺転移を抑制するmiRNA-143 が制御する標的遺伝子群からみた転移促進因子の検索 第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24-26 日、広島

平畑美緒、尾崎充彦、岡田 太:PAI-1 は骨肉腫細胞の浸潤・転移に促進性に作用する 第 23 回日本がん転移学会学術集会、2014 年 7 月 10-11 日、金沢

平畑美緒、神田裕介、尾崎充彦、岡田 太:PAI-1 はヒト骨肉腫細胞肺転移を抑制するための標的分子となりうる 第 6 回日本 RNAi 研究会、2014 年 8 月 28-30 日、広島

平畑美緒、尾崎充彦、神田裕介、落谷孝広、井藤久雄、岡田 太:PAI-1 ノックダウンはヒト骨肉腫細胞の浸潤・転移を抑制する 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25-27 日、横浜

平畑美緒、尾崎充彦、神田裕介、岡田 太:PAI-1 はヒト骨肉腫細胞肺転移を抑制する標的となりうる 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

骨肉腫患者由来血中 miRNA 発現の解析

研究分担者 藤原 智洋 岡山大学病院新医療研究開発センター

研究要旨

細胞内だけでなく細胞外へも分泌される、いわゆる分泌型miRNAの骨肉腫における知見は未だ得られていない。分泌型miRNAは特にがんをはじめとする疾患の病態やステージなど、ヒトの生理状態によってその発現量や種類が大きく変化するため、血液などの体液を利用した非侵襲的な診断用バイオマーカーとして開発されようとしている。骨肉腫における分泌型miR-133aのおよびその臨床病理学的相関性と解析から新たなバイオマーカーとしての可能性を検討した。2010年から2012年に採取された治療前の骨肉腫患者10名、非骨肉腫患者10名、および健常者8名から採取された血液より血清を分離しRNA抽出を行った。それぞれのサンプルにおけるmiRNAの発現をRT-PCR法で確認したところ、miR-133a発現が健常者、非骨肉腫患者群と比較し、骨肉腫患者群の血清で有意に発現が高いことが示された。さらに、骨肉腫患者の術前血清と比較し術後血清では有意に発現低下を示し、単癌状態を示すバイオマーカーとしての可能性、および、S-TuD治療における効果判定のモニタリング手段としての可能性が示唆された。

A. 研究背景、目的
(背景)

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株においてがん幹細胞分画を単離し、ヒト骨肉腫手術検体におけるがん幹細胞分画の存在とその分画におけるmiR-133a高発現を見出してきた。近年、ヒト悪性腫瘍におけるがん幹細胞マーカー発現率と患者の予後との間に負の相関があることが報告されつつある。したがって、ヒト骨肉腫組織におけるmiR-133a発現の臨床病理学的意義を明らかにすること、さらにmiR-133aの標的遺伝子群の同定および臨床病理学的因子と比較検討は、骨肉腫の発生および進展のメカニズムを明らかにする上で極めて重要であるのみならず、骨肉腫の治療方針決定や予後予測の観点からも有用性が高い。このような背景を基に、複数の施設から集められた多数のヒト骨肉腫臨床材料を用い、miR-133aおよびその標的遺伝子の発現解析を行ったところ、前年度までに、国立がん研究センター中央病院および岡山大学において、骨肉腫組織におけるmiR-133aの発現高値が患者予後不良と相関することが明らかになった。

近年、miRNA 細胞内だけでなく細胞外へも分泌され(分泌型miRNA)、血液中に安定した形で存在することが知られるようになった。特にがんをはじめとする疾患の病態やステージなど、ヒトの生理状態によってその発現量や種類が大きく変化するため、血液などの体液を利用した非侵襲的な診断用バイオマーカーとして開発されようとしている。骨軟部腫

瘍における分泌型miRNAの存在は明らかになっておらず、骨肉腫における分泌型miR-133aのおよびその臨床病理学的相関性と解析から新たなバイオマーカーとしての可能性を検討した。

