

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670179

研究課題名(和文)骨・軟骨腫瘍で特異的変動しているmicroRNAの同定とその生物学的意義の解析

研究課題名(英文)Analysis for microRNA in osteo- and chondro-sarcomas

研究代表者

佐藤 孝 (Sato, Takashi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：20170756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：集学的治療法の進歩により、骨腫瘍の治療は飛躍的に進歩している。しかし、依然として遠隔転移例の予後は不良であり、手術・放射線療法を含めた局所療法に加えて遠隔転移の制御法の開発は極めて骨・軟部腫瘍の治療戦略上極めて重要なテーマである。本研究では、高肺転性骨・軟骨腫瘍細胞株を用いて、転移関連のnon-coding RNAの同定を試みた。両者で共通に過剰発現していたlincRNA-ARF6を同定した。lincRNA-ARF6は、ARF6の発現抑制に関連していたが、細胞生物学的検証では運動浸潤能には影響を与えなかった。lincRNA-ARF6の過剰発現については今後更なる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Advances in treatment modalities for osteo-, and chondro-sarcomas (OCSs) contributes to their disease outcomes, whereas these have been still unsatisfactory in metastatic tumors of OCS. We identified overexpression of lincRNA-ARF6 OCSs cell lines with high metastatic potentiality. The lincRNA-ARF6 regulated ARF6 expression, but not related with motility and invasion of these cell lines. Further studies will be needed for contribution of non-coding RNA in OCSs metastasis.

研究分野：人体病理

キーワード：転移 骨軟部腫瘍 miRNA

1. 研究開始当初の背景

集学的治療法の進歩により、骨腫瘍の治療は飛躍的に進歩している。しかし、依然として遠隔転移例の予後は不良であり、手術・放射線療法を含めた局所療法に加えて遠隔転移の制御法の開発は極めて骨・軟部腫瘍の治療戦略上極めて重要なテーマである。

高転移株を樹立しその生物学的特性を解析する方法は、各種悪性腫瘍で古くから行われてきた研究手法である。

我々は独自にSCID マウスで高率に肺転移を生じる、骨肉腫細胞株LMOSi 3 と軟骨肉腫細胞株LMCSi4 を樹立し、その細胞生物学的特性を解析している。

一方、蛋白質をコードしないnon-coding RNA が、細胞の分化や悪性腫瘍の生物学的特性に関与していることが明らかとなってきた。

我々も、骨肉腫培養細胞株で、non-coding RNA の一種であるmiR-127 がepigenetic な発現制御を受け、BCL6 の発現抑制に関わること、

骨肉腫の約半数でmiR-127の発現低下しBCL6 の過剰発現を誘導することで、腫瘍細胞のアポトーシスの回避に寄与している事実遭遇した。さらに興味深い事に、miR-127 の発現低下した骨肉腫患者は有意に予後不良であった。しかし、この研究でmiR-127 はヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬であるTSA (trichostatin A)投与で発現低下するが、プロモーター領域のDNA メチル化を解析してみるとhypermethylation は生じていなかった。この事は、高肺転移性の骨肉腫細胞株に於いてnon-coding RNA による生物学的特性の形成が行われていることを示すものである。

近年、ポリコーム複合体 (PolycombRepressive Complex, PRC)などの抑制因子がリクルートする新たな機構として、非翻訳RNA の一種lincRNAs (Large intergenic noncoding RNAs)が足場として関与することが報告されている(図1)。

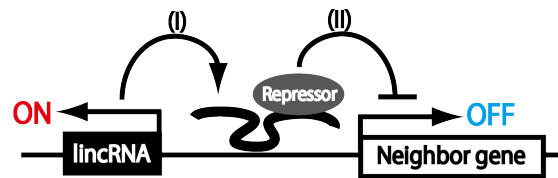


図1 lincRNA の作用

(I) lincRNA はアンチセンス鎖より生成。
(II)抑制因子(ポリコーム蛋白など)とRNA-タンパク複合体を形成し近傍の遺伝子座(標的遺伝子)を抑制する。

lincRNAは約8,000 種類存在することが知られているが、その機能と標的遺伝子が明らかになっているものは僅かである。既知lincRNAのうち、X 染色体の不活化に関与するXist や、インプリンティングに関与するAir、Kcnq1 は、それらが転写された近傍に存在する遺伝子(シス領域)の転写制御に関与している(図1)。

本研究課題では骨肉腫細胞株LMOSi 3 と軟骨肉腫細胞株LMCSi4 の肺転移巣と親株肝に見られるnon-coding RNA の発現の違いの中に、転移能獲得に関連するRNAが存在するか検証した。

2. 研究の目的

高肺転移骨肉腫(LMOSi 3)および軟骨肉腫(LMCSi4)細胞株で過剰発現するlincRNA に注目し、骨・軟骨悪性腫瘍の肺転移に係るlincRNA(lincRNA-ARF6)の生物学的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

研究の細目は、まず親株と高転移株間でdifferential に発現しているnon-coding RNA を網羅的に同定する。次に注目した標的分子について、細胞運動能、浸潤転移能に係る分子機構の解析を行い、その妥当性を遺伝子工学的に検証する。

(1) 次世代シクエンサーを用いた、網羅的解析

次世代シクエンサー SOLiD4 5500W (therm Fisher) と Non-coding RNA run system を用いて、LMOSi 3 と LMCSi4 とそれぞれの親株肝で differential に発現している non-coding RNA を網羅的に同定した。発現の2倍以上変動している物を標的として、以下の解析を行った。

