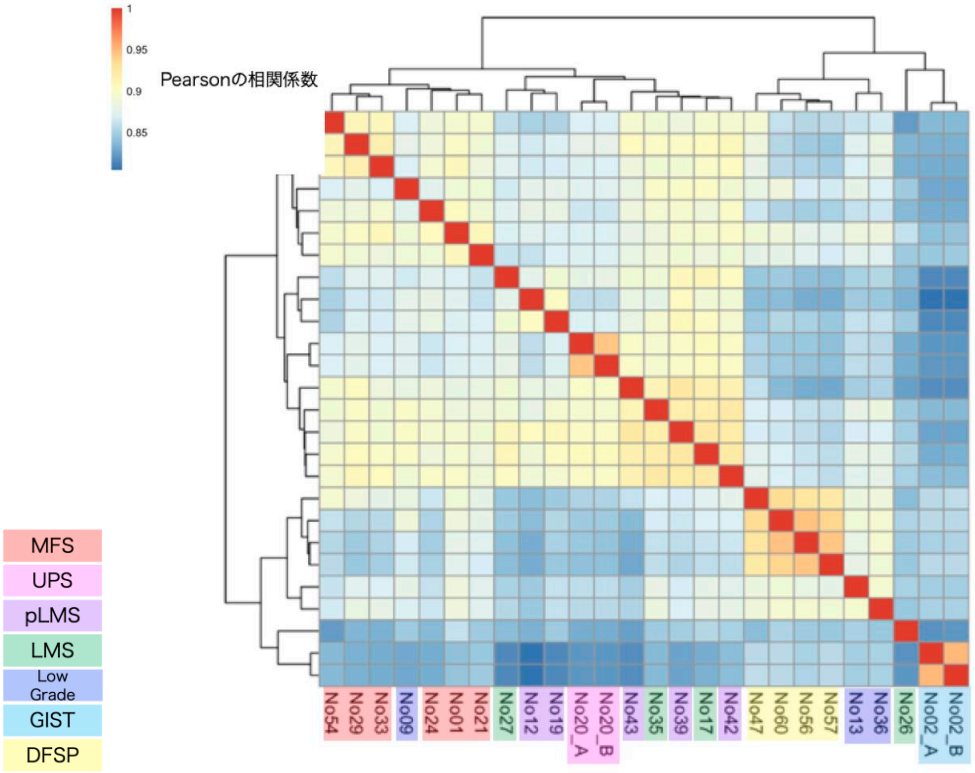
163　希少がん骨軟部腫瘍のCAGE法を用いた新規治療法開発	赤池　慶祐

【目的】骨軟部肉腫の治療成績は依然極めて不良であり、「希少がん」であるが故に限られたデータ量や、それに伴う消極的取組みが影響し新規治療の開発が滞っている現状がある。軟部肉腫の研究は組織型特異的遺伝子変異（特に融合遺伝子：ユーイング肉腫_EWS／FLI1、滑膜肉腫_SS18／SYT、横紋筋肉腫_PAX3-FOXO1 など）が発見され、各組織診断に有用なマーカーとなっている。しかしながら、未だ約 60%の骨軟部腫瘍には組織特異的遺伝子変化は不明である（complex karyotype sarcomas）。特に組織型頻度の高い紡錘型肉腫（spindle cell sarcoma）において未解明であり、UPS（Undifferentiated pleomorphic sarcoma：以前は MFH）と称される分化方向性が不明なものも多く含まれ、現在までに発生・発がんの因子も不明であり、診断はもとより治療法開発にも難渋しその解明が求められている。

【方法】近年開発された新規テクノロージーとして、各遺伝子に複数存在する転写開始点・プロモータ・それに伴うエンハンサの発現の網羅的精密解析を可能とした CAGE（Cap Analysis of Gene Expression 法）が理化学研究所で独自に開発されている。しかしながら現在までに、骨軟部肉腫において CAGE 法による解析は行われていないため、本研究では骨軟部肉腫に対して CAGE 解析を進めプロファイルイングを獲得した。