B. 研究方法

岡山大学ならびに国立がん研究センターにおいて保管されている、骨肉腫患者由来血清の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、2000年～2012年に採取された治療前の骨肉腫患者10名、非骨肉腫患者10名、および健常者8名から採取された血液より血清を分離しRNA抽出を行った。それぞれの検体よりRNA抽出を行い、miR-133aおよびcel-miR-39の発現量を測定し、臨床経過との関連性を検討した。

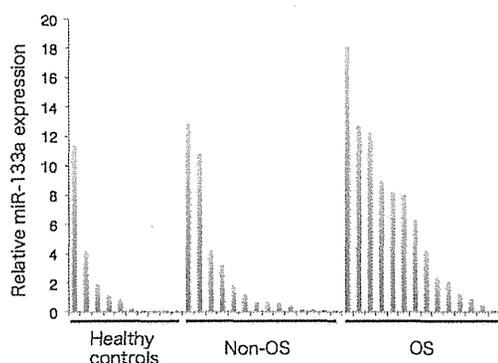
(倫理面への配慮)

本研究はすべて、文部科学省および厚生労働省による疫学研究に関する倫理指針に従って行った。事前の十分な説明と自由意思による同意に基づいた研究を行い、個人情報情報は徹底して保護した。患者情報を記載しているデータファイルは、暗証番号を使用し研究者個人しか使用できないようにした。また、本研究の開始に関しては、事前に当大学の倫理委員会により審査及び承認を得ることで研究の適正性を確保した。

C. 研究結果

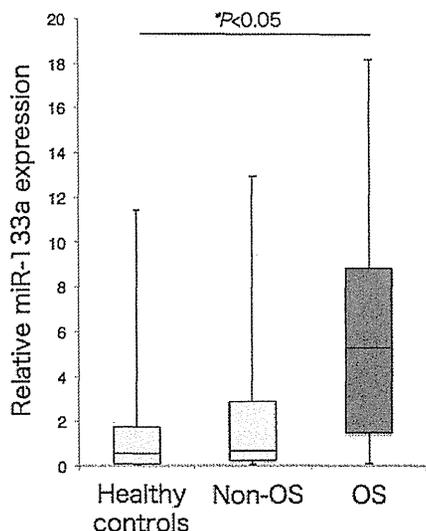
2010年から2012年に採取された治療前の

骨肉腫患者 10 名、非骨肉腫患者 10 名、および健常者 8 名から採取された血液より血清を分離し RNA 抽出を行った。それぞれのサンプルにおける miRNA の発現を RT-PCR 法で確認したところ、miR-133a 発現が健常者、非骨肉腫患者群と比較し、骨肉腫患者群の血清で有意に発現が高いことが示された (図 1)。



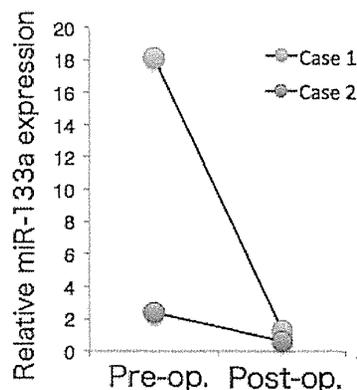
(図 1) 骨肉腫患者 10 名、非骨肉腫患者 10 名、および健常者 8 名から採取された血清における miR-133a 発現

特に、骨肉腫患者群と健常者群の間には統計学的有意差を認めた (図 2)。



(図 2) 図 1 におけるデータを元にした箱ひげ図および統計学的解析 (Welsh's *t*-test)

