



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト滑膜肉腫におけるmicroRNAの機能解析
Author(s)	三浪, 友輔
Description	配架番号 : 2172
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11690号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11690
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58791
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Minami.pdf



学 位 論 文

ヒト滑膜肉腫における microRNA の
機能解析

(Analysis of microRNAs in human
synovial sarcoma)

2 0 1 5 年 3 月

北 海 道 大 学

三 浪 友 輔

学 位 論 文

ヒト滑膜肉腫における microRNA の
機能解析

(Analysis of microRNAs in human
synovial sarcoma)

2 0 1 5 年 3 月

北 海 道 大 学

三 浪 友 輔

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	1 3 頁
考察	3 2 頁
総括および結論	3 7 頁
謝辞	3 8 頁
引用文献	3 9 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Minami Y, Kohsaka S, Tsuda M, Yachi K, Hatori N, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Minami A, Iwasaki N, Tanaka S. SS18-SSX-regulated miR-17 promotes tumor growth of synovial sarcoma by inhibiting p21WAF1/CIP1. Cancer Sci. 105, 1152-1159 (2014).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yusuke Minami, Masumi Tsuda, Norimasa Iwasaki, Shinya Tanaka. MicroRNA miR-17 promotes tumor growth of synovial sarcoma by inhibiting p21WAF1/CIP1.

第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日

横浜市パシフィコ横浜

2. 三浪友輔、高阪真路、津田真寿美、田中伸哉、岩崎倫政
miR-17 は p21 を標的としヒト滑膜肉腫の細胞増殖能や腫瘍形成能を亢進させる

第 28 回日本整形外科基礎学術集会、2013 年 10 月 18 日

千葉幕張メッセ

3. Yusuke Minami, Masumi Tsuda, Shinji Kohsaka, Akio Minami, Shinya Tanaka, Norimasa Iwasaki. MicroRNA miR-17 promotes tumor growth of synovial sarcoma by inhibiting p21WAF1/CIP1.

Orthopaedic Research Society 2014 Annual Meeting, March 15, 2014

New Orleans, USA

4. 三浪友輔、津田真寿美、高阪真路、田中伸哉、岩崎倫政
ヒト滑膜肉腫の腫瘍形成能亢進における miR-326 の機能解析

第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2014 年 7 月 18 日

大阪府大阪国際会議場

5. 三浪友輔、津田真寿美、高阪真路、田中伸哉、岩崎倫政
ヒト滑膜肉腫の腫瘍形成能亢進における miR-326 の機能解析

第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 26 日
横浜市パシフィコ横浜

6. 三浪友輔、津田真寿美、高阪真路、田中伸哉、岩崎倫政
ヒト滑膜肉腫の腫瘍形成能亢進における miR-326 の機能解析
第 29 回日本整形外科学会基礎学術総会、2014 年 10 月 10 日
鹿児島市城山観光ホテル

緒言

MicroRNA は 1993 年にヒト線虫で発見され、当初は stRNA(=short temporal RNA)と呼ばれ、線虫特有の RNA と考えられた¹。MicroRNA という概念自体は 2001 年に初めて提唱され、その後、ヒトを含む動物や植物に幅広く存在している事が明らかとなった^{2,3}。MicroRNA は、mRNA のように蛋白に翻訳されない、つまり蛋白をコードしない 18-24 塩基の非常に小さな RNA であり、核内で RNA ポリメラーゼにより転写され、pri-miRNA、pre-miRNA とプロセッシングを受けたあと、核外に輸送される。Dicer によるプロセッシングを受け、mature-miRNA となる。最終的に、RISC 複合体を形成し、標的の mRNA の 3'-UTR をターゲットとし、転写後の蛋白合成を制御し、増殖、アポトーシスなどの細胞機能を調節する^{4,5}。現在までに、上皮性、非上皮性、血液系腫瘍を含む様々ながん種で microRNA の発現亢進や低下が報告されており、がん細胞の増殖、アポトーシス、転移などの細胞機能に重要な機能を担っていると考えられている⁶⁻⁸。また、このようながんの機能に関与する microRNA を一般的にがん関連 microRNA(=oncomiR)と呼んでいる。

滑膜肉腫は軟部肉腫の約 8%を占める腫瘍である。好発年齢は青壮年期であり、四肢関節近傍に好発する⁹。現在の治療は、腫瘍広範切除を原則としており、ドキソルビシン、イフォスファミドの 2 剤を中心とした手術前後の補助化学療法や放射線療法を併用して行うが、肺転移が生じやすい事などから、5 年生存率は約 60%、10 年生存率は約 30%程度と予後不良であり、より治療効果の大きい治療が必要であると考えられる^{10,11}。またほぼ全例に、18 番染色体と X 染色体の相互転座によって生じるキメラ融合遺伝子 SS18-SSX を認めるのが特徴である^{12,13}。組織学的には二相型、単相性線維型そして低分化型の亜型がある。現在までに、滑膜肉腫における microRNA についての報告は、我々が渉猟し得る限りでは過去に 2 報、報告されている。1 報は滑膜肉腫において microRNA の発現パターンを検討したという報告¹⁴、もう 1 報は microRNA183 が、がん抑制遺伝子である EGR1 をターゲットとし、がん細胞の cell migration を促進するという報告である¹⁵。前述のように microRNA は様々ながん種において、増殖、アポトーシスなどの基本的な細胞機能を制御していると報告されており、その機能の詳細を明らかにする事は、がん治療における新規治療法の開発に貢献する可能性がある。本年 2014 年より、microRNA によるがんの診断システムの開発を目的として、本邦では国立がん研究センター中央病院において肉腫を含む 13 種類のがんで

の臨床研究が開始された。具体的には1回の採血で、がんの診断、抗がん剤の感受性、転移の進行の程度等の病態に関する診断マーカーとして microRNA を利用する研究プロジェクトが始動し、現在進行中である。しかしながら、滑膜肉腫という肉腫におけるがん関連 microRNA の発現及びその機能の詳細の多くは未だ不明であり、一刻も早い microRNA の機能詳細の解明が待たれるところである。

そこで本研究では、滑膜肉腫のがん細胞機能を制御する microRNA およびその標的分子、メカニズムを同定し、最終的に臨床応用を検討する目的で、滑膜肉腫における microRNA の機能の解明に向けた研究を開始した。まず、現在までに判明している約 140 種類の oncomiR を含む lentivirus である Oncomir Precursor Virus Library (System Bioscience, Mountain View, CA, USA) を用い、滑膜肉腫細胞株である SYO-1、Fuji、HS-SYII の3つの細胞株に感染させ、oncomiR 細胞株を樹立した。樹立した細胞で、*in vitro* でのコロニー形成能をそれぞれ control 細胞株と比較したところ、Fuji 細胞で著明にコロニー形成能が上昇する事が明らかとなった。この Fuji 細胞のコロニーから RNA を抽出し、シーケンス解析を行ったところ、miR-17-5p が同定された。続いて、同様のシステムを用いて樹立した HS-SYII oncomiR 細胞をヌードマウスの皮下に接種させ、形成された腫瘍を、接着、培養し、RNA を抽出した。半定量的 RT-PCR を行い、シーケンス解析を行ったところ、miR-326 が同定された。

miR-17-92 クラスターは13番染色体に位置し、全部で7つの miR(miR-17-5、miR-17-3p、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b、miR-92-1)をエンコードしており、今回同定された miR17-5p はこのうちの1つである¹⁶。miR-17-92 クラスター全体の報告は過去に diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)等の血液系腫瘍、膠芽腫、非小細胞性肺細胞がん、膀胱がん、扁平細胞がん、悪性線維性組織球腫、胞巣型横紋筋肉腫、脂肪肉腫、大腸がんなどで報告されている¹⁷⁻¹⁹。例えば He らは B 細胞リンパ腫のマウスモデルを用いて、miR-17-92 クラスターを過剰発現する事で、c-Myc と共同してがん遺伝子として機能する事を示した²⁰。しかしながら、滑膜肉腫における miR-17-5-p の報告は現在までに報告されていない。miR-17 に関する骨肉腫での過去の報告としては、miR-17-92 クラスターにエンコードされる miR-20a が Fas の発現を制御する事により、骨肉腫の転移を促進するという報告²¹、また骨肉腫において microRNA の発現を解析したところ miR-17-92 クラスターの発現が上昇していたとの報告²²の2報が過去に報告されている。

本研究を進める過程で、この miR-17 が滑膜肉腫において *in vitro* での細胞

増殖能、コロニー形成能や *in vivo* での腫瘍形成能を亢進させる方向に働く事が明らかとなり、且つ、miR-17 の直接のターゲットとして p21(CDKN1A) 分子を同定した。本研究の前半部分ではこの miR-17 を中心とした研究について報告する。

miR-326 に関しては、滑膜肉腫を含む肉腫での報告は現在までに報告されていないが、他に下垂体腫瘍、神経系腫瘍、血液系腫瘍等で過去に幾つか報告がされている²³⁻²⁷。神経膠腫において、miR-326 が NOB-1(Nin one binding protein)を直接標的として、腫瘍抑制遺伝子として機能するとの報告や²⁸、miR-326 が膠芽腫において発現が抑制されており、臨床学的予後予測因子として有用であるとの報告がある²⁹。

ヒト滑膜肉腫において miR-326 の機能の詳細はほぼ不明であり、その機能の詳細を明らかにする事は、滑膜肉腫における新規生物学的マーカーや新規治療の開発に貢献する可能性を秘めている。そこで我々は miR-326 に関する滑膜肉腫細胞での研究を進めたところ、miR-326 を過剰発現させる事で、滑膜肉腫細胞株の細胞増殖能、コロニー形成能が *in vitro* で上昇し、かつ *in vivo* においてもマウス生体内での腫瘍形成能が上昇する事が明らかになった。本研究の後半部分では、この miR-326 を中心とした研究について報告する。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AIB1: amplified in breast cancer 1

BAF: brm-associated factor

BJ: beijing

CMV: cytomegalovirus

CDKN1A: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

CRK: CT10 regulator of kinase

CTGF: connective tissue growth factor

DXR: doxorubicin

DOCK180: downstream of CRK 180 kDa protein

EGR-1: early growth response protein 1

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FBS: fetal bovine serum

FNCLCC: Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer

GLI1: glioma-associated oncogene 1

H&E: hematoxylin & Eosin

miR: microRNA

miRNAs: microRNAs

PCR: polymerase chain reaction

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PKM2: pyruvate kinase M2

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SMO: smoothened

UTR: 3'-untranslated region

実験方法

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した。
ヒトの外科切除組織検体の c-DNA については、北海道がんセンターの倫理
審査委員会の承認を得て、提供して頂いた。

1) 滑膜肉腫細胞株、細胞培養

ヒト滑膜肉腫細胞株 Fuji (Nojima et al., 1990) を I 型コラーゲンコート培養
皿(旭テクノグラス社)で 10% 牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS, Sigma 社)
および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma 社)含有 Roswell Park
Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Sigma 社)で培養した。他のヒト滑膜
肉腫細胞株 SYO-1 (Kawai et al., 2004)、HS-SY II (Sonobe et al., 1992)、ヒト
胎児由来腎上皮細胞である 293T 細胞、ヒト線維芽細胞である BJ/t 細胞は
Nunclon Δ Surface (Nunc 社)で 10% FBS およびペニシリン-ストレプト
マイシン含有ダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's
medium, DMEM) (Sigma 社)で培養した。細胞培養は摂氏 37 度、5% CO₂ の
湿潤環境下で行なった。このうち Fuji 細胞はがん融合キメラ遺伝子である
SS18-SSX2 を、一方で HS-SYII 細胞は SS18-SSX1 を有していた。

2) 細胞増殖能実験

細胞増殖能実験は、直径 60 mm の培養皿 1 枚あたり Fuji 細胞は 5×10^4 個、
SYO-1 細胞は 5×10^4 個、HS-SYII 細胞は 1.0×10^5 個播種し、培養した。48 時
間毎に新鮮な培地に交換し、播種後、1、3、5 日目に Trypsin-EDTA 溶液 (2.5
g/l porcine trypsin、0.2 g/l EDTA 含有)(Sigma 社)で細胞を剥離し、
Countess(Invitrogen 社)を用いて細胞数を計測した。

miR-17 阻害剤 (miRCURY LNATM microRNA inhibitors, hsa-miR-17,
410087-00, EXIQON, Vedbaek, Denmark)を用いる際は、Fuji 細胞および
HS-SYII 細胞へのトランスフェクション後 4 日目で、同様の手順で細胞数を
計測し、コントロール細胞と比較した。

3) コロニー形成能実験

いずれも直径 60 mm 培養皿を用いた。上層は 0.3% agar (Bacto™ Agar, BD
Biosciences, San Jose, CA, USA)含む medium を使用し、Fuji 細胞は 5.0×10^4
個、SYO-1 細胞は 5.0×10^4 個、HS-SYII 細胞は 2.0×10^5 個の細胞を均一に混

濁した。下層は 0.6% agar を用いた。播種後、4 週間後に、長径 100 μm , 長径 100~250 μm , 長径 250 μm 以上のコロニーの個数を、倒立型ルーチン顕微鏡 CKX41 (オリンパス社) と顕微鏡用デジタルカメラ DP20 (オリンパス社) で観察・撮像した。各サンプルとも、3 枚の培養皿を用いて、コロニー数を測定し、その平均と標準偏差を計算した。