(2) Bioinformatics 的解析による標的 non-coding RNA の抽出

遺伝子オントロジーエンリッチメント解析ソフトウェアパッケージ gseq/Gostats/ClusterProfiler/topGO を用いて解析し、細胞運動・浸潤能に関連した non-coding RNA の抽出を行った。

(3) 標的 non-coding RNA の生物学的解析

標的 non-coding RNA として抽出した miR-127 と lincRNA-ARF6 について、scratch assay および Matri gel invasion assay を用いて細胞運動/浸潤能を評価した。関心 non-coding RNA が細胞運動/浸潤能に影響を与えない場合、miRNA であれば miRBase から導き出される標的 mRNA について、その生物学的意義を検証した。

必要に応じて、conditional な過剰発現系を作成し、同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 標的 non-coding RNA の特定

次世代シクエンサーを用いた解析では、LMOSi 3 と LMCSi4 に共通して過剰発現していた non-coding RNA は 89 個、発現低下していたものは 62 個であった。このうち最も発現低下の見られた miR-127 と過剰発現していた、lincRNA-ARF6 を関心 non-coding RNA として

抽出し、解析を行った。

(2) miR-127 と浸潤転移能ならびに関連蛋白質の発現制御機構の解析

各々の親株に対し shRNA システム (Thermo) を用いて scratch assay および Matri gel invasion assay により細胞運動/浸潤能を評価したが変化は認められなかった。そこで、miR-127 については miRBase より予測標的 mRNA 解析を行い、BCL6 との関連を検討する事にした。

miRNA-127 の発現低下していた LMOSi 3 と LMCSi4 に miR-127 を発現させると、BCL6 の発現が回復した (図2)。

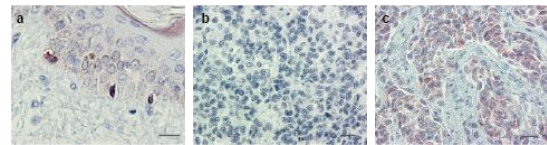


図 3

高転移株における miR-127 の発現低下は BCL6 の過剰発現を誘導し、骨肉腫、軟骨肉腫の apoptosis の制御による細胞増殖能の獲得に寄与している可能性が示唆された。そこで、ヒト骨肉腫の切除標本を用いて BCL6 の免疫染色を行った (図3)。

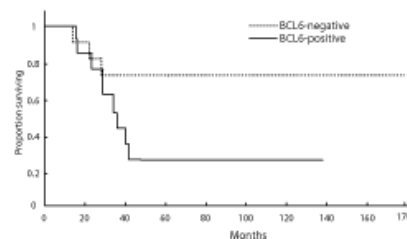


図 4

BCL6 過剰発現グループは有意に予後不良であり (図4)、miR-127 の低下は運動/浸潤能の獲得よりは、細胞増殖能、アポトーシスの抑制の面から LMOSi 3 と LMCSi4 の転移巣への生着をしたがさえしている事が推測された。また、miR-127 の発現は epigenetic な制御受

けているとの報告もあり、この研究でmiR-127はヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬投与で発現低下するが(図5)、プロモーター領域のDNAメチル化を解析してみるとhypermethylationは生じていなかった。この領域のヒストン修飾を含めた発現制御機構を明らかにする必要があると考えられた。



図5

(3) lincRNA-ARF6の解析

lincRNA-ARF6はLMOSi3およびLMCSi4のセレクションの回数依存性の発現上昇を認めた。ARF6は、細胞膜とエンドゾームに局在し、細胞膜のエンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの膜動態や、細胞膜直下のアクチン細胞骨格の再構築に関わることが知られている。また、ARF6と転移・浸潤能の関連は複数の悪性腫瘍で報告されているので、我々は、MOSi3およびLMCSi4の親株に対してlincRNA-ARF6のconditionalな過剰発現系を作成した。

これらのクローンでは、ARFの発現低下が認められたが、in vitroでの運動/浸潤能の亢進は確認されなかった。また、BCL6と同じ症例でのARF6の免疫染色を行ったが、陽性所見が強く認められる症例はなかった。

lincRNA-ARF6のconditional発現系を用いた次世代シーケンサーによる、RNA sequenceおよびChIP-sequenceを施行しているが未だ転移関連分子の特定には至っていない。

まとめ

現段階では、高転移株でmiR-127の発現低下はBCL6の過剰発現誘導を介して、これらの細胞株の増殖能亢進の面から転移を下支えして

いると考えられたが、発現の低下していたlincRNA-ARF6の標的分子は見つかっていない。今後は、別の標的non-coding RNAについて解析を進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Honma H, Takahashi Y, Matsui M, Satoh I, Fukuda I, Takahashi K, Takebe N, Nagasawa K, Ono M, Sasai T, Kajiwara T, Sugai T, Satoh J, Ishigaki Y.

Non-Islet Cell Tumor Hypoglycemia Is Caused by Big IGF-II in a Patient with a Carcinosarcoma of the Uterus. Intern Med. 2015;54(24):3165-9. doi:

10.2169/internalmedicine.54.4945. (査読有り)

Kawasaki T, Suzuki M, Sato A, Yashima-Abo A, Satoh I, Kato R, Kato Y, Obara W, Shimoyama T, Ishida Y, Sugai T. Neural cell adhesion molecule (CD56)-positive B cell lymphoma of the urinary bladder. J Clin Pathol. 2016 Jan;69(1):89-92. doi:

10.1136/jclinpath-2015-203250. (査読有り)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 孝 (SATOH Takashi)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：30740617

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()