さらに、骨肉腫患者の術前血清と比較し術後血清では有意に発現低下を示し、単癌状態を示すバイオマーカーとしての可能性が示された (図 3)。



(図 3) 手術患者における術前および術後血清中 miR-133a 発現の変化

D. 考察

我々は、骨肉腫組織内 CD133 高発現分画はがん幹細胞様性質を示し、その分画内で miR-133a の発現が亢進していることを見出している。また、その組織内発現と臨床予後との間に負の相関があることを見出している。しかし、骨肉腫患者血清における発現とどのように相関するかは分かっておらず、いわゆる分泌型 miR-133a が骨肉腫患者において担癌状態を表しているかどうかを検討した。その結果、miR-133a 発現が健常者、非骨肉腫患者群と比較し、骨肉腫患者群の血清で有意に発現が高いことが明らかとなった。統計学的解析による有意差が確認されたが、健常者にも miR-133a が高値を示す症例があった。これは miR-133a が筋特異的 miRNA であり、筋組織の状態についての情報が不明であることに起因する可能性がある。

また、骨肉腫患者の術前血清と比較し術後血清では有意に発現低下を示すことが明らかになった。未だ 2 症例の検討に過ぎないが、今後の症例の蓄積が必要である。この結果により、単癌状態を示すバイオマーカーとしての可能性が示された。

今後は多くの症例へ解析を拡げ、バイオマーカーとしての可能性、および、S-TuD-133a による治療のモニタリングが可能となるか検討が必要である。

E. 結論

ヒト骨肉腫患者由来血清における miR-133a

の発現は、健常者および年齢調整した非骨肉腫患者由来血清と比較し、高値を示していることが明らかとなった。また、術後にはその発現は低下しており、臨床経過を反映するバイオマーカーとしての可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ①Tomohiro Fujiwara, Akira Kawai, Yutaka Nezu, Yu Fujita, Nobuyoshi Kosaka, Toshifumi Ozaki, and Takahiro Ochiya. Circulating MicroRNAs in Sarcoma: Potential Biomarkers for Diagnosis and Targets for Therapy, Chemotherapy. 2014: 3: 123
- ②Tomohiro Fujiwara, Toshiyuki Kunisada, Ken Takeda, Koji Uotani, Aki Yoshida, Takahiro Ochiya, and Toshifumi Ozaki. MicroRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers. Biomed Res Int. 2014: 592868.
- ③Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. Stem Cells. 2014 Apr;32(4):959-73.
- ④Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis. Mol Ther Nucleic Acids. 2014 Sep 2;3:e189.
- ⑤藤原智洋, 尾崎敏文, 川井 章, 落谷孝広. microRNA の発現抑制による骨肉腫を含むがん治療への応用. 医薬ジャーナル 2014 年 12 月号、第 50 巻、12 号、p. 97-104、2014
- ⑥藤原智洋, 国定俊之, 武田 健, 尾崎敏文. 軟部腫瘍の診療における評価法の活用 関節外科 2014 年 10 月号、第 33 巻、33 号、p. 184-203、2014
- ⑦藤原智洋, 榊原浩子, 川井 章. 骨転移の基本・がん種別特徴. 骨転移の診療とリハビリテーション、p. 72-84、医歯薬出版株式会社、東京、2014

2. 学会発表

- ①Fujiwara T, Katsuda T, Kosaka N, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Exosome-mediated lung

metastasis formation in osteosarcoma progression. Orthopaedic Research Society, New Orleans, 2014

- ②Tomohiro Fujiwara, Yutaka Nezu, Toshiyuki Kunisada, Ken Takeda, Toshinori Omori, Akira Kawai, Takahiro Ochiya, Toshifumi Ozaki. RPN2 GENE REGULATES MALIGNANT PHENOTYPES OF OSTEOSARCOMA. Connective Tissue Oncology Society, Berlin, Annual Meeting Final Program, p.58, 2014

- ③藤原智洋 川井 章 小林英介 丹沢義一 中馬広一. 初回診断から 17 年後に非典型的の肺転移像をきたした低悪性度中心型骨肉腫の 1 例. 中部日本整形災害外科学会雑誌, Vol. 57, 春期学会号, p.155. 第 122 回中部日本整形災害外科学会学術総会, 岡山, 2014 年 4 月