4) 創治癒能試験

Fuji 細胞と HS-SYII を直径 60 mm の培養皿 1 枚あたり 5×10^4 個播種した。コンフルエントになった際に、P200 マイクロピペットチップの先端で創傷を入れ、Fuji 細胞では 13、18、27 時間後、HS-SYII 細胞では 18、27、42、48 時間後の像を IX-71 倒立型リサーチ顕微鏡(オリンパス社)、Cool SNAP HQ 冷却 charge-coupled device (CCD) カメラ(Photometrics 社)を用いて撮影した。撮影後に治癒最先端部の距離を計測し、各サンプルの 3 か所でこの距離を計測し、その平均と標準偏差を算出した。

5) 細胞浸潤能試験

BD Matrigel Invasion Chamber, 8.0 μm polyethylene terephthalate (PET) Membrane 24-well Cell Culture Inserts (BD Biosciences 社)を用いた。Fuji 細胞と HS-SYII 細胞 5×10^4 個を、前者は RPMI 1640 500 μl 、後者は DMEM 500 μl に懸濁した。Matrigel Invasion Chamber のインサート(上槽)に細胞懸濁液、ウェル(下槽)に走化性因子として 50 ng/ml HGF を含有する前者は RPMI 1640 750 μl 、後者は DMEM 750 μl を入れ、48 時間培養した。インサートの膜上面に残存した細胞を綿棒を用いて除去し、膜下面に浸潤した細胞を 3% パラホルムアルデヒドで固定後、0.2% グラムクリスタル紫染色液で染色し、倒立型ルーチン顕微鏡 CKX41 (オリンパス社) と顕微鏡用デジタルカメラ DP20 (オリンパス社) で観察・撮像した。各サンプルの 5 視野で浸潤した細胞数を測定し、その平均と標準偏差を計算した。

6) 発現ベクターおよび遺伝子導入法

細胞株への導入は、FuGENE HD トランスフェクション試薬(Roche 社)を用い、添付文書に記載の方法に従って行なった。

miR-17 過剰発現細胞及び miR-326 過剰発現細胞は BLOCK-iT HiPerform Lentiviral PolIII miR RNAi Expression System with EmGFP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を添付文書に記載の方法に従って樹立した。

7) プラスミド、抗体及び抗がん剤等

本実験で使用した抗体は以下の通りである。 Anti-p21WAF1/CIP1 (Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-phospho-Akt S473 (Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-phospho-ERK1/2 (Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-cyclin D1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), actin (I-19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-Ki-67 (clone: MIB1) (DAKO, Glostrup, Denmark), anti-p53 (DAKO, Glostrup, Denmark)。本実験で使用した抗がん剤は Doxorubicin hydrochloride (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)である。

8) RNA 抽出および逆転写反応

培養細胞の場合は、培養液を除去し PBS で 2 回洗浄した後、6 μ l の 2-mercaptoethanol を添加した 600 μ l の Buffer RLT (QIAGEN 社)を添加し、cell lifter (Fisher 社)を用いて細胞可溶化液を回収し、1 分間室温で攪拌した。また、ゼノグラフトの場合はヌードマウスから摘出した腫瘍を、さらにハサミとマイクロトームで細切した。6 μ l の 2-mercaptoethanol を添加した 600 μ l の Buffer RLT (QIAGEN 社)で腫瘍組織片を溶解した後、組織をさらに細断するため QIAshredder (QIAGEN 社)に移し 15,000 回転/分 (20,400 $\times$ g)、4°C で 3 分間遠心し、濾液を再度 15,000 回転/分 (20,400 $\times$ g)で 4°C、3 分間遠心し上清を回収した。いずれの場合にも、600 μ l の可溶化液に 600 μ l の 70%エタノールを加え、ピペッティングで混和した後 RNeasy Mini Kit(QIAGEN 社)付属のミニカラムを用い、添付されているプロトコルに従って、RNA を抽出した。RNA の濃度を NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (エル・エム・エス社)で測定した。2 μ g 相当の RNA を、全量 20 μ l として SuperScript VILO (invitrogen 社)を用いた逆転写反応(reverse transcription, RT)を添加のプロトコルに従って行い、cDNA を得た。

また、miR-17 の内因性発現を調べるために、北海道がんセンターより寄贈して頂いたヒトの外科的切除組織検体の c-DNA を 7 検体使用した。

9) 半定量的 RT-PCR および定量的 PCR

半定量的 RT-PCR では上記で得られた 1 μ l 鋳型 cDNA、0.6 μ M 順方向プライマー、0.6 μ M 逆方向プライマー、2.5 μ l 10 $\times$ Ex Taq Buffer、0.2 mM dNTP Mixture (Takara 社)、0.05 U ExTaq (Takara 社) (反応液の全量: 25 μ l) を用いて、変性温度 94°C(30 秒)、アニーリング(30 秒)、伸長温度 72°C(30 秒)を 1 サイクルとし、サンプルと標的遺伝子により 25~30 サイクルの反応を行なった。

アニーリング温度は 55℃-60℃とした。PCR 終了後、0.5 µg/ml 臭化エチジウム(EtBr)を添加した 2%アガロースゲルで 15 分間電気泳動し、Printgraph (ATTO 社)で検出、撮像した。

定量 PCR では鋳型 cDNA、0.9 µM 順方向プライマー、0.9 µM 逆方向プライマー、10 µl Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem 社)を混合し(反応液の全量: 20 µl)、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystem 社)で変性温度 96℃、アニーリング温度 62℃を 1 サイクルとし、40 サイクルの反応を行った。最後にメルティングカーブを作成し、非特異増幅の有無を確認した。結果はそれぞれのサンプル中の GAPDH の発現量を用いて標準化した。

10) プライマー

滑膜肉腫における oncomiR 同定の際の RNA 抽出には Oncomir Precursor Library primer (System Bioscience)を用いた。また、半定量式 RT-PCR あるいは定量式 PCR のプライマーとして以下を用いた。

miR-17 (Forward 5'-GCCGGCGTCAGAATAATGTCAAAGTGC-3',

Reverse 5'- CACCATAATGCTACAAGTGCCTTCACTGC-3'),

miR-326 (Forward 5'-CATCTGTCTGTTGGGCTGGA-3',

Reverse 5'-AGGAAGGGCCCAGAGGCG-3'),

p21 (Forward 5'-GCCCAGTGGACAGCGAGCAG,

Reverse 5'-GCCGGCGTTTGGAGTGGTAGA)

SS18-SSX2 (Forward 5'-CAACAGCAAGATGCATACCA,

Reverse 5'-TTTTGGGTCCAGATCTCTCGTG)

GAPDH (Forward 5'-CTCATGACCACAGTCCATGC,

Reverse 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT)

11) ヒト滑膜肉腫の腫瘍形成能に関与する microRNA の同定

Oncomir Precursor Virus Library (System Bioscience, Mountain View, CA, USA) を SYO-1 細胞、Fuji 細胞、HS-SYII 細胞に感染させ、oncomiR 細胞を樹立した。樹立した細胞を使用し、上述の手順でコロニー形成実験を行った。Fuji oncomiR 細胞で、コントロール細胞と比較して著明に大きなコロニーが形成される事が明らかとなり、この Fuji oncomiR 細胞のコロニーから上述の手順で RNA を抽出し、半定量式 RT-PCR を施行し、シーケンス解析を行った。

続いて、HS-SYII oncomiR 細胞を、12)で後述する異種移植片モデルの方

法に従って 5.0×10^6 個ヌードマウスの腹部皮下に接種したところ、ヌードマウスの皮下に腫瘍を形成し、この腫瘍から RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR を行い、シーケンス解析を行った。

12) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

p21-3'UTR の RNA は BJ/t 細胞より半定量的 RT-PCR 法を用いて抽出し、cDNA を作製した。p21-3'UTR は pGL3-promoter luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI, USA)を用いて、firefly luciferase 遺伝子の下流にクローニングした。上記 vector および miR-17 過剰発現 vector もしくはコントロール vector を、Fuji 細胞を 35 mm 培養皿に 1.0×10^5 個播種後に、共トランスフェクションした。トランスフェクションには Eugene HD transfection reagent (Roche)を使用した。Renilla luciferase plasmid pRL-CMV (Promega)をトランスフェクション効率の標準化として用いた。トランスフェクション後 48 時間でルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。最初に培養細胞から増殖培地を除去し、十分量の PBS を穏やかに添加して、培養容器の内側表面を洗浄した。続いて、Passive Lysis Buffer (Promega)を 500 μ l 添加し、氷上に培養皿を置いた条件下でよく攪拌し、細胞を溶解した。集まったライセートを数回ピペッティングし、均質な懸濁液とし、1.5ml チューブに移した。必要な本数のルミノメーター用チューブを用意し、添付文書に従って調整した 100 μ l の LAR II をあらかじめ分注した。ルミノメーター用チューブにライセートを 20 μ l 注入し、穏やかにピペッティングした後、ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。次に、添付文書に従って調整した Stop & Glo Reagent 100 μ l を注入し、再度ルシフェラーゼ活性を測定した。結果はサンプル毎に 5 回測定し、その平均と標準偏差を計算した。

13) 異種移植片モデル

6 週齢雌のヌードマウス (BALB/cA Jc1 nu/nu; 日本クレア社)6 匹または 9 匹の皮下に、マウス 1 匹あたり 5.0×10^6 個の miR-17 過剰発現 Fuji 細胞、 4.0×10^6 個の miR-326 過剰発現 SYO-1 細胞、 4.0×10^6 個の miR-326 過剰発現 SYO-1 細胞をそれぞれのコントロール細胞共に、それぞれ懸濁した 400 μ l の PBS を左右脇腹皮下に接種した。順に接種 50 日、27 日、51 日後に安楽死後に腫瘍を摘出し、重量測定の後、後述する病理学的検索に付した。また、皮下接種後 7 日以降に週 2 回体表から長径(a) (mm) 、短径(b) (mm)を測定し、腫瘍体積(V)(mm^3)を以下の式で求めた: $V = 1/2 \times a \times b^2$ 。いずれの計測値も平均、標準偏差を算出した。実験動物の取り扱いには北海道大学動物実験に関する規

定に従い、本学医学研究科附属動物実験施設において実施した。

14) 病理組織学的検討

マウスから摘出した腫瘍を常法に基づきホルマリン固定、パラフィン包埋し、厚さ 4 μm に薄切した後、ヘマトキシリンエオジン(hematoxylin-eosin、HE)染色を行い、腫瘍組織像の病理学的解析を行なった。抗 Ki-67 抗体を用いて streptavidin-biotin (SAB)法で組織を染色した。光学顕微鏡で観察して 5 視野における陽性率を計算し、その平均を算出した。抗 p21 抗体を用いて、上記と同様の方法で細胞核を染色した標本を用い、p21 陽性細胞をそれぞれ 5 視野で計測し、陽性細胞数の平均と標準偏差を算出した。組織学的悪性度の評価は軟部悪性腫瘍に世界的に広く用いられている FNCLCC grading system を用いた。FNCLCC grading system において、悪性度は組織型、核分裂数、壊死の有無の 3 つのパラメータによるスコアの和で決定される。^{30,31}。

15) マイクロアレイ解析

SYO-1 細胞、Fuji 細胞、HS-SY 細胞の miR-326 過剰発現細胞とそれぞれのコントロール細胞の RNA を 7)と同様の手順で RNA を採取した。まずターゲット作製のため、Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color(アジレント・テクノロジー社)を用いて、添付文書に従い、オリゴ dT に T7 プロモーターを付加したプライマーを用いて RNA の逆転写反応を行い Double-Stranded cDNA を合成した。その後に T7 RNA ポリメラーゼによる IVT で Cy3 標識 cRNA を合成した。続いて、ハイブリダイゼーションおよび洗浄を行った。Gene Expression Hybridization Kit(アジレント・テクノロジー社)と Gene Expression Wash Buffers Pack(アジレント・テクノロジー社)の添付文書に従って、Cy3 標識 cRNA を断片化し、Agilent Expression Array にハイブリダイゼーションし、洗浄した。その後、DNA マイクロアレイスキャナ(Agilent DNA Microarray Scanner (G2565CA))で画像を取得した。最後に専用解析ソフト (Feature Extraction) で QC Report、数値化データを算出した。

16) 統計学的検討

本実験の全てのデータは 3 回の実験によって求められた平均値と standard deviations(S.D.)によるものであり、同比較対象の t 検定によって統計学的に検討された。P value が 0.05 を下回る際に有意差があるものとした。

実験結果

【ヒト滑膜肉腫におけるがん融合キメラ遺伝子 SS18-SSX は miR-17 の発現を亢進し、miR-17 は滑膜肉腫の oncogene として機能する】

滑膜肉腫における腫瘍形成能を促進する microRNA を同定するために、がん関連 miRNA library によるスクリーニングを施行した。すなわち、Oncomir Precursor Virus Library を 3 つの滑膜肉腫細胞株である SYO-1、Fuji、HS-SYII に感染させ、樹立した oncomiR 細胞で colony formation assay を行ったところ(図 1A)、Fuji oncomiR 細胞でコントロール細胞と比較して、著明に大きなコロニーを形成する事が明らかになった(図 1B)。

