

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Clinical Relevance and Therapeutic Significance of microRNA-133a Expression Profiles and Functions in Malignant Osteosarcoma-Initiating Cells

(骨肉腫がん幹細胞分画における microRNA-133a の臨床的意義ならびに治療的意義)
藤原智洋, 勝田 毅, 萩原啓太郎, 小坂展慶, 吉岡祐亮, 高橋陵宇, 竹下文隆, 窪田大介,
近藤 格, 市川 仁, 吉田朗彦, 小林英介, 川井 章, 尾崎敏文, 落谷孝広

STEM CELLS (掲載予定)

平成 24 年 10 月 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集會に発表

平成 25 年 1 月 Orthopaedic Research Society 2013 に発表

平成 25 年 10 月 第 121 回中部日本整形災害外科学会学術総會に発表

参 考 論 文

1. Cancer Stem Cells of Sarcoma

(肉腫のがん幹細胞)

藤原智洋, 川井 章, 吉田朗彦, 尾崎敏文, 落谷孝広

Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy: 23-72, 2013

2. 骨軟部肉腫における microRNA の最新の知見と臨床応用への挑戦

藤原智洋, 川井 章, 小坂展慶, 尾崎敏文, 落谷孝広

癌と化学療法 40(3): 305-313, 2013

主 論 文

Clinical Relevance and Therapeutic Significance of microRNA-133a Expression Profiles and Functions in Malignant Osteosarcoma-Initiating Cells

(骨肉腫がん幹細胞分画における microRNA-133a の臨床的意義ならびに治療的意義)

【緒言】

不均一な細胞集団である癌組織の中に幹細胞様の細胞が含まれることが様々な悪性腫瘍で明らかにされている。いわゆるがん幹細胞(Tumor-initiating cells; TICs)と呼ばれるこの細胞集団は、薬剤耐性能や浸潤・転移能も有していることが明らかにされている。がん治療において、薬剤耐性能や浸潤・転移能は克服すべき課題であり、その意味でもがん幹細胞の性状解析とそれを標的とした新規治療法の構築は非常に重要な課題である。

一方で、がんにおける microRNA (miRNA)研究がますます盛んになっている。miRNA はタンパク質の遺伝子配列(code)をもたない non-coding RNA の一つで、細胞内の複数の遺伝子発現抑制を引き起こす、いわゆる RNA 干渉(RNA interference : RNAi)分子である。約 18~25 塩基長の一本鎖 RNA からなる miRNA は、核内外における多段階の過程を経て成熟し機能する。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 miRNA)が存在することが明らかになった。ここ数年、これらの知見を核酸医薬として応用する試みが本邦を含め世界的に繰り返されている。

肉腫は極めて組織学的不均一性が強い腫瘍の 1 つである。これまでに肉腫におけるがん幹細胞の存在を示唆する報告も散見されるが、その分子機構ならびに制御方法は未だ解明されていない。我々は骨肉腫におけるがん幹細胞様形質を確認すると共に、その分子機構の解析ならびに複数の性質を同時に制御し得る RNA 干渉を基盤とした核酸医薬の応用の可能性を検討した。また、臨床検体における解析を行い、このような悪性形質を司る分子を治療標的とする臨床的意義を検討した。

【材料と方法】

複数の骨肉腫細胞株及び臨床検体より CD133^{high/low} 分画を単離し、それぞれの増殖形態、浮遊細胞塊形成能、薬剤耐性能、浸潤能、ならびに造腫瘍能を検討した。これらの悪性形質に同時に関与しうる microRNA(miRNA)の網羅的解析を行い、同定した分子の細胞内導入ならびにアンチセンス型阻害剤によりそれぞれの分画における機能解析を行った。また、同定した miRNA の標的タンパクの網羅的解析および機能解析を行った。さらに、骨肉腫患者生検検体を用いて特定分子の発現および予後との関連性を統計学的に解析した(Kaplan-Meier analysis, log-rank test)。