- ④藤原智洋 川井 章 小倉浩一 窪田大介 薛 宇孝 小林英介 丹沢義一 中谷文彦 中馬広一. 過去 30 年の骨盤悪性骨腫瘍の治療成績. 日本整形外科学会雑誌、Vol.88、No.3、S667. 第 87 回日本整形外科学会学術総会, 神戸, 2014 年 5 月

- ⑤藤原智洋, 国定俊之, 武田 健, 山川泰明, 上原健敬, 大森敏則, 魚谷弘二, 杉生和久, 柳井広之, 尾崎敏文. 右尺骨遠位骨端部骨腫瘍の 1 例. 第 138 回関西骨軟部研究会, 大阪, 2014 年 6 月

- ⑥藤原智洋 根津 悠 川井 章 尾崎敏文 落谷孝広. 骨肉腫における ribophorin II (RPN2) の機能解析. 日本整形外科学会雑誌、Vol.88、No.6、S1172. 第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、大阪、2014 年 7 月

- ⑦藤原智洋、国定俊之、武田 健、尾崎敏文 仙骨発生骨巨細胞腫の治療成績. 第 123 回中部日本整形災害外科学会学術総会, 名古屋, 2014 年 10 月. 中部日本整形災害外科学会雑誌, Vol. 57, 秋期学会号, p.248

- ⑧藤原智洋 国定俊之 武田 健 魚谷弘二 杉生和久 根津 悠 川井 章 落谷孝広 尾崎敏文. ribophorin II (RPN2) は骨肉腫の化学療法感受性及び浸潤能を制御する. 日本整形外科学会雑誌、Vol.88、No.8、S1362. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島、2014 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1.特許取得
特になし。

2.実用新案登録
特になし。

3.その他
特になし。

骨肉腫細胞の膜タンパク質のプロテオーム解析による治療標的候補の探索のための基盤的技術の開発

研究分担者 近藤格 国立がん研究センター研究所希少がん研究分野

研究要旨

miRNA が発現制御する遺伝子の候補の中から膜タンパク質を特異的に抽出するための基盤技術の開発を試みた。細胞膜上のタンパク質をビオチン標識し、タンパク質を抽出してアビジンカラムで精製、ペプチド化したあとで質量分析で同定した。複数の骨肉腫細胞および骨芽細胞を調べ、実験手法の最適化を図り、平均して300種類のタンパク質を同定した。本研究は、同定されたタンパク質のデータベース化、および細胞間での多様性を反映しうる鍵となる膜タンパク質の同定のための基盤技術として、今後の応用を図ってきたい。

A. 研究背景、目的

(背景)

miRNA は複数の遺伝子の発現および分子パスウェイを制御することによってがん幹細胞の維持・分化に関わっている。miRNA が制御するタンパク質の候補は数多く報告されており、どの候補に焦点を当てるかが研究の成否を分けることになる。候補タンパク質のうち、膜タンパク質を重点的に調べることは、治療標的の新規候補の同定および個別化医療のためのバイオマーカー候補の同定において有効である。一方、ある遺伝子産物・タンパク質が膜に局在するかどうかは核酸・アミノ酸配列から予想することは未だ困難であり、データベースとしても開発途中である。現状では、実際のサンプルにあたって解析を行う必要があるが、そのための方法論も未だ確立されていない。

タンパク質を網羅的に解析する手法として質量分析を用いた実験が普及しており、一度に数千種類のタンパク質を同定・定量できる標準的な装置が市販されている。一方、膜タンパク質を特異的にスクリーニングする手法については開発が必要である。

本研究の目的は、骨肉腫の新規治療法の開発に資する膜タンパク質の同定法の確立である。miRNA によって発現制御されるタンパク質の中から膜タンパク質を同定するための基盤的技術を開発するために、実験手法の最適条件を検討した。