Fuji oncomiR 細胞のコロニーの中で、特に大きな 2 つのコロニーから RNA を抽出し、Oncomir Precursor Library Primer を用いた半定量的 RT-PCR を施行し、シーケンス解析を行ったところ、miR-17-5p が同定された(図 1C)。miR-17-92 cluster は 13 番染色体に位置し、6 つの成熟 microRNA をエンコードしており、miR-17-5p はその 1 つであった(図 1D)。

miR-17 は我々が所持していたヒト滑膜肉腫の外科的切除組織検体及び 3 つの滑膜肉腫細胞株で、発現の程度の差はあるものの、内因性に発現を認めていた(図 2A)。更に、Fuji 細胞において SS18-SSX2 を過剰発現させると、内因性 miR-17 の発現が上昇する事が明らかとなった(図 2B)。また一方で、siRNA を用いて、SS18-SSX2 の発現を抑制させる事で、siRNA の濃度依存性に miR-17 の発現を抑制する事が明らかとなった(図 2C)。以上の結果から、Fuji 細胞において、SS18-SSX2 が miR-17 の発現を調節している可能性が示唆された。また、3 つの滑膜肉腫細胞株と比較して、ヒト滑膜肉腫の外科的切除組織検体において、内因性の miR-17 の発現は著明に亢進しており、腫瘍の微小環境が miR-17 の誘導に関与している可能性も示唆された(図 2D)。

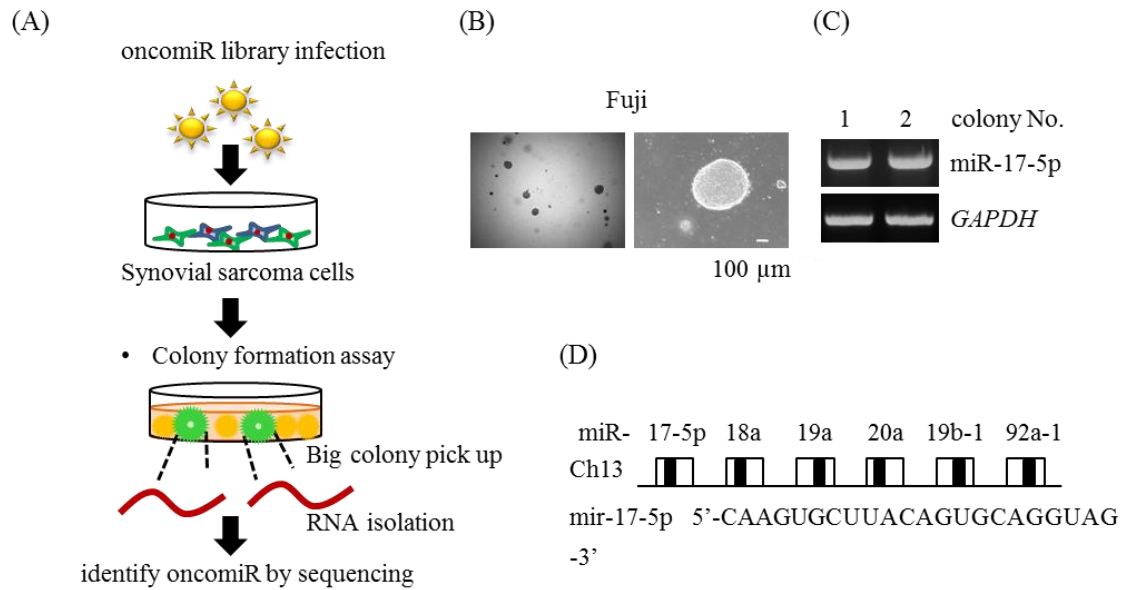


図 1 A-D

A: Oncomir Precursor Virus Library を滑膜肉腫細胞株に感染させ、oncomiR 細胞を樹立した。樹立した oncomiR 細胞で colony formation assay を行い、Fuji oncomiR 細胞のコロニーから RNA を抽出し、シーケンシングを行った。

B: Fuji oncomiR 細胞はコントロール細胞と比較して、著明に大きなコロニーを形成した。

C: 半定量的 RT-PCR を施行し、シーケンス解析を行ったところ、miR-17-5p が同定された。

D: miR-17-92 cluster は 13 番染色体に位置し、6 つの成熟 microRNA をエンコードし、miR-17-5p はそのうちの 1 つであった。

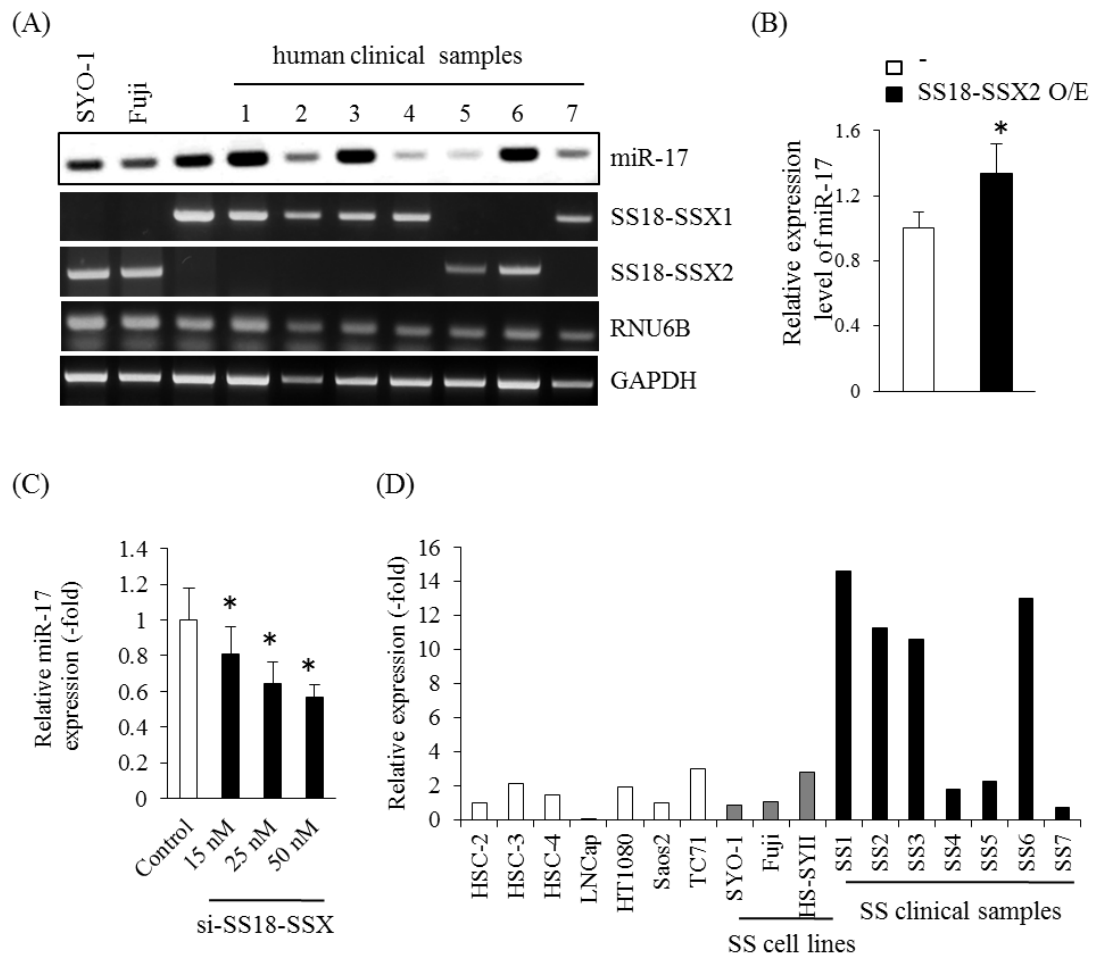


図 2 A-D

A: ヒト滑膜肉腫の外科切除組織検体及び3つの滑膜肉腫細胞株で、miR-17は内因性に発現していた。

B: SS18-SSXを過剰発現させると、それに応じてmiR-17の発現が上昇した。

C: siRNAを用いてSS18-SSX2の発現を抑制すると、siRNAの濃度依存性にmiR-17の発現は抑制された。

D: 3つの滑膜肉腫細胞株と比較して、ヒト滑膜肉腫の外科的切除組織検体では、内因性のmiR-17の発現は著明に亢進していた。

【ヒト滑膜肉腫において、miR-17は細胞増殖能及びコロニー形成能を上昇させた】

滑膜肉腫におけるmiR-17の機能を明らかにするために、Fuji細胞、HS-SYII細胞を用いてmiR-17過剰発現細胞を樹立した(図3A)。樹立したmiR-17過剰発現細胞で細胞増殖能を検討したところ、Fuji細胞、HS-SYII

細胞にて、コントロール細胞と比較してそれぞれ 1.6 倍、4.0 倍も細胞増殖能が有意に上昇する事が明らかとなった (図 3B)。また、Fuji 細胞、HS-SYII 細胞にて、miR-17 を過剰発現する事で、コントロール細胞と比較してコロニー形成能も上昇した(図 3C)。

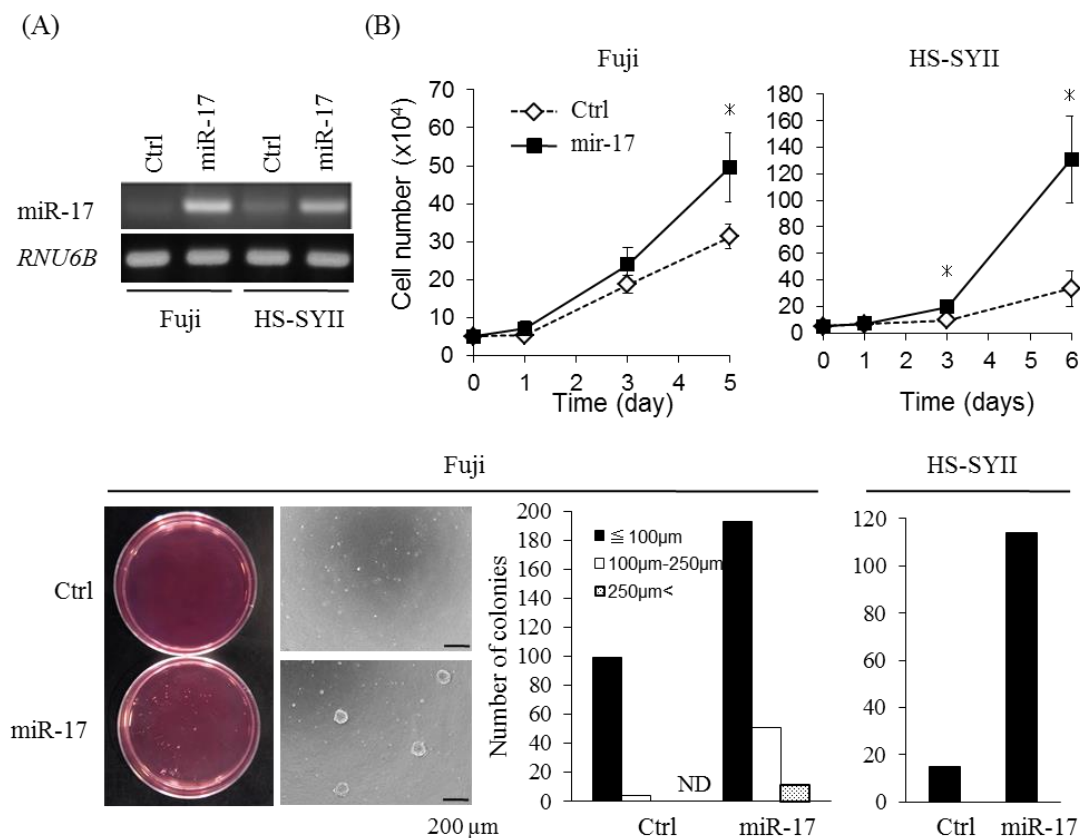


図 3 A-C

A: miR-17 過剰発現細胞を Fuji 細胞、HS-SYII 細胞で樹立した。

B: miR-17 を過剰発現させる事で、Fuji 細胞, HS-SYII 細胞にて、コントロール細胞と比較して細胞増殖能が上昇した。

C : Fuji 細胞, HS-SYII 細胞にて、miR-17 を過剰発現する事で、コントロール細胞と比較してコロニー形成能が上昇した。

以上の結果より、miR-17 は SS18-SSX1 あるいは SS18-SSX2 のがん融合キメラ遺伝子を持つ両方の滑膜肉腫細胞で、細胞増殖能及びコロニー形成能に同様の影響を与える事が示唆された。一方で、miR-17 を過剰発現させても、細胞の遊走能や浸潤能には影響を与えなかった(図 4A, B)。また細胞の形態にも影響を与えなかった(結果非表示)。