【結果】軟部肉腫手術検体 24 例に対して CAGE 解析を行い 99,602 個の転写開始点・プロモータ・それに伴うエンハンサの発現のプロファイルイングを獲得した。また骨肉腫抗がん剤耐性株に対して同様に CAGE 解析を行い 99,602 個の転写開始点・プロモータ・それに伴うエンハンサの発現のプロファイルイングを獲得した。そのプロファイリングは現在解析中であり、その機能解析や検証実験は骨軟部肉腫の悪性度解明や新規治療法開発に繋がると考えている。

軟部肉腫組織型相関図



163. 希少がん骨軟部腫瘍の CAGE 法を用いた新規治療法開発

赤池　慶祐

順天堂大学 医学部 整形外科

Key words：CAGE, 軟部肉腫, 骨肉腫

緒　言

骨軟部肉腫の治療成績は依然極めて不良であり、「希少がん」であるが故に限られたデータ量や、それに伴う消極的取組みが影響し新規治療の開発が滞っている現状がある。骨軟部肉腫の研究は、2000 年より染色体解析、CGH 解析、cDNA 発現解析、タンパク質発現解析などの発現解析が進み、組織型特異的遺伝子変異（特に融合遺伝子：ユーイング肉腫_EWS／FLI1、滑膜肉腫_SS18／SYT、横紋筋肉腫_PAX3-FOXO1 など）が発見され［1］、各組織診断に有用なマーカーとなっていると同時に発がん・治療法開発の key molecules となっている。また、2010 年より次世代シークエンサー（NGS）に基づいた遺伝子変異解析で低悪性線維粘液性肉腫、軟骨肉腫、孤立性繊維肉腫、骨巨細胞腫などにも組織特異的遺伝子変異が発見されてきた。しかしながら、未だ約 60%の骨軟部腫瘍には組織特異的遺伝子変化は不明である（complex karyotype sarcomas）。特に組織型頻度の高い紡錘型肉腫（spindle cell sarcoma）において未解明であり、UPS（Undifferentiated pleomorphic sarcoma：以前は MFH）と称される分化方向性が不明なものも多く含まれ、現在までに発生・発がんの因子も不明であり、診断はもとより治療法開発にも難渋している。

悪性骨軟部腫瘍（肉腫）の治療について、肺がんでは EGFR 変異などの発生・悪性度因子を治療標的とした（Tyrosine Kinase） TK 阻害剤治療が盛んであり、治療成績はめざましく改善している。また、その開発に伴い、プレシジョンメディスン（がんクリニカルシークエンス（以下がん CS））が近年欧米では進み、がん CS に基づいた正確な診断・分類・適切な治療法選定や前向きなデータ蓄積により新規治療開発・治療抵抗性解明もめざましく進んでいる［2］。一方、悪性骨軟部腫瘍においては、現在までに TK 阻害剤が奏効する治療標的はがん CS でも約 1%にしか同定されておらず、 肉腫においては TK 阻害剤治療の恩恵は少なく治療成績は他がん種に比べて対極的に依然不良である［2］。また近年、軟部肉腫に治療適応となった殺細胞性抗がん剤や血管新生阻害剤の奏効率は極めて低く、20 年以上前に開発されたアドリアマイシン、イフォマイドが依然ファーストラインであり、それを超える治療成績は出ていない［3］。更には近年めざましく進んでいる NGS 解析においても、上記組織型特異的融合遺伝子以外には、*p53*、*RB*、*p16*、*MDM2*、*CDK4* 遺伝子変化以上の発見（以前より指摘）はなく、NGS 解析においても画期的な新規治療標的には至っていない［3］。