【結果】

骨肉腫 CD133^{high} 分画にがん幹細胞性質を示す細胞が存在する

骨肉腫細胞株(SaOS2, HOS, MG63, HuO9, MNNG/HOS, 143B)ならびに患者生検検体において CD133^{high} 分画は 10%以下の割合で存在した。この分画は自己複製能力と分化能を同時に有し、浮遊細胞塊形成能力を持つとともに薬剤抵抗性及びより強い浸潤能を示すことが判明した。また、CD133^{high} 分画において自己複製、薬剤排出ポンプおよび転移に関与するマーカーは発現亢進を示し、動物生体内において強い造腫瘍性を示すことが判明した。

miR-133a は骨肉腫がん幹細胞様性質を制御する

骨肉腫 SaOS2 株 CD133^{high} 分画および CD133^{low} 分画における miRNA の microarray 解析の結果、CD133^{high} 分画において miR-1, 10b, 133a の発現亢進が示された。そのうち miR-133a の細胞内導入により、CD133^{low} 分画の浸潤能が亢進することが判明した。

LNA-antimiR-133a によって CD133^{high} 分画の浸潤能は抑制される

miR-133a の機能阻害ががん幹細胞様形質に対しどのような影響があるかを評価するため、

miRNA 阻害剤の一つである locked nucleic acid(LNA)を用いて機能解析を行った。SaOS2 株 CD133^{high/low} 分画をそれぞれ分取し、LNA-antimiR-133a ならびに control(LNA-NC)を導入して解析した結果、CD133^{high} 分画の浸潤能が低下することが判明した。

miR-133a の発現は化学療法によって誘導される

骨肉腫高転移株である 143B 株で同様の解析を行ったところ、LNA-antimiR-133a により 143B の強い浸潤能が抑制された。また、骨肉腫治療に用いられるドキソルビシン(DOX)、シスプラチン(CDDP) の暴露により、CD133 とともに miR-133a の発現が亢進することが判明した。これらの結果から、化学療法に際して miR-133a を機能阻害することが治療抵抗性誘導の抑制に重要であると考えられた。

担癌動物に対する LNA-antimiR-133a の全身投与により骨肉腫肺転移が抑制され生存期間の延長が観察された

miR-133a 機能阻害が生体内でどのような効果をもたらすかを評価するため、骨肉腫自然肺転移モデルを用いて解析を行った。ルシフェラーゼ発現 143B 株(143B-Fluc)をヌードマウスの脛骨内に移植し、以下の治療群に分けて評価した；①生食・生食群、②LNA-NC・生食群、③LNA-133a・生食群、④LNA-NC・CDDP 群、⑤LNA-133a・CDDP 群の 5 群である (LNA-NC, 133a; 10mg/kg, CDDP; 3.5mg/kg)。なお、腫瘍内の miR-133a 発現抑制には drug delivery system を必要とせず、LNA-antimiR-133a 尾静注のみで十分な効果が確認された。経過観察の結果、CDDP 群(④・⑤)で有意な腫瘍縮小が得られたが、LNA-antimiR-133a 併用の有無による腫瘍サイズの変化はみられなかった。一方、*in vivo* イメージングによる肺転移形成は①群：9 匹、②群：8 匹、③群：7 匹、④群：8 匹、⑤群：3 匹 (いずれも n=10) であり、LNA-antimiR-133a とシスプラチンの併用群において肺転移形成は最も強く抑制された。また、他群と比し⑤群において有意な生存期間の延長が観察された。miR-133a の配列はヒトおよびマウスの種間で保存されているが、経過観察中に明らかな毒性はみられなかった。

miR-133a による治療効果は複数のがん抑制性の標的遺伝子を介して得られている

miR-133a 導入による更なる分子機構の解明のため、Ago-2 複合体に対する免疫沈降ならびに miR-133a 導入による mRNA の変化の microarray 解析から miR-133a の標的分子を同定した結果、がん抑制性機能を有する複数の標的遺伝子が同定された。それぞれの siRNA を用いた機能解析から、SGMS2, UBA2, SNX30, ANXA2 が浸潤能制御に関与していることが判明した。これらの分子の 3' UTR に存在する結合部位を調べ、その塩基配列に基づいた 3' UTR assay により、標的遺伝子の発現が miR-133a によって制御されていることを確認した。また、動物治療モデルにおける LNA-antimiR-133a により SGMS2 および ANXA2 が腫瘍内で亢進していることを免疫染色及び定量 PCR で確認した。