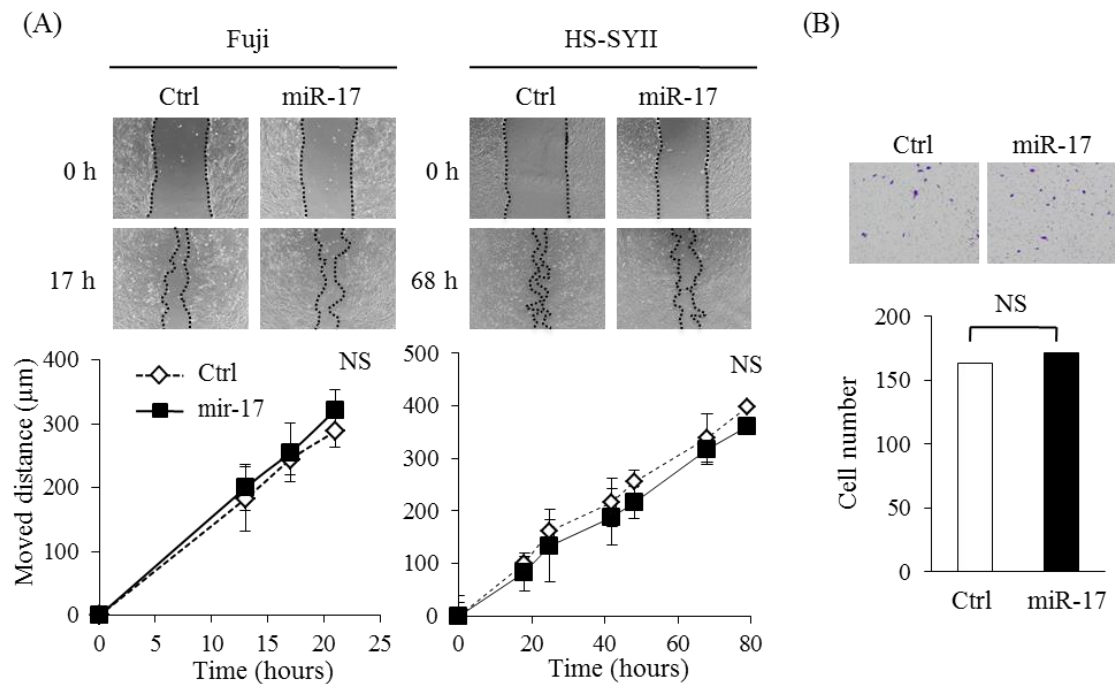
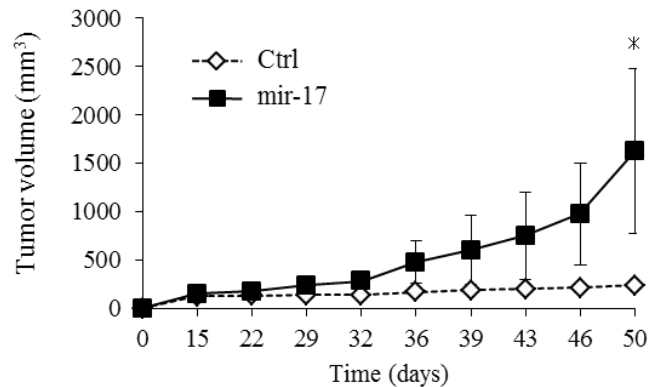


図 4A, B miR-17 を過剰発現させても、細胞の遊走能や浸潤能には影響を与えなかった。

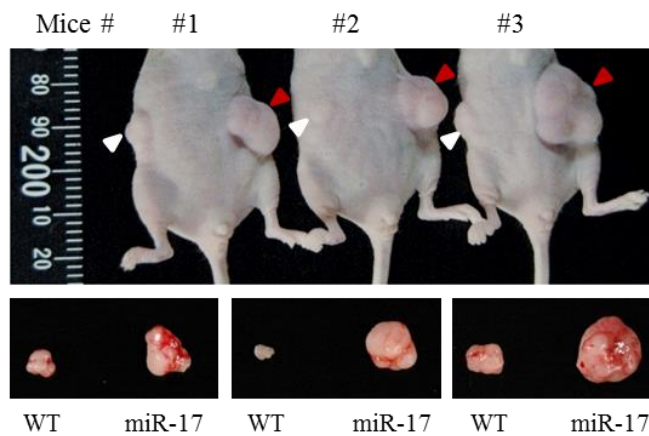
【miR-17 は *in vivo* で、ヒト滑膜肉腫における腫瘍形成能を上昇させた】

miR-17 の *in vivo* での滑膜肉腫の腫瘍形成能への影響を検討するために、miR-17 過剰発現 Fuji 細胞をコントロール細胞と共にヌードマウスに皮下接種し、形成された腫瘍の径を週 2 回測定した。接種後 20 日で、miR-17 過剰発現 Fuji 細胞は著明に大きな腫瘍を形成し、接種後 50 日には、コントロール細胞と比較して約 6.5 倍の腫瘍容積となった(図 5A, B)。また、miR-17 過剰発現 Fuji 細胞によって形成された腫瘍の平均重量は 1.4 g であり、コントロール細胞によって形成された腫瘍の平均重量は 0.2 g であった(図 5C)。これらの結果より、miR-17 は *in vivo* において、滑膜肉腫の腫瘍形成能を亢進させる事が示唆された。

(A)



(B)



(C)

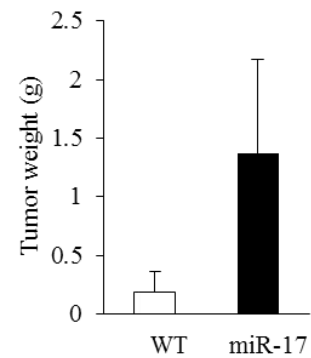


図 5 A-C

A, B: miR-17 過剰発現 Fuji 細胞を皮下接種後 20 日で、著明に大きな腫瘍を形成し、接種後 50 日には、コントロール細胞と比較して、有意に腫瘍容積が上昇した。

C: miR-17 過剰発現 Fuji 細胞によって形成された腫瘍の平均重量は、コントロール細胞によって形成された腫瘍の平均重量より大きかった。

続いて、Fuji 細胞により形成された腫瘍の病理組織学的検討を行ったところ、miR-17 を過剰発現した H&E 標本では、コントロール細胞と比較して、核分裂数の上昇や腫瘍内壊死を認めていた。更に、MIB-1 index についても、miR-17 を過剰発現すると著明に上昇する事が明らかとなった(図 6A)。逆に、p21 陽性細胞数は、miR-17 を過剰発現する事で、その数は減少する事が明らかとなった(図 6A, B)。

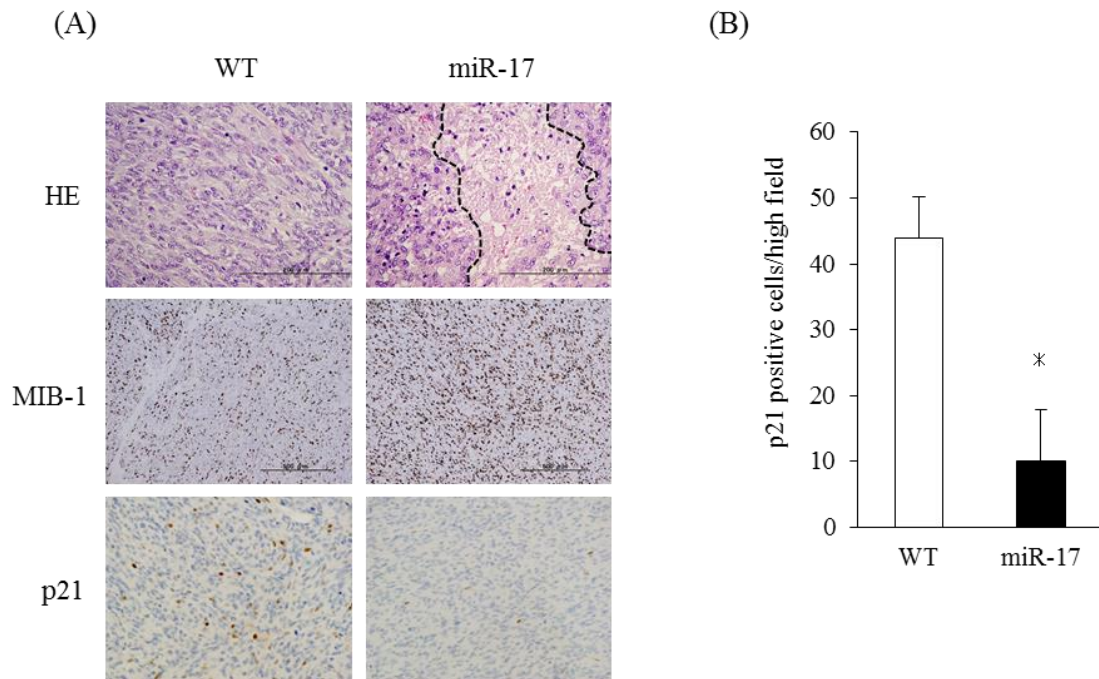


図 6A, B

A: Fuji 細胞の H&E 標本では、miR-17 を過剰発現させる事で、コントロール細胞と比較して、核分裂数の上昇や腫瘍内壊死を認め、MIB-1 index の上昇を認めた。

B: p21 陽性細胞数については、miR-17 を過剰発現する事で、その数は減少した。

【ヒト滑膜肉腫において miR-17 は p21-3'UTR を直接のターゲットとしており、更に抗がん剤への耐性を誘導した】

狩猟しうる限り、miR-17 のターゲットとして 7 つの遺伝子(E2Fs, CDKN1A (p21), BIM, Tsp1, CTGF, AIB1, Cyclin D1)が報告されており、主に細胞周期に関与している¹⁶。そこで、PicTar や Miranda という miR のターゲット遺伝子を予測するアルゴリズムを用いて、miR-17 の直接のターゲットを検討したところ、E2F1、E2F3、p21 が候補遺伝子として考えられた。これらの遺伝子の中で p21 は PicTar で 4.19、Miranda で -0.8 と高いスコアを示しており、miR-17 のターゲットの候補遺伝子として信頼できる値であった(表 1)。

表 1 miR-17 のターゲットとして報告されている 7 遺伝子

Gene Name	Functions	PicTar score	Miranda score
E2F1	Positive regulation of cell proliferation, Proapoptotic proteins	6.57	-1.06
E2F2	Positive regulation of cell proliferation, Proapoptotic proteins	N.D.	-0.14
E2F3	Positive regulation of cell proliferation, Proapoptotic proteins	1.24	-0.46
CDKN1A (p21)	Negative regulator of G1-S checkpoint	4.19	-0.8
BIM	Proapoptotic protein	N.D.	N.D.
Tsp1	Anti-angiogenic protein	N.D.	N.D.
CTGF	Anti-angiogenic protein	N.D.	-0.03
AIB1	Oncogenic protein	N.D.	N.D.
CyclinD1	Oncogenic protein	N.D.	N.D.

滑膜肉腫において p21-3'UTR が miR-17 の直接のターゲットかどうかを検討するために、ルシフェラーゼの下流に p21-3'UTR が結合したベクターを作製した(図 7A)。Fuji 細胞の miR-17 安定過剰発現モデルにおいて、miR-17 を過剰発現させると、p21-3'UTR のルシフェラーゼ活性はコントロールと比較して有意に抑制された(図 7B 左)。Fuji 細胞の miR-17 一時過剰発現モデルにおいても、同様の結果が得られた(図 7B 右)。これらの結果から滑膜肉腫細胞株において p-21-3'UTR は miR-17 の直接のターゲットである事が明らかとなった。

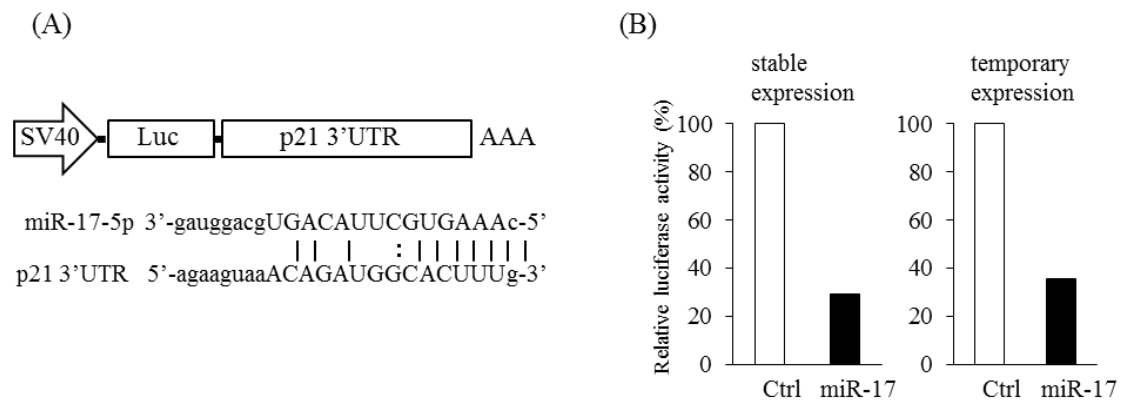


図 7A, B

A: ルシフェラーゼの下流に p21-3'UTR が結合したベクターを作製した。

B 左: Fuji 細胞の miR-17 安定過剰発現モデルにおいて、miR-17 を過剰発現させると、p21-3'UTR のルシフェラーゼ活性はコントロールと比較して有意に抑制された。