近年開発された新規テクノロージーとして、各遺伝子に複数存在する転写開始点・プロモータ・それに伴うエンハンサの発現の網羅的精密解析を可能とした CAGE（Cap Analysis of Gene Expression 法）が理化学研究所で独自に開発されている。その方法は従来の mRNA 発現解析とは異なり、CAP 修飾された RNA 分子の 5‘末端の塩基配列を決定することにより、転写開始点を網羅的に抽出し、mRNA, polyA（－）RNA , non-coding RNA 含む多彩な RNA 発現を解析することが可能であり、つまりひとつの遺伝子には複数の転写開始点があることより、そのゲノム上の部位やどのように選択的に使われているかを詳細に解析可能となる方法となる。特にがん研究においては、腫瘍発生・増殖における転写開始点・プロモータ・それに伴うエンハンサは重要な役割を担っていることより、その網羅的な解析手法は腫瘍発生・増殖因子解明に大きな貢献があると理論上考えられると同時に、他がん種では既に複数の予後因子、がん発生因子同定が成されている［4～5］。

しかしながら現在までに、軟部肉腫において CAGE 法による解析は行われていないため、本研究では、難治性紡錘型軟部肉腫の手術検体を用い、CAGE 法を中心とした転写開始点・プロモータ・エンハンサの網羅的遺伝子発現プロファイリングを基に、発がん・悪性化に関わる遺伝子発現変化の解明を進めた。

方法および結果

1. 軟部肉腫の解析

順天堂大学で治療され、検体を採取されている約 100 例の紡錘形軟部肉腫の中で 24 例について探索セットとして解析を行った。探索セット紡錘型軟部肉腫 27 例（原発手術検体）の CAGE 解析を行い、転写開始点・プロモータ・エンハンサの網羅的遺伝子発現プロファイリングを行った。いずれも triplicate で解析を行った。解析においては、1）組織型（未分化多形肉腫_UPS 2 例、高悪性度粘液線維肉腫_HGMFS 6 例、通常型平滑筋肉腫_cLMS 4 例、多型平滑筋肉腫_pLMS 5 例、隆起性線維肉腫_DFSP 4 例など）、2）組織学的悪性度の比較などを進め、組織特異的、予後関連遺伝子発現の同定を進めた。

1）の結果として unsupervised のクラスタリング解析に添付図（図 1）のように組織型に一致した分類が行われた。また解析には edgeR を使用し、カットオフ FDR＜0.0001、|logFC| ≧2 としてプロモータを検索した。組織型相互解析としては通常型平滑筋肉腫と多型平滑筋肉腫の比較では 2 個のプロモータがリストアップされた。多型平滑筋肉腫の方が通常型平滑筋肉腫よりも悪性度が高いことから悪性度（形態学的な異型性にかかわるものを含む）に関わる遺伝子がリストアップされた可能性が考えられる。また、高悪性度粘液線維肉腫と多型平滑筋肉腫の比較では 115 個のプロモータがリストアップされた。筋原性への分化に関わる遺伝子がリストアップされた可能性が考えられる。

2. 骨肉腫の解析

順天堂大学で保有している骨肉腫 6 細胞株（含む 2 つは抗がん剤：アドリアマイシン耐性）について解析を行った。骨肉腫 6 細胞株について CAGE 解析を行い、転写開始点・プロモータ・エンハンサの網羅的遺伝子発現プロファイリングを行った。いずれも triplicate で解析を行った。解析においては、非抗がん剤耐性株 4 例と抗がん剤耐性（アドリアマイシン耐性）株 2 例との比較などを進め、骨肉腫の悪性因子及び抗がん剤耐因子の同定を進めた。1）の結果として unsupervised のクリスタリング解析に添付図のように細胞株に一致した分類となった。supervised で非抗がん剤耐性株 4 例と抗がん剤耐性の比較で約 60 のプロモータで差を認めた（図 2）。