腫瘍内 miR-133a およびその標的遺伝子の発現は骨肉腫患者の予後と相関する

骨肉腫臨床検体における miR-133a の発現を 2010 年からの新鮮切除生検組織 2 例を用いて解析した結果、骨肉腫 CD133^{high} 分画における miR-133a は CD133^{low} 分画と比べ亢進していることが判明した。さらに、臨床背景との相関を確認するため、1997 年～2010 年に国立がん研究センター中央病院で得られた生検検体 48 例を対象に miR-133a の発現を解析した。その結果、腫瘍内 miR-133a の発現亢進が患者予後不良と有意に相関していることが見出された。また、標的遺伝子の発現亢進は、患者予後良好と有意に相関していることが見出され、本分子を治療標的とする意義が示された。

【考察】

がん治療は今、がん組織に潜む治療抵抗性の高い、あるいは、治療抵抗性を獲得した細胞集団にどう対処していくかという新たな課題に直面している。「がん幹細胞理論」は未だその全貌は明らかになっていないが、このようながん組織内の機能的不均一性に着目した様々ながん種の治療開発に寄与している。我々は骨肉腫組織内のより強い悪性形質を示す細胞集団を同定、現行治療法に「次世代の薬」として期待されている核酸製剤を加えた新しい前臨床試験を行い、以下の

4つの事項を明らかにした。

第一に、骨肉腫 CD133^{high} 分画にはがん幹細胞様性質を担う細胞が enrich されていることである。この分画は非対称性分裂、薬剤耐性、浸潤能、造腫瘍能といったがん幹細胞様性質を示した。この分画を狙い撃つことが必要と考えられるが、CD133 は正常骨髄細胞などにも発現がみられることから、標的とするには安全性が問題となる。従ってこの分画の性質および分子機構を解析し、特有の pathway の制御を介して悪性形質を抑制することが重要と考えられた。

第二に、この分画の性質に関与する miR-133a を特定した。この miR-133a の機能阻害と抗がん剤の併用により CD133 の下流における pathway の変化を経て骨肉腫の進展が抑制されることが判明した。miR-133a の標的遺伝子として特定された SGMS2, UBA2, SNX30, ANXA2 の一部は他のがん種を含めがん抑制性の機能を示すことが報告されており、骨肉腫における新たな機能分子の更なる解析が望まれる。

第三に、LNA はアンチセンス型 miRNA 阻害剤として固形がん治療に有効性を示すことが判明した。LNA は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 型となるように化学修飾す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。既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ている。この研究は既に第 II 相臨床試験に入っており、新規核酸医薬として注目されている。しかし固形がんに対しての有効性試験の報告は無く、我々の研究は LNA を用いた固形がんに対する初めての前臨床試験となる。核酸医薬のがん治療への応用という意味においても、LNA-antimiR-133a の骨肉腫治療における有効性の確認は大きな意義を有する。

第四に、骨肉腫がん幹細胞様性質を制御する miR-133a は骨肉腫における新たな予後不良因子であることが判明した。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。しかし骨肉腫において、がん幹細胞マーカーならびにその制御分子における予後解析の報告は未だなされておらず、我々の報告が初めての知見となる。

本研究により、骨肉腫の組織不均一性と治療抵抗性との関連が明らかとなり、複数の標的遺伝子を持つ miRNA の機能阻害により悪性形質を制御できる可能性が示された。さらに臨床検体の解析により miR-133a 阻害の治療的意義も示された。LNA は新規核酸製剤としてその可能性が期待されているが、固形がんにおいては初めての前臨床試験であり、肉腫治療においてもその効果が期待される。

【結論】

骨肉腫 CD133^{high} 分画に対する miR-133a の機能阻害により、複数のがん抑制性遺伝子の発現制御を介して同分画の致死的性質である浸潤能は抑制された。また担癌動物に対する LNA-antimiR-133a と抗がん剤との併用により肺転移形成は抑制され、生存期間の延長が観察された。患者検体における miR-133a 発現高値および標的遺伝子発現低値は予後不良と関連しており、miR-133a 分子を治療標的とする意義が示された。