B 右: Fuji 細胞の miR-17 一時過剰発現モデルにおいても、同様の結果が得られた。

Fuji 細胞において miR-17 を過剰発現させると、p53 の蛋白発現量に関わらず、p21 の蛋白発現量を抑制したが、p21 の mRNA の発現量はむしろ上昇傾向であった(図 8A, B)。この結果より miR-17 は転写後の段階で p21 を分解している事が示唆された。ERK や Akt のリン酸化レベルも、miR-17 を過剰発現しても変化は認められなかった(図 8B)。滑膜肉腫の一般的な化学療法でドキソルビシンはよく使用される薬剤であるが、ドキソルビシンを用いて、p21 の発現を誘導した条件下でも、miR-17 を過剰発現させると、p21 の発現量を著明に抑制した事は特記すべき事であった(図 8C)。実際に Fuji 細胞にドキソルビシンを処理し、細胞増殖を抑制したところ、miR-17 を過剰発現する事で、細胞増殖能が回復し、矛盾しない結果であった(図 8D)。

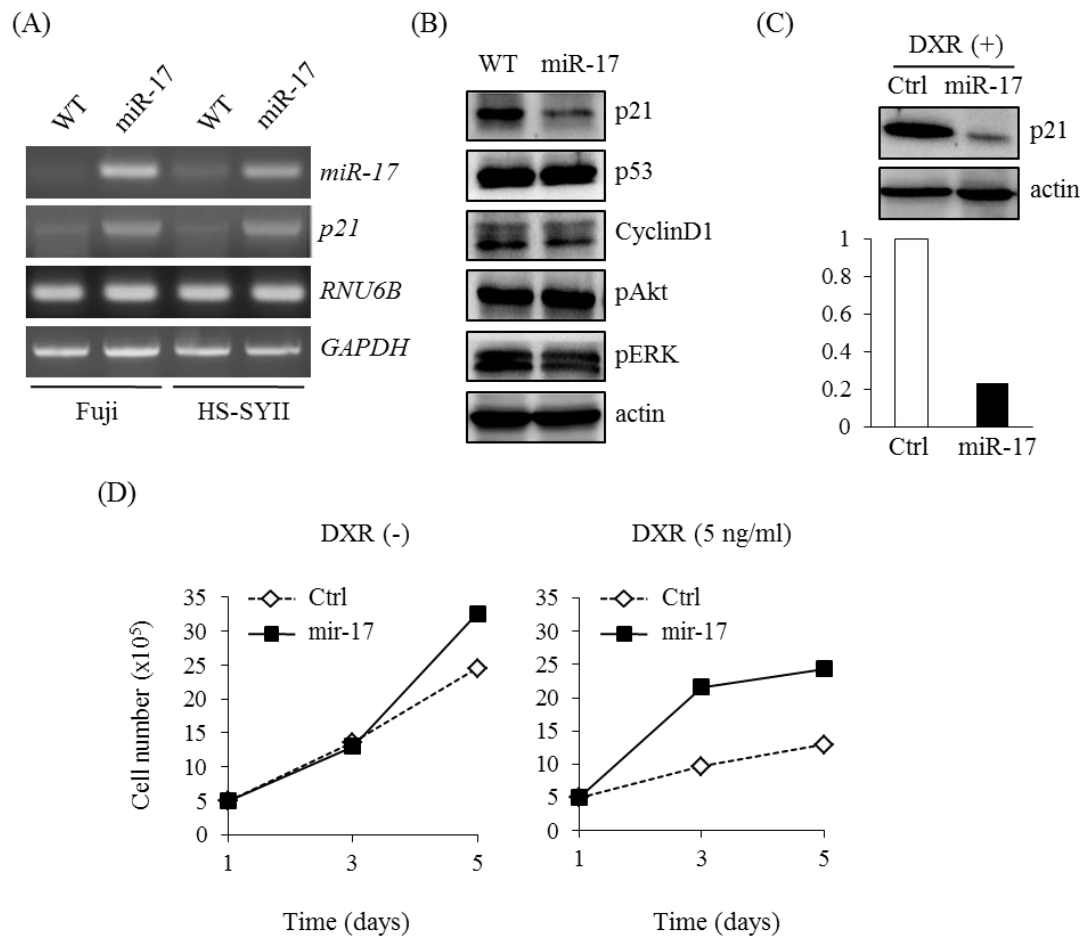


図 8A-D

A, B: Fuji 細胞において miR-17 を過剰発現させると、p53 の蛋白発現量に関わらず、p21 の蛋白発現量を抑制した。p21 mRNA の発現量は上昇傾向であった。リン酸化 ERK やリン酸化 Akt の発現については、変化を認めなかった。

C: ドキソルビシンを用いて、p21 の発現を誘導し、miR-17 を過剰発現させると、p21 の発現量を著明に抑制した。

D: ドキソルビシンを処理し、細胞増殖を抑制したところ、miR-17 を過剰発現する事で、細胞増殖能が回復した。

【miR-17 阻害剤を用いることで、細胞増殖能は抑制され、p21 の発現量は回復した】

ヒト滑膜肉腫の治療において、miR-17 の分子標的治療薬としての有効性

を検討するために、Fuji 細胞と HS-SYII 細胞の 2 つの滑膜肉腫細胞株で miR-17 阻害剤を用いた実験を行った。Fuji 細胞において、miR-17 阻害剤を処理し、miR-17 を抑制したところ、p21 の発現量は回復した(図 9A)。続いて、Fuji 細胞、HS-SYII 細胞において miR-17 阻害剤を処理して、細胞増殖能を検討したところ、両細胞とも細胞増殖能が抑制され、これまでの実験結果と矛盾しない結果であった(図 9B)。

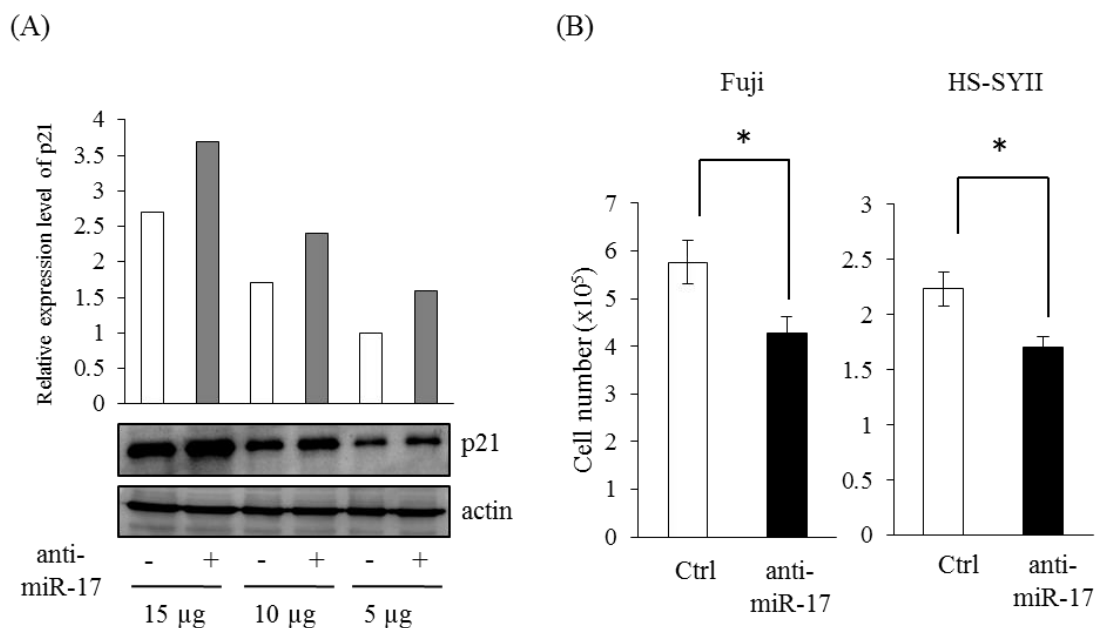


図 9A, B

A: Fuji 細胞において、miR-17 阻害剤を処理し、miR-17 を抑制したところ、p21 の発現量は回復した。

B: Fuji 細胞、HS-SYII 細胞において、miR-17 阻害剤を処理したところ、細胞増殖能が抑制された。

【ヒト滑膜肉腫において、miR-326 は細胞増殖能及びコロニー形成能を上昇させた】

滑膜肉腫における腫瘍形成能を促進する microRNA を同定するために、第一章と同様にがん関連 miRNA library によるスクリーニングを施行した。すなわち、Oncomir Precursor Virus Library を 3 つの滑膜肉腫細胞株である SYO-1、Fuji、HS-SYII に感染させ、oncomiR 細胞を樹立した。樹立した HS-SYII oncomiR 細胞をヌードマウスの皮下に接種したところ、腫瘍を形成した。同腫瘍から RNA を抽出し、半定量式 RT-PCR を行ったところ、miR-326 が同定された(図 11A, B)。

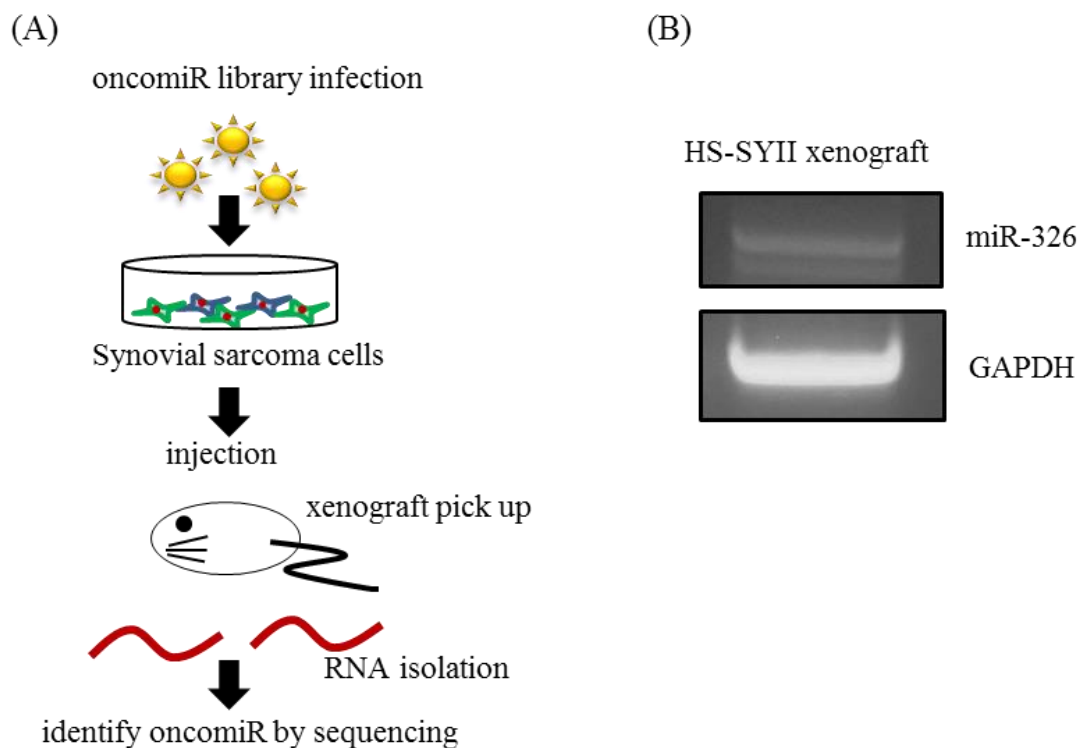


図 11 A, B

A: 第一章と同様に Oncomir Precursor Virus Library を滑膜肉腫細胞株に感染させ、oncomiR 細胞を樹立した。樹立した HS-SYII oncomiR 細胞をヌードマウスの皮下に接種し、形成した腫瘍から RNA を抽出し、シーケンシングを行った。

B: 半定量式 RT-PCR を行ったところ、miR-326 が同定された。

ヒト滑膜肉腫における miR-326 の機能を解明するために、miR-326 過剰発現細胞を SYO-1 細胞、HS-SYII 細胞で樹立した(図 12A)。樹立した miR-326

過剰発現細胞で細胞増殖能を調べたところ、SYO-1 細胞, HS-SYII 細胞にて、コントロール細胞と比較してそれぞれ細胞増殖能が有意に上昇する事が明らかとなった(図 12B)。更に、SYO-1 細胞、HS-SYII 細胞にて、miR-326 を過剰発現する事で、コントロール細胞と比較してコロニー形成能も上昇する事が明らかとなった(図 12C, D)。以上の結果より、miR-326 は SS18-SSX1 あるいは SS18-SSX2 のがん融合キメラ遺伝子を持つ両方の滑膜肉腫細胞で、細胞増殖能及びコロニー形成能に同様の影響を与える事が示唆された。細胞の形態には影響を与えなかった(結果非表示)。