B. 研究方法

細胞

骨肉腫細胞 (HOS、HMMG/HOS、143B、MG63) および骨芽細胞 (hFOB) を使用した。

ビオチン標識法

培養細胞を PBS で洗浄し血清タンパク質を除去した後、膜表面に存在するタンパク質をビオチン化した。ビオチン化試薬としてビオチンとタンパク質結合部位との間にジスルフィド結合が入っているものを使用した。全タンパク質を細胞から抽出し、ビオチン化されたタンパク質をアビジンカラム(ピアス社)で回収した。そして、還元剤でカラムを処理することで、ビオチン・アビジン複合体からタンパク質を回収した。最後に遠心濃縮によりタンパク質を濃縮した。

ペプチド調整と質量分析

回収されたビオチン化タンパク質をトリプシンで切断してペプチド化し、質量分析装置 (OrbiTrap XL、サーモ社) にてペプチドの精密質量を測定した。得られたペプチドのデータについて、MasCot ソフトウェア (マトリックス・サイエンス社) を使用してデータベース検索を行い、ペプチドの同定および半定量を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では培養細胞を用いており、倫理的な問題は存在しない。

C. 研究結果

本研究では、膜タンパク質を特異的に回収するためにビオチン化試薬を使用した。本試薬は膜に浸透することなく、細胞外に存在するタンパク質だけを標識する。標識後に全タンパク質を回収し、アビジンカラムで精製することで、膜タンパク質等の細胞外タンパク質を回収することができる。本手法が発表された当初は、カラム内にて形成されるビオチン・ア

ビジン複合体からタンパク質を回収することが著しく困難であり、効率よく膜タンパク質を精製することが困難だった。その後、ビオチンとタンパク質の間にジスルフィド結合付スペーサーを入れることで、還元剤処理によって効率よくタンパク質を回収できるようになった。本研究では新しくスペーサーにジスルフィド結合の入った新しいスペーサー付ビオチン化試薬を用い、骨肉腫の膜タンパク質の網羅的解析を行った。

膜タンパク質の網羅的解析を行った。コントロールとしてビオチン化試薬の入らないバッファーで処理した細胞から同様に抽出・精製したペプチドを使用した。差分解析を行うことで膜タンパク質の同定を試みた。また、骨肉腫細胞の対照として骨芽細胞を使用した。

標識、精製、濃縮などさまざまな実験条件を検討し、骨肉腫細胞における膜タンパク質の同定を行った。それぞれの細胞株より、平均して300種類ほどの膜タンパク質を同定した。

同定されたタンパク質の中には今までの報告から機能的に重要な役割を果たすタンパク質や創薬標的になりうるタンパク質が含まれていた。

骨肉腫と骨芽細胞の間で発現差のあるタンパク質、骨肉腫細胞間で共通して発現する膜タンパク質を同定した。

D. 考察

本研究では骨肉腫細胞および骨芽細胞を用いて膜タンパク質の網羅的解析を実施した。今年度は主に技術的な課題に取り組んだ。骨肉腫細胞において同定された膜タンパク質の発現制御にどの miRNA がどのように関わっているかを調べるために、特定の miRNA の導入前後の細胞を比較解析して、直接的・間接的に制御される膜タンパク質を調べることが次のステップである。

ゲノム情報から膜貫通ドメインをもつタンパク質は約 5000 個存在する。一方、本実験手法で同定された膜タンパク質はその1割ほどである。予測されるタンパク質の数と実際にプロテオーム解析で同定された数を直接的に比較することはできないが、本研究のタンパク質の網羅性を向上させる余地が存在すると考えられる。すなわち、標識効率、回収率、質量分析の検出限界、などによって網羅性が制限

されている可能性がある。今回の検討で標識効率および回収率は最適化をすでに図っており、今以上の網羅性は望み難い。一方、ペプチドを多次元分離するなどによって質量分析の検出限界を向上させることによって、同定段階での網羅性を向上させることが可能である。また、細胞間でのばらつきに対して、手法の標準化が課題として残されている。