考　察

軟部肉腫の解析：現在までに報告されている cDNA マイクロアレイ解析の軟部肉腫組織分け結果は、我々の CAGE 解析の unsupervised 解析と同様の傾向を示しており［6～7］、その解析の方向性が正しいことが示唆された。今後、検証セットして更に紡錘型軟部肉腫の CAGE 解析を行い、探索セット解析において同定されたその因子候補を絞り込む。その同定された発現に関しては q-PCR、western-blot、免疫染色の手法を用い大規模検証検体でそのバイオマーカーとしての能力検証を行う。更には細胞系を用いた遺伝子導入実験によりその発がん性、悪性度、阻害剤効果の *in vitro*、*in vivo* 機能解析を進める。以上の解析を進め軟部肉腫の組織分類因子及びがん化・悪性度因子の解明を試みる。

骨肉腫の解析：骨肉腫細胞株において非抗がん剤耐性株と抗がん剤耐性株の比較において多くの有意に差を認めるプロモータの同定に成功している。特に gene A、gene B、gene C など、薬剤蓄積能や細胞増殖、転移能に関する遺伝子のプロモータに変動を認めた。これらのプロモータは、過去の文献でも同定されていないものであった［8～10］。今後、比較プロファイルイングにおいて同定されたその因子候補を絞り込む。その同定された発現に関しては q-PCR、western-blot、免疫染色の手法を用い骨肉腫手術検体における発現検証を行い、その因子で予後や化学療法奏効性と相関が認めるかの確認を進める。更には細胞系を用いた遺伝子導入・抑制実験により、その発がん性、悪性度、阻害剤効果の *in vitro*、*in vivo* 機能解析を進める。以上の解析を進め骨肉腫のがん化・悪性度因子や薬剤抵抗性の解明を試みる。

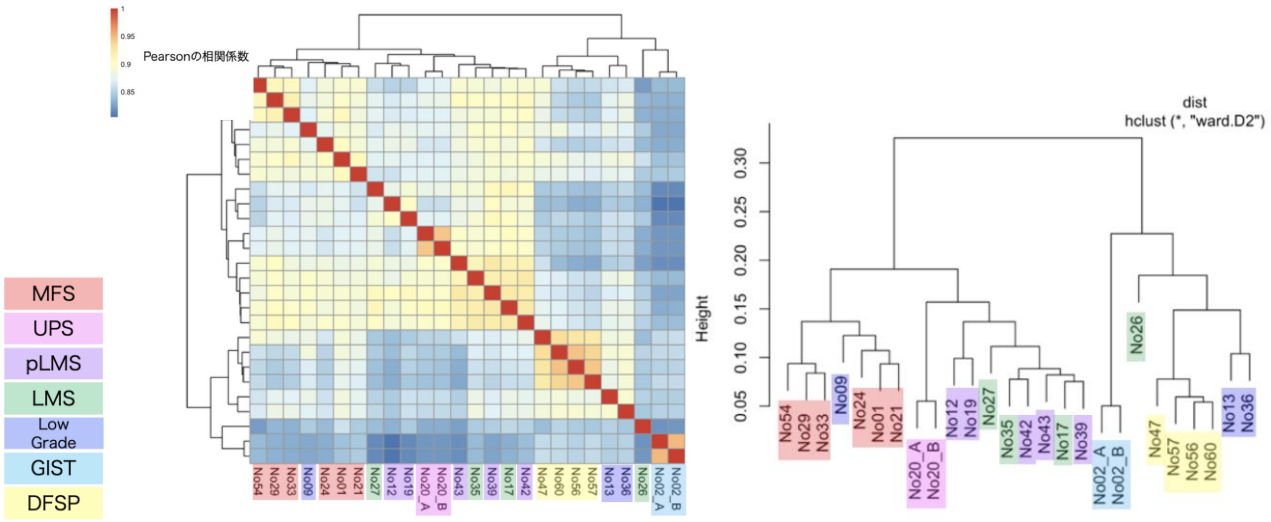


図 1. 紡錘形軟部肉腫における 99,602 個の FANTOM5 プロモータによるクラスタリング

紡錘形軟部肉腫 24 例に関してプロモータレベルでクラスタリング施行。大まかに染色体転座を有する肉腫（GIST、DFSP、LGFMS）と染色体転座の報告がない肉腫（HGMFS、UPS、LMS、pLMS）に分類され、遺伝子レベルでも病理診断と同様の傾向を認めた。