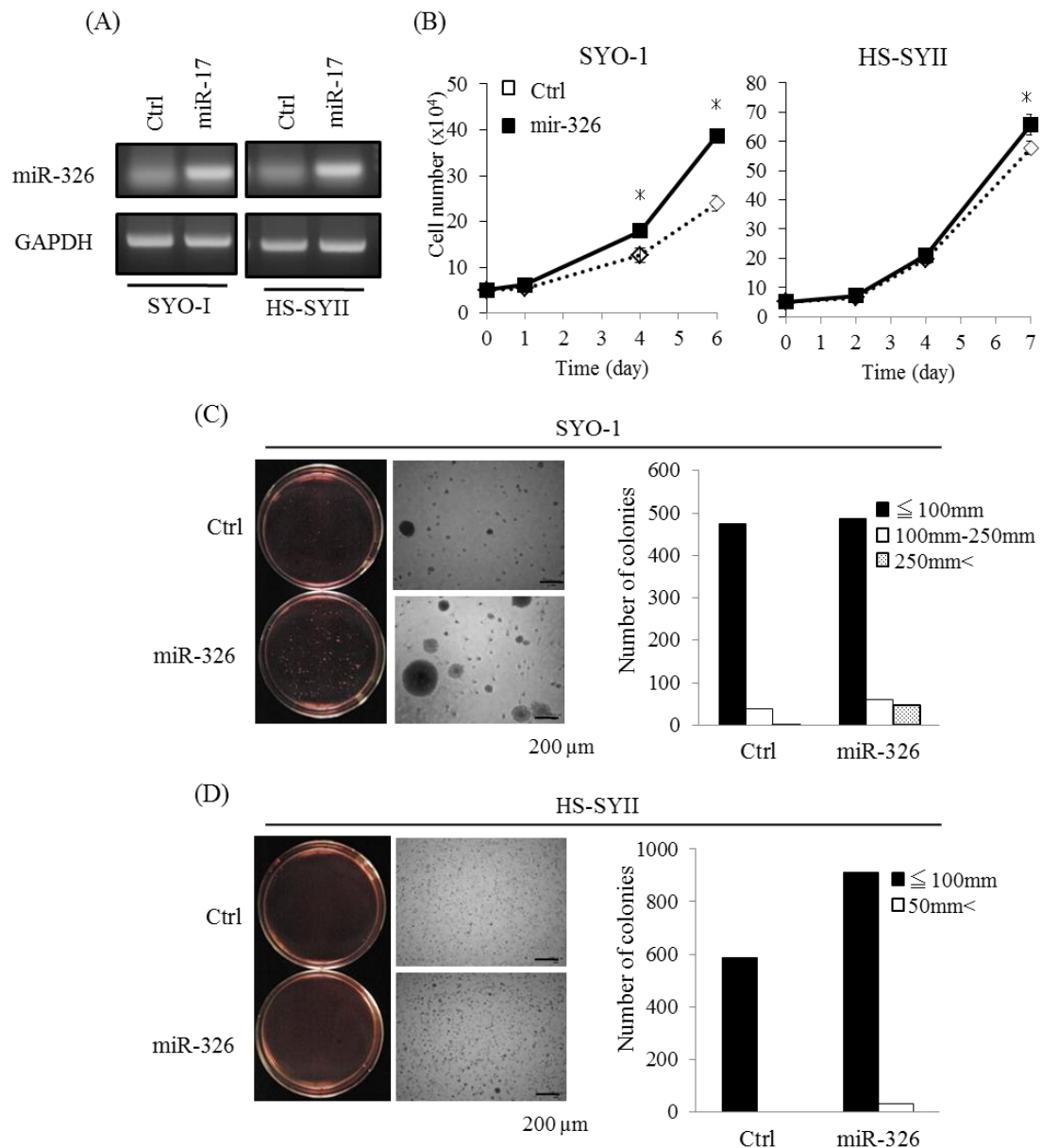


図 12 A-D

A: miR-326 過剰発現細胞を SYO-1 細胞, HS-SYII 細胞で樹立した。

B: miR-326 を過剰発現させる事で、SYO-1 細胞, HS-SYII 細胞にて、コントロール細胞と比較して、細胞増殖能が有意に上昇した。

C, D : SYO-1 細胞, HS-SYII 細胞にて、miR-326 を過剰発現する事で、コントロール細胞と比較して、コロニー形成能が上昇した。

【miR-326 は in vivo で、ヒト滑膜肉腫における腫瘍形成能を上昇させた】

miR-326 の in vivo での滑膜肉腫の腫瘍形成能への影響を検討するために、

miR-326 過剰発現 SYO-1 細胞と miR-326 過剰発現 HS-SYII 細胞を、それぞれのコントロール細胞と共にヌードマウスに皮下接種し、形成された腫瘍の径を週 2 回測定した。miR-326 を過剰発現させる事で、SYO-1 細胞、HS-SYII 細胞共に、それぞれ 21 日、20 日で著明に大きな腫瘍を形成し、最終的に、コントロール細胞と比較して有意に容積が大きい腫瘍を形成した (図 13A-D)。これらの結果より、miR-326 は *in vivo* において、滑膜肉腫の腫瘍形成能を亢進させる事が示唆された。続いて、SYO-1 細胞により形成された腫瘍の病理組織学的検討を行った。miR-326 を過剰発現した SYO-1 細胞の H&E 標本では、コントロール細胞と比較して、形態学的には変化を認めなかったが、核分裂数の上昇や腫瘍内壊死を認めていた。更に、MIB-1 index についても、miR-326 を過剰発現すると著明に上昇する事が明らかとなった (図 13E)。

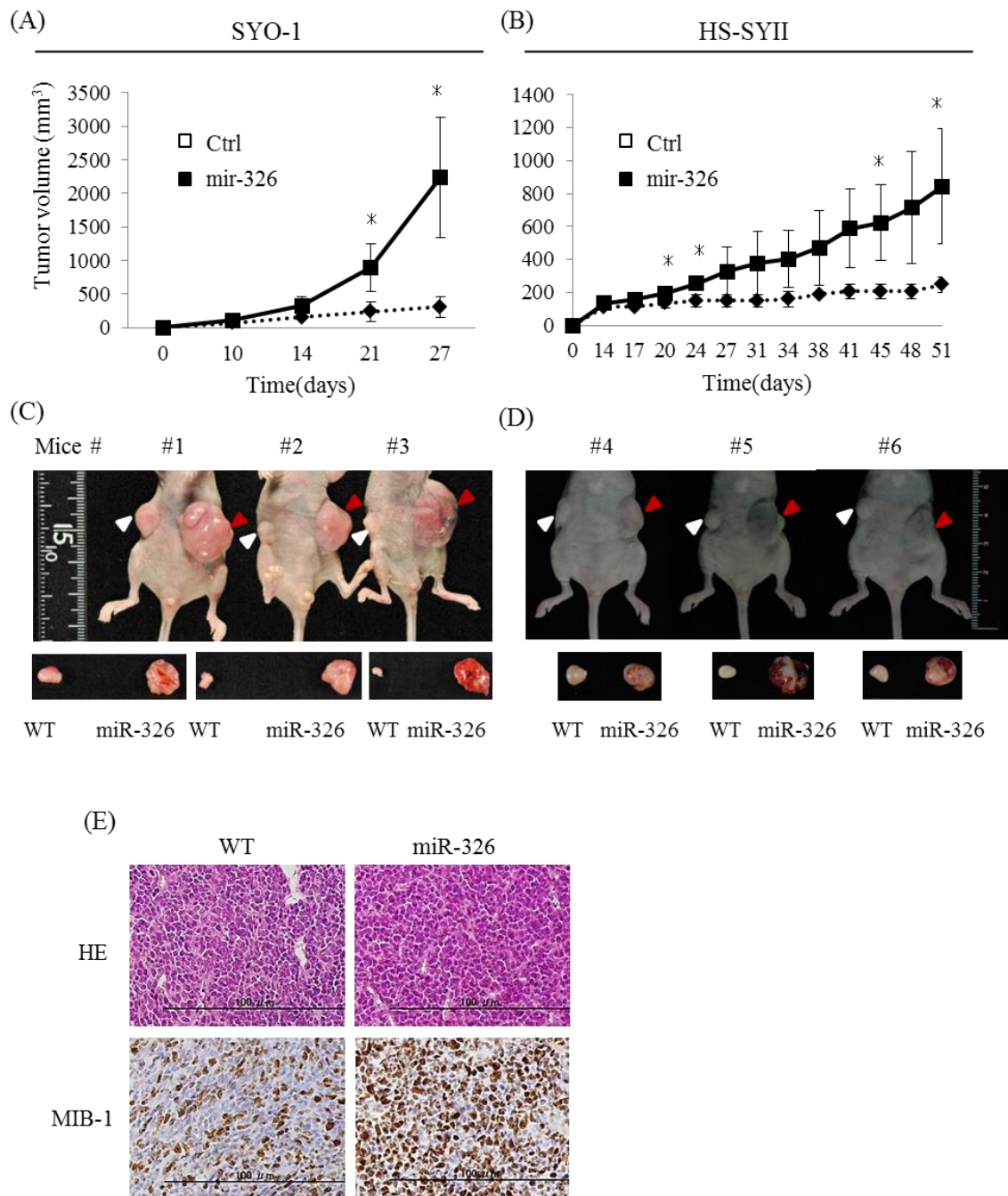


図 13

A-D : miR-326 過剰発現 SYO-1 細胞、HS-SYII 細胞をヌードマウスに皮下接種したところ、コントロール細胞と比較して、それぞれ 21 日、20 日で著明に大きな腫瘍を形成し、最終的に、容積が有意に大きい腫瘍を形成した。

E : SYO-1 細胞の H&E 標本において、miR-326 を過剰発現させる事で、コントロール細胞と比較して、核分裂数の上昇や腫瘍内壊死を認め、MIB-1 index の上昇も認めた。

【ヒト滑膜肉腫における miR-326 の直接標的を検討するためにマイクロアレイ解析を行った】

狩猟しうる限りでは、腫瘍における miR-326 のターゲットとして 3 つの遺伝子(SMO, PKM2, E2F1)が報告されている²³⁻²⁷。SMO はソニックヘッジホッグシグナルの上流に位置する分子であり、その下流にある GLI1 を介して、がん細胞の腫瘍形成能や stemness を維持する過程で重要である³²。PKM2 は growth factor を介して、増殖機能のシグナル伝達に重傷な役割を担っている³³。E2F1 は様々な oncoprotein を誘導する事によって、p53 を介し、アポトーシスを誘導する分子である³⁴。この中で本研究では、最も報告の多い SMO という分子に着目して、前述の 3 つの滑膜肉腫細胞株にて定量式 PCR を行ったところ、miR-326 過剰発現細胞では、コントロール細胞と比較して、mRNA の減少を認めた(図 14A)。また、その下流に位置する GLI1 においても同様の結果であった(図 14B)。

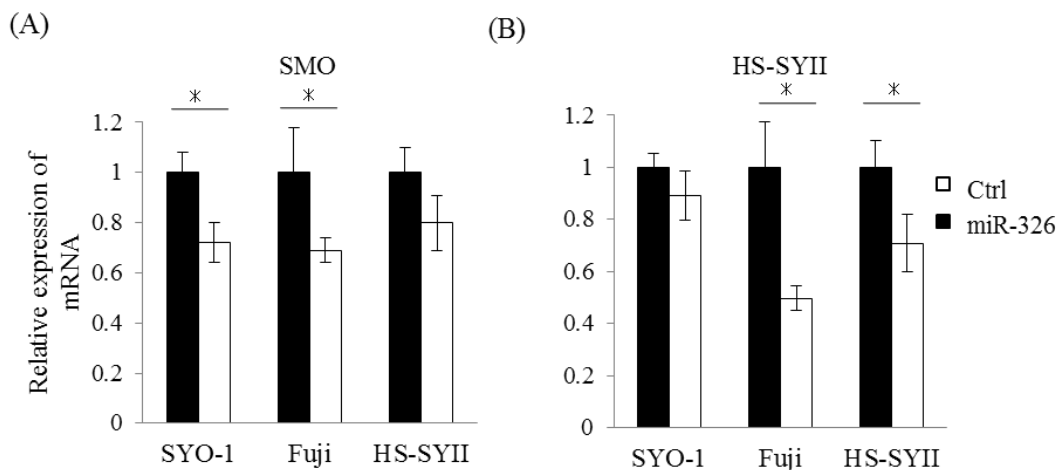


図 14A, B miR-326 過剰発現細胞では、コントロール細胞と比較して、SMO, GLI1 共に mRNA が有意に減少していた。

これらの結果は滑膜肉腫において、SMO 及びその下流に位置する GLI1 が miR-326 の直接のターゲットである可能性を支持するものであった。しかしながら、PicTar や Miranda による miR のターゲットを予測できるアルゴリズム使用しても、SMO、GLI1 共に候補遺伝子としては算出されなかった(結果非表示)。

そこで、滑膜肉腫における miR-326 の直接のターゲットを検討するために、前述の 3 つの滑膜肉腫細胞株において、マイクロアレイ解析を施行した。共通して 2 倍以上発現が上昇している遺伝子、共通して 2 倍以上発現が低下