骨肉腫細胞間で共通したタンパク質が少なかった点については、骨肉腫の多様性を反映している可能性がある。臨床病理学的な観察から、症例間、腫瘍間、腫瘍内において骨肉腫は多様性に富んでいることが報告されている。骨肉腫においては、化学療法剤による補助療法と切除術が標準治療として確立されているが、奏効率は7割程度に留まっている。治療法の開発のために多様性の分子レベルの解明が求められている所以である。本研究で示唆された、骨肉腫細胞間での膜タンパク質発現パターンの不均一性が、*in vivo* の骨肉腫細胞の多様性とどのように関係しているかを明らかにし、分子レベルに基づく症例および腫瘍の層別化に資するバイオマーカーを特定することが本研究の出口である。

E. 結論

miRNA が発現制御する遺伝子の候補の中から膜タンパク質を特異的に抽出するための基盤技術の開発を試みた。細胞膜上のタンパク質をビオチン標識し、タンパク質を抽出してアビジンカラムで精製、ペプチド化したあとで質量分析で同定した。複数の骨肉腫細胞および骨芽細胞を調べ、実験手法の最適化を図り、平均して300種類のタンパク質を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichikawa H, Yoshida A, Kanda T, Kosugi SI, Ishikawa T, Hanyu T, Taguchi T, Sakumoto M, Katai H, Kawai A, Wakai T, Kondo T. Prognostic significance of promyelocytic leukemia expression in gastrointestinal stromal tumor; integrated proteomic and transcriptomic analysis. *Cancer Sci*. 2014 Dec 2. doi: 10.1111/cas.12565.
2. Taoka M, Morofuji N, Yamauchi Y, Ojima H, Kubota D, Terukina G, Nobe Y,

- Nakayama H, Takahashi N, Kosuge T, Isobe T, Kondo T. Global PROTOMAP Profiling to Search for Biomarkers of Early-Recurrent Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res.* 2014 Nov 7;13(11):4847-58. doi: 10.1021/pr500262p.
3. Hosoya N, Sakumoto M, Tomita Y, Kondo T. Approach to spot overlapping problem in 2D-PAGE revealed clinical and functional signature of RKIP and MnSOD in renal cell. *EuPA Open Proteomics.* 2014. 4;129-139.
 4. Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. *J Proteome Res.* 2014 May 2;13(5):2250-61. doi: 10.1021/pr400929h.
 5. Mimae T, Ito A, Hagiwara M, Nakanishi J, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, Kondo T. A novel approach to pseudopodia proteomics: excimer laser etching, two-dimensional difference gel electrophoresis, and confocal imaging. *Protoc exch.* 2014 Mar 4;2014. pii: 2014.007.
 6. Ichikawa H, Kanda T, Kosugi S, Kawachi Y, Wakai T, Kondo T. Proteomic and meta-transcriptomic study on lymph node metastasis in gastric cancer. *EuPA Open Proteomics.* 2014;3:183-94.
2. 学会発表
1. 近藤格 プロテオーム解析による肉腫のバイオマーカーの開発 2014年4月5日
 2. 近藤格 プロテオーム解析によるバイオマーカー開発の常識を疑う 第12回日本プロテオーム学会 シンポジウム 2014年7月17-18日 つくば国際会議場
 3. Tadashi Kondo, Akira Kawai. PROTEOMICS TOWARD PERSONALIZED TREATMENT OF SARCOMA. Siena Meeting, 2014年8月31日-9月4日 Siena, Italy.
 4. Daisuke Kubota, Akihiko Yoshida, Akira Kawai, Tadashi Kondo. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. 13th Annual Meeting of Human Proteome Organization. 2014年10月5-8日、Madrid, Spain.
 5. Tadashi Kondo, Biomarker development for sarcoma toward personalized medicine. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine 2014年10月9-11日, Athens, Greece
 6. 近藤格 蛍光二次元電気泳動法を用いたがんのバイオマーカー開発 第65回日本電気泳動学会総会 2014年24-25日
 7. Tadashi Kondo, Translational Research of Sarcomas. 第1回国際がん研究シンポジウム、2015年2月12-13日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし。
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表