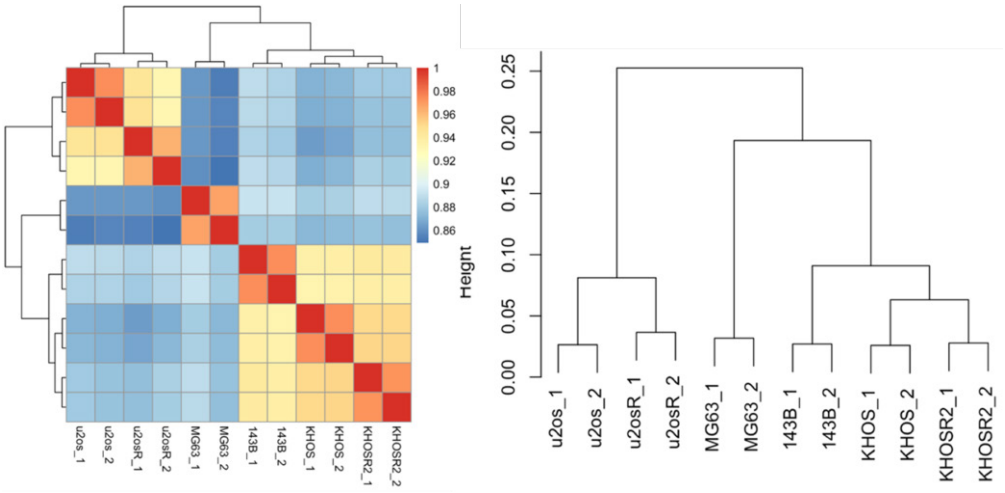


図 2. 骨肉腫細胞株における 99,602 個の FANTOM5 プロモータによるクラスタリング

骨肉腫 6 細胞株に関してプロモータレベルでクラスタリング施行。

クリスタリング解析は細胞株に一致した分類となった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、順天堂大学整形外科教室准教授の末原義之先生、医員の佐野圭先生、医員の佐々慶太先生、医員の栗原大聖先生、順天堂大学人体病理教室准教授の林大久生先生、准教授の齋藤剛先生、理化学研究所科技ハブ産連本部バトンゾーン研究推進プログラムの村川泰裕先生である。

文 献

1) Fletcher CD, Hogendoorn P, Mertens F, Bridge J. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2013.
2) Zehir A, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. Nat Med. 2017 Jun;23(6):703-713. PMID: 28481359
3) Suehara Y, et al. Clinical Genomic Sequencing of Pediatric and Adult Osteosarcoma Reveals Distinct Molecular Subsets with Potentially Targetable Alterations. Clin Cancer Res. 2019 Nov 1;25(21):6346-6356. PMID: 31175097
4) Takamochi K, et al. Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. BMC Cancer. 2016 Sep 29;16(1):760. PMID: 27681076
5) Yoshida E, et al.Promoter-level transcriptome in primary lesions of endometrial cancer identified biomarkers associated with lymph node metastasis.Sci Rep. 2017 Oct 26;7(1):14160. PMID: 29074988
6) Nakayama R et al. Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma. Mod Pathol. 2007 Jul;20(7):749-59. PMID: 17464315
7) Nielsen TO et al. Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. Lancet. 2002 Apr 13;359(9314):1301-7. PMID: 11965276
8) Mintz MB, et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. Cancer Res. 2005, 65: 1748-1754. 10.1158/0008-5472.CAN-04-2463. PMID: 15753370
9) Ochi K, et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma by gene-expression profiles. Int J Oncol. 2004, 24: 647-655. PMID: 14767549
10) Wang S, et al. Up-regulation of PCOLCE by TWIST1 promotes metastasis in Osteosarcoma. Theranostics. 2019 Jun 9;9(15):4342-4353. doi: 10.7150/thno.34090. eCollection 2019.PMID: 31285765