している遺伝子を書き出したものが以下のベンズである(図 14)。

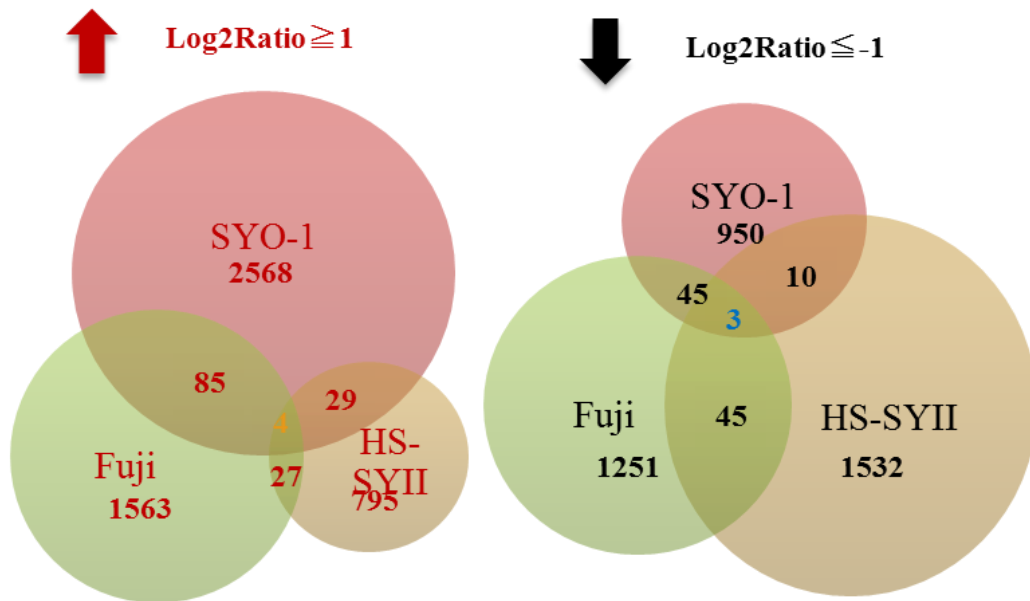


図 14 3つの滑膜肉腫細胞株において、miR-326 過剰発現細胞とコントロール細胞を比較すると、3つの細胞で共通して上昇している遺伝子を4つ認め、共通して低下している遺伝子を3つ認めた。

我々はマイクロアレイ解析を行うことで、miR-326 過剰発現細胞とコントロール細胞を比較し、4つの遺伝子が3つの細胞で共通して上昇し、3つの遺伝子が共通して低下している事を明らかにした。その遺伝子の内容は以下の通りである(表 2A, B)。

表 2A 3つの滑膜肉腫細胞株で共通して発現が上昇していた遺伝子

Gene Name	Functions
Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 (SLC40A1)	Cell membrane protein that may be involved in iron export from duodenal epithelial cells.
BROAD Institute lincRNA (XLOC_001930)	Long non-coding RNA.
Uncharacterized LOC285889 (LOC285889)	Non-coding RNA.
Piwi-like 4 (Drosophila) (PIWIL4)	Function in development and maintenance of germline stem cells.

表 2B 3つの滑膜肉腫細胞株で共通して発現が低下していた遺伝子

Gene Name	Functions
Leucine-rich repeat LGI family, member 2 (LGI2)	Encode proteins with large extra- and intracellular domains connected by a single transmembrane region, which have been implicated in epileptogenesis and/or tumorigenesis.
Ectodysplasin A (EDA), transcript variant 1	Mutations within EDA1 gene, cause X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia
BROAD Institute lincRNA (XLOC_12_015565)	Non-coding RNA.

現在、これまでの実験結果と照らし合わせて、これらの遺伝子と miR-326 の直接のターゲットの関連性についても検討中である。

考察

滑膜肉腫は予後不良な肉腫としてよく知られており、青壮年期の患者の四肢関節近傍に好発するが、有効な治療法が確立されていないのが現状であり、その確立が待たれるところである⁹。MicroRNAの機能解析をする事は、新規分子標的治療の確立に貢献すると考えられるが、滑膜肉腫においてはその機能の詳細の多くは未だ不明である^{8,14}。本研究により、ヒト滑膜肉腫細胞株においてmiR-17を過剰発現させると、腫瘍形成能が亢進し、さらにmiR-17はp21CIP1/WAF1を直接のターゲットとしている事が明らかになった。またSS18-SSX融合遺伝子がmiR-17の発現を誘導する事も特記すべき事である。miR-17を過剰発現させると、p21発現量が低下した。これらの一連の結果から、miR-17はp21を直接標的とする事で、細胞周期のうち、G1-S期を停止に導くという作用を阻害し、滑膜肉腫の細胞増殖能を促進する事が示唆された。

我々は以前に、滑膜肉腫細胞株において、SS18-SSX融合遺伝子がhBRMやp53の系とは別に、Sp1/Sp3を介して、p21を誘導し、セネッセンスを引き起こす事を明らかにした³⁵。よってSS18-SSX融合遺伝子の引き起こすセネッセンスを克服し、細胞が肉腫へトランスフォームするには、p21によるアポトーシスを回避する何らかの因子が存在するはずである。本研究において、我々は、oncomiR-libraryシステムを用いて、この因子を紐解き、さらにSS18-SSX融合遺伝子が、miR-17の発現を上昇させ、p21-3'UTRを直接標的とする事によって、細胞増殖能を亢進させる事を明らかにした(図10)。

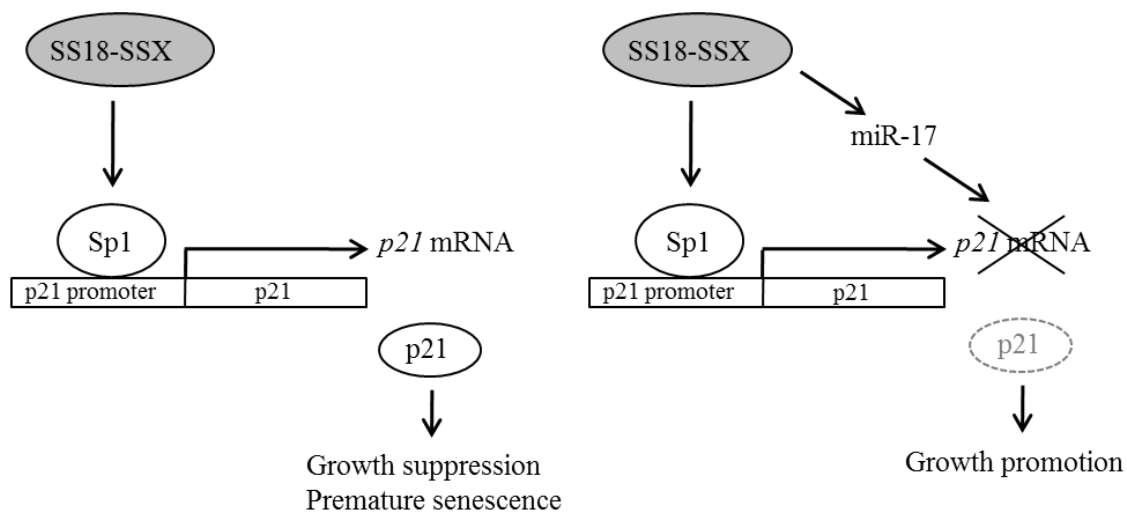


図 10 SS18-SSX 融合遺伝子は、Sp1/Sp3 を介して、p21 を誘導し、増殖抑制や、セネッセンスを引き起こす一方で、miR-17 の発現を上昇させ、p21-3'UTR を直接標的とする事によって、p21 の mRNA を分解し、細胞増殖能を亢進させる事が明らかになった。

結果として、本研究によって miR-17 は、滑膜肉腫において、p53 非依存性に p21 を抑制する事が示唆された。最近になって、SS18-SSX 融合遺伝子は、SWI/SNF(BAF)クロマチンリモデリング複合体を変異させ、BAF47 を除き、H3K27me3 を介した抑制を解除する事によって、滑膜肉腫の増殖を導く事が明らかとなった。SS18-SSX 融合遺伝子の BAF 複合体を崩壊させる機能は、SSX 蛋白の 2 つの領域による。すなわち、C 末端の 8aa(SDPEEDE)と逆の領域の 2aa である³⁶。後の領域である 2aa が SSX1(KR)と SSX2(ER)で異なるという事実は miR-17 を誘導する機能に関わっているのかもしれない。一例として、SS18-SSX1 がん融合遺伝子と SS18-SSX2 がん融合遺伝子は、それぞれ区別して Snail と Slug の発現を調節している事が報告されている^{37,38}。これらの転写因子は乳がんにおける miR-128 や miR-221 のような幾つかの miR の発現を調節している事分かっており^{39,40}、SS18-SSX2/Slug/miR-17 という系を提供しているのかもしれない。

以前の報告から、miR-17 の過剰発現は様々ながん腫で認められており^{17,19}、細胞周期の調節にも関わっている事が明らかとなっている¹⁹。p21 は G1-S 期の negative regulator である。滑膜肉腫に関しては、p21 の上流にある p53 が DNA 損傷に応じて誘導される事が以前の報告から明らかになっている⁴¹。滑膜肉腫の治療において化学療法や放射線治療により DNA 損傷が起きた際に、miR-17 を阻害する事で、p21 による細胞増殖の抑制が望める可能性が

ある。実際に、本研究では Fuji 細胞と HS-SYII 細胞において、治療濃度域のドキソルビシン使用条件下で、miR-17 を過剰発現させると細胞増殖が亢進する事を示した。

これまでに cyclin D1⁴² や insulin-like growth factor-1⁴³ のような幾つかの分子が滑膜肉腫の増殖と肉腫形成に重要であるとの報告が為されてきた。Cai らは SS18-SSX 融合遺伝子が、滑膜肉腫において、ERK 経路を介した細胞増殖に重要であるとの報告をした⁴⁴。MAPK チロシンキナーゼ阻害剤である sorafenib が滑膜肉腫の細胞増殖を阻害したとの報告がある一方で⁴⁵、PI3-kinase/AKT 経路が、同肉腫の細胞増殖に重要であるとの報告もある⁴³。我々は以前、Crk アダプター分子が Gab1 のリン酸化を介して、Src や FAK(focal adhesion kinase)、また一連の DOCK180/p38MAPK 経路の活性化により、滑膜肉腫の細胞増殖を増強する事を示した⁴⁶。さらに、我々の実験結果により、Src と Aurora キナーゼの両方を阻害する事で、滑膜肉腫の増殖を強く抑制する事が明らかとなった⁴⁷。キナーゼを標的とした治療が滑膜肉腫において有効ではあったが、キナーゼとは無関係である今回の miR-17 阻害剤を用いた治療は画期的であり、臨床において深刻化している化学療法への耐性等に非常に効果的であると考えられる。

本研究で用いた滑膜肉腫細胞株の中で、Fuji 細胞と HS-SYII 細胞では miR-17 を過剰発現すると細胞増殖能が上昇したが、SYO-1 細胞では大きく変わらなかった (data not shown)。PicTar のアルゴリズムを用いたところ、miR-17 の直接標的の候補として、711 の遺伝子が挙げられ、スコアは 0.83 から 8.63 の範囲であった。その中で、p21 (CDKN1A)は 140 位/711 遺伝子であり、スコアは 4.19 であった。SYO-1 細胞で大きく細胞増殖能に変化がなかったのは、miR-17 が他の多くのターゲットによって消耗された事が原因と推測された。これらの推測を支持する報告として、細胞浸潤能や細胞遊走能における miR-17 の影響は報告によって異なっている⁴⁸⁻⁵⁰。このようにして、miR-17 は、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の両方をターゲットとし得るので、慎重な評価が必要であり、滑膜肉腫における生理学的な性質を決定する必要がある。

本研究において、初めて miR-17 が滑膜肉腫の増殖において重要な役割を担っている事を明らかにした。miR-17 を過剰発現する事で、コロニー形成能、細胞増殖能、腫瘍形成能が *in vitro* と *in vivo* の両方で上昇し、かつ miR-17 が p21 を直接標的としている事を明らかにした。滑膜肉腫は従来の化学療法に抵抗性の腫瘍としてよく知られている。miR-17 を阻害する事で、p21 の発現を上昇させる事は、ヒト滑膜肉腫の治療において有用な影響を与える可

能性が示唆された。

本研究の前半部分で、ヒト滑膜肉腫細胞株において miR-17 を過剰発現させると、腫瘍形成能が亢進し、さらにその miR-17 の影響の一部が p21CIP1/WAF1 を直接のターゲットとしている事に起因する事を明らかにした。つまり、miR-17 は p21 を直接のターゲットとする事で、細胞周期のうち、G1-S 期を停止に導くという作用(すなわちアポトーシス)を阻害し、滑膜肉腫の細胞増殖能を促進する事を明らかにしたのである。

続いて本研究の後半部分では、前半部分と同様に、oncomiR-library のシステムを用いて樹立した HS-SYII oncomiR 細胞をヌードマウスの皮下に接種したところ、腫瘍を形成した。形成された腫瘍より RNA を抽出し、シーケンシングを行ったところ、miR-326 が同定された。

以前の報告から、miR-326 は肉腫での報告はないものの、下垂体腫瘍、神経系腫瘍、血液系腫瘍等で過去に報告されている²³⁻²⁷。今回、我々は肉腫の報告としては初めて、miR-326 を同定した。また、*in vitro* では、miR-326 を過剰発現させる事で、SYO-1 細胞、HS-SYII 細胞において、細胞増殖能が有意に上昇し、さらにコロニー形成能も上昇する事を示した。*In vivo* では miR-326 を過剰発現させると、コントロール細胞と比較して、明らかに大きな腫瘍がヌードマウスの皮下に形成される事を示し、かつ組織学的にも壊死、核分裂、MIB-1 index の上昇を認め、組織学的悪性度の上昇を認めた。これらの実験結果から、miR-326 も miR-17 と同様に別のターゲットを介して、滑膜肉腫の腫瘍形成能を上昇させる事が示唆された。

現在までに、肉腫における miR-326 のターゲットの報告はないものの、他の腫瘍では主に 3 つの分子(SMO、PKM2、E2F1)が miR-326 のターゲットとして報告されている。前述のように SMO という分子に着目して、前述の 3 つの滑膜肉腫細胞株にて定量式 PCR を行い、SMO、GLI1 の mRNA が miR-326 過剰発現細胞では、コントロール細胞と比較して減少する事を明らかにした。

これらの結果は滑膜肉腫において、SMO 及びその下流に位置する GLI1 が miR-326 の直接のターゲットである可能性を支持するものであった。しかしながら、PicTar や Miranda による miR のターゲットを予測できるアルゴリズム使用しても、SMO、GLI1 共に候補遺伝子としては算出されなかった。また、SMO は下流の GLI1 を介して、がん細胞の腫瘍形成能や stemness を維持する過程で重要な働きを担っており³²、miR-326 が SMO、GLI1 をターゲットとしていれば、腫瘍形成能や stemness の亢進にブレーキがかかる事になり、今回の実験結果とは逆の結果となるはずである。よって、他の標的

分子が、今回の実験結果に影響を及ぼしていると考え、マイクロアレイ解析を行う事でその miR-326 の標的分子を検討する事とした。

マイクロアレイ解析の結果、miR-326 を過剰発現させる事で、コントロール細胞と比較して、3 つの細胞株で共通して 2 倍以上発現が上昇している遺伝子が 4 つあり、2 倍以上発現が低下している遺伝子が 3 つある事が明らかとなった。現在、これらの遺伝子と実験結果を照らし合わせ、滑膜肉腫における miR-326 の直接のターゲットを同定すべく、検討中である。

また、今回我々が用いた滑膜肉腫細胞株の中で、miR-326 を過剰発現すると、SYO-1 細胞と HS-SYII 細胞では細胞増殖能やコロニー形成能が上昇したが、Fuji 細胞では大きく変わらなかった(結果非表示)。PicTar のアルゴリズムを用いたところ、miR-326 の直接標的の候補として、208 の遺伝子が挙げられ、スコアは 1.90 から 13.08 の範囲であった。Fuji 細胞で細胞増殖能やコロニー形成能に大きく変化がなかったのは、miR-326 が他の多くのターゲットによって消耗された事が原因と推測された(第一章も参照)。

いずれにしても、本研究において初めて miR-326 を肉腫という分野で報告し、また miR-326 を過剰発現させる事で、ヒト滑膜肉腫において、細胞増殖能、コロニー形成能及びマウス生体内での腫瘍形成能が上昇する事を明らかにした。miR-326 の直接のターゲットについては今後の実験の課題ではあるが、miR-326 の機能を詳細に明らかに事は、ヒト滑膜肉腫の新規治療法の解明において有効である可能性が示唆された。

総括及び結論

本研究では、microRNA の解析を主なテーマとし、ヒト滑膜肉腫の腫瘍形成能における microRNA の新しい知見の発見を試みた。

第一章では、Oncomir Precursor Virus Library のシステムを用いて、Fuji oncomiR 細胞のコロニーから初めて miR-17 を同定し、かつ、miR-17 が p21(CDKN1A)を直接のターゲットとし、*in vitro* と *in vivo* の両方において滑膜肉腫の腫瘍形成能を亢進させる事を示した。

第二章では、第一章と同様に Oncomir Precursor Virus Library のシステムを用いて、HS-SYII oncomiR 細胞によりヌードマウスの皮下に形成された腫瘍から、miR-326 を同定した。miR-326 もヒト滑膜肉腫において、細胞増殖能、コロニー形成能及び *in vivo* での腫瘍形成能を亢進させる事を示した。miR-326 の直接のターゲット分子については現在検討中である。

本研究を通して、microRNA がヒト滑膜肉腫の腫瘍形成能において、非常に重要な働きを担っている事が示唆された。この結果は滑膜肉腫における新規分子標的治療の開発に繋がる可能性がある。具体的には miR-17 は本腫瘍における標準的抗がん剤であるドキソルビシンの使用下で、p21 の発現を低下させ、滑膜肉腫細胞株の細胞増殖能を上昇させた。つまり、miR-17 の発現を解析する事で、腫瘍が化学療法抵抗性か否かを前もって予測し得る、生物学的マーカーとして使用でき、また、miR-17 を阻害する事によって、ドキソルビシンへの抗がん剤感受性を高めるといった臨床への応用が検討される所である。また、miR326 についても、その直接のターゲットは現在検討中ではあるが、今回の研究結果から、滑膜肉腫の腫瘍形成能において重要な役割を担っている可能性があり、臨床応用が期待される。

今後、ヒト滑膜肉腫における microRNA の機能をより詳細に検討し、microRNA の生物学的マーカー及び新規分子標的治療等への臨床応用の可能性について、深く追求していきたい。

謝辞

今回の原稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さった北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野岩崎倫政教授、及び病理学講座腫瘍病理学分野田中伸哉教授に厚く御礼申し上げます。

また、研究を進めるにあたって、直接ご指導して頂いた北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野津田真寿美講師に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究に御協力して頂いた北海道大学大学院病理学講座腫瘍病理学分野、探索病理学講座ならびに整形外科学分野の皆様心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854 (1993).
- 2 Ruvkun, G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* **294**, 797-799 (2001).
- 3 Baulcombe, D. DNA events. An RNA microcosm. *Science* **297**, 2002-2003 (2002).
- 4 Care, A. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Medicine* **13**, 613-618 (2007).
- 5 Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233 (2009).
- 6 Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834-838 (2005).
- 7 Subramanian, S. *et al.* MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene* **27**, 2015-2026 (2008).
- 8 Sarver, A. L., Phalak, R., Thayanithy, V. & Subramanian, S. S-MED: sarcoma microRNA expression database. *Lab. Investigation* **90**, 753-761 (2010).
- 9 Fisher, C. Synovial sarcoma. *Ann. Diagn. Pathology* **2**, 401-421 (1998).
- 10 Lewis, J. J. *et al.* Synovial sarcoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 112 patients with primary localized tumors of the extremity. *J. Clin. Oncology* **18**, 2087-2094 (2000).
- 11 Krieg, A. H. *et al.* Synovial sarcomas usually metastasize after >5 years: a multicenter retrospective analysis with minimum follow-up of 10 years for survivors. *Ann. Oncology* **22**, 458-467 (2011).
- 12 Clark, J. *et al.* Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat. Genetics* **7**, 502-508 (1994).
- 13 Sandberg, A. A. & Bridge, J. A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Synovial sarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **133**, 1-23, doi:S0165460801006264 [pii] (2002).
- 14 Hisaoka, M. *et al.* Identification of altered MicroRNA expression patterns in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* **50**, 137-145 (2011).
- 15 Sarver, A. L., Li, L. & Subramanian, S. MicroRNA miR-183 functions as an

- oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Research* **70**, 9570-9580 (2010).
- 16 Xiang, J. & Wu, J. Feud or Friend? The Role of the miR-17-92 Cluster in Tumorigenesis. *Curr. Genomics* **11**, 129-135 (2010).
- 17 Ota, A. *et al.* Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Research* **64**, 3087-3095 (2004).
- 18 Schmidt, H. *et al.* Gains of 13q are correlated with a poor prognosis in liposarcoma. *Mod. Pathology* **18**, 638-644 (2005).
- 19 Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2257-2261 (2006).
- 20 He, L. *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-833 (2005).
- 21 Huang, G., Nishimoto, K., Zhou, Z., Hughes, D. & Kleinerman, E. S. miR-20a encoded by the miR-17-92 cluster increases the metastatic potential of osteosarcoma cells by regulating Fas expression. *Cancer Research* **72**, 908-916 (2012).
- 22 Baumhoer, D. *et al.* MicroRNA profiling with correlation to gene expression revealed the oncogenic miR-17-92 cluster to be up-regulated in osteosarcoma. *Cancer Genetics* **205**, 212-219 (2012).
- 23 D'Angelo, D. *et al.* Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* **97**, E1128-1138 (2012).
- 24 Ferretti, E. *et al.* Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J* **27**, 2616-2627 (2008).
- 25 Babashah, S. *et al.* Targeting of the signal transducer Smo links microRNA-326 to the oncogenic Hedgehog pathway in CD34+ CML stem/progenitor cells. *Int. J. Cancer* **133**, 579-589 (2013).
- 26 Kefas, B. *et al.* Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells. *Neuro Oncology* **12**, 1102-1112 (2010).
- 27 Karsy, M., Arslan, E. & Moy, F. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. *Genes and Cancer* **3**, 3-15 (2012).
- 28 Zhou, J. *et al.* MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in glioma by

- targeting the Nin one binding protein (NOB1). *PLoS One* **8**, e68469 (2013).
- 29 Qiu, S. *et al.* Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *J. Transl. Medicine* **11**, 10 (2013).
- 30 Trojani, M. *et al.* Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int. J. Cancer* **33**, 37-42 (1984).
- 31 Guillou, L. *et al.* Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma. *J. Clin. Oncology* **15**, 350-362 (1997).
- 32 Po, A. *et al.* Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *EMBO J* **29**, 2646-2658 (2010).
- 33 Harris, I., McCracken, S. & Mak, T. W. PKM2: a gatekeeper between growth and survival. *Cell Research* **22**, 447-449 (2012).
- 34 Polager, S. & Ginsberg, D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 738-748 (2009).
- 35 Tsuda, M. *et al.* Induction of p21(WAF1/CIP1) by human synovial sarcoma-associated chimeric oncoprotein SYT-SSX1. *Oncogene* **24**, 7984-7990 (2005).
- 36 Kadoch, C. & Crabtree, G. R. Reversible disruption of mSWI/SNF (BAF) complexes by the SS18-SSX oncogenic fusion in synovial sarcoma. *Cell* **153**, 71-85 (2013).
- 37 Saito, T., Nagai, M. & Ladanyi, M. SYT-SSX1 and SYT-SSX2 interfere with repression of E-cadherin by snail and slug: a potential mechanism for aberrant mesenchymal to epithelial transition in human synovial sarcoma. *Cancer Research* **66**, 6919-6927 (2006).
- 38 Saito, T. The SYT-SSX fusion protein and histological epithelial differentiation in synovial sarcoma: relationship with extracellular matrix remodeling. *Int. J. Clin. Exp. Pathology* **6**, 2272-2279 (2013).
- 39 Lambertini, E. *et al.* Correlation between Slug transcription factor and miR-221 in MDA-MB-231 breast cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 445 (2012).
- 40 Qian, P. *et al.* Loss of SNAIL regulated miR-128-2 on chromosome 3p22.3 targets multiple stem cell factors to promote transformation of mammary epithelial cells. *Cancer Research* **72**, 6036-6050 (2012).

- 41 D'Arcy, P., Ryan, B. A. & Brodin, B. Reactivation of p53 function in synovial sarcoma cells by inhibition of p53-HDM2 interaction. *Cancer Letters* **275**, 285-292 (2009).
- 42 Yu, Q., Geng, Y. & Sicinski, P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* **411**, 1017-1021 (2001).
- 43 Friedrichs, N. *et al.* Insulin-like growth factor-1 receptor acts as a growth regulator in synovial sarcoma. *J. Pathology* **216**, 428-439 (2008).
- 44 Cai, W. *et al.* The effect of SYT-SSX and extracellular signal-regulated kinase (ERK) on cell proliferation in synovial sarcoma. *Pathol. Oncol. Research* **17**, 357-367, doi:10.1007/s12253-010-9334-y (2011).
- 45 Peng, C. L. *et al.* Sorafenib induces growth inhibition and apoptosis in human synovial sarcoma cells via inhibiting the RAF/MEK/ERK signaling pathway. *Cancer. Biol. Therapy* **8**, 1729-1736 (2009).
- 46 Watanabe, T. *et al.* Adaptor protein Crk induces Src-dependent activation of p38 MAPK in regulation of synovial sarcoma cell proliferation. *Molecular Cancer Research* **7**, 1582-1592 (2009).
- 47 Arai, R. *et al.* Simultaneous inhibition of Src and Aurora kinases by SU6656 induces therapeutic synergy in human synovial sarcoma growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Eur. J. Cancer* **48**, 2417-2430 (2012).
- 48 Yang, F. *et al.* miR-17-5p Promotes migration of human hepatocellular carcinoma cells through the p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 pathway. *Hepatology* **51**, 1614-1623 (2010).
- 49 Li, H., Bian, C., Liao, L., Li, J. & Zhao, R. C. miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBP1. *Breast Cancer Research and Treatment* **126**, 565-575 (2011).
- 50 Yu, Z. *et al.* microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **107**, 8231-8236 (2010).