

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19390386
研究課題名（和文）
滑膜肉腫癌遺伝子 SYT-SSX の病態解明と新規治療法の開発
研究課題名（英文）
Analysis of synovial sarcoma oncogene SYT-SSX for development of new therapy
研究代表者 田中 伸哉 (TANAKA SHINYA)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70261287

研究成果の概要（和文）：

本研究は滑膜肉腫発生メカニズムを解明し新規治療法の開発の基盤技術の確立を目指すものである。結果としてはシグナル伝達アダプター分子 Crk-p38 系が滑膜肉腫の悪性能に必須であることを明かにし、Crk が治療標的となることを解明した。また SYT-SSX トランスジェニックマウスおよび SYT ノックアウトマウスを樹立した。本研究で樹立した滑膜肉腫モデルマウスは今後分子メカニズムに基づいた治療法の開発に重要な役割を果たすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to analyze the transforming mechanism of human synovial sarcoma-associated oncogene SYT-SSX and to establish the basic system for the development of new therapy. We originally proved that SYT-SSX is responsible oncogene for human synovial sarcoma, and in this study, we found that signalling adaptor protein Crk is involved in malignant feature of synovial sarcoma and one of the map kinase family protein as p38 plays an important role. Furthermore, SYT-SSX transgenic mice which develop synovial sarcoma and also SYT knockout mice were established in this study. The mice model of human synovial sarcoma should be expected to provide versatile effect for the evaluation of new therapeutic reagents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：癌遺伝子研究

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：滑膜肉腫、SYT-SSX、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス、シグナル伝達、CRK

1. 研究開始当初の背景

本研究は滑膜肉腫発生メカニズムを

詳細に解明し、モデル動物を作成し、発癌の分子メカニズムに基づく治療法の開発の基盤技術の確立を目指すものである。滑膜肉腫は若年成人の四肢、関節近傍に好発する腫瘍であり、外科切除後も転移性の再発率は高く、10年生存率は約15-30%と報告されており予後不良である。再発の予防を含め、癌化のメカニズムに基づく根本的な治療法の開発が急務となっている。滑膜肉腫では18番染色体とX染色体に相互転座t(X;18)(p11.2;q11.2)が認められ、18番染色体上のSYT(synovial sarcoma translocation)遺伝子とSSX(synovial sarcoma X breakpoint)遺伝子が融合したキメラ遺伝子SYT-SSXが形成される。現在、SYT-SSX遺伝子は診断のマーカーとして広く使われているが、野生型SYT及びSSX分子の機能が不明であることから、癌化のメカニズムも不明な点が多い。

申請者は、これまでにSYT-SSXが滑膜肉腫の原因遺伝子であることを初めて証明し、SYT-SSXがクロマチンリモデリング因子hBRMと結合することが癌化に必須であることを発見した(Nagai, et al. **PNAS**, 2001)。また、hBRMとの結合を阻害するペプチドが細胞レベルでは治療薬として作用する可能性も見出した。さらに、SYT-SSXは癌化能を有する一方で、細胞老化促進作用(cell senescence)を誘導することを見出しそのメカニズムを明らかにしてきた(Tsuda, et al. **Oncogene**, 2005)。また、シグナル伝達アダプター分子Crkが滑膜肉腫の増殖、運動、浸潤能に必須であり、Crkを抑制すると細胞は死滅することなしに、癌化能のみが選択的に抑制されることが明らかとなった(Watanabe, et al. **Mol. Cancer Res.** 2006)。

2. 研究の目的

本研究では、上記の結果を踏まえ、より正確な癌化のメカニズムを明らかにするとともに、滑膜肉腫のモデルマウスを作成し、分子メカニズムに基づいた治療法の開発を試みるものである。

3. 研究の方法

(1) SYT-SSXの癌化のメカニズムの解明について：①SYT-SSXの癌化には本質的にhBRMを中心とするクロマチンリモデリング複合体との結合が必要であり、SYTのN末端73アミノ酸が重要であることが示されているが、クロマチンのダイナミックな構造変換にはHP1やSUV39など様々な分子が関与する。滑膜肉腫が未分化間葉系細胞のみを癌化することを考えると、特異的分子が想定される。本研究では、Pull down assay および TOF-MASS 解析を行い腫瘍化に必須の分子を同定することを試みる。②SYT-SSXのp21を介する細胞老化促進メカニズムに関しては転写因子Sp1依存性であることが判明しているが、ライブラリースクリーニングを行い負の調節分子を同定する。③滑膜肉腫の浸潤能に関してHGF(hepatocyte growth factor)受容体からのシグナル伝達機構を明らかにし、特に中心的役割を果たすCrk分子の活性化の分子メカニズムを明らかにする。

(2) 薬剤スクリーニングについて：癌化の作用機序に基づいて、4つのポイントに作用する薬剤開発を目指す。特にクロマチンリモデリングに関しては、アセチル化、脱アセチル化阻害剤に焦点を当ててスクリーニングを行う。さらに、申請者らが同定したhBRMとSYT-SSXの結合を阻害するペプチドについては、in silicoで分子設計を試み、化合物ライブラリーをスクリーニングする。また、浸潤能に必須のCrk分子については、NMRを用いた3次元構造の解析が終了したばかりであり、シグナル阻害剤の分子設計を試みる。

(3) 滑膜肉腫のモデルマウスについて：SYT-SSXを恒常的に発現するマウスはすでに得られており、単独では腫瘍発生はみられない。そこで、p53欠損マウスあるいはp21欠損マウスと遺伝的に交配を行いモデル作成を行う。また、SYT-SSXが胎性でtoxicである場合を考慮してSYT-SSX

発現誘導トランスジェニックマウスも作成する。

(4) 候補薬剤の *in vivo* での効果判定について：上記(2)の解析にて腫瘍抑制効果の認められた薬剤を(3)で作成したモデルマウスに *in vivo* で投与し増殖抑制能を検討する。同時に副作用の有無についても検討を行う。また外科切除後に局所に投与することで再発抑制効果を検討し、ヒト滑膜肉腫の治療法の基盤となる技術の確立を目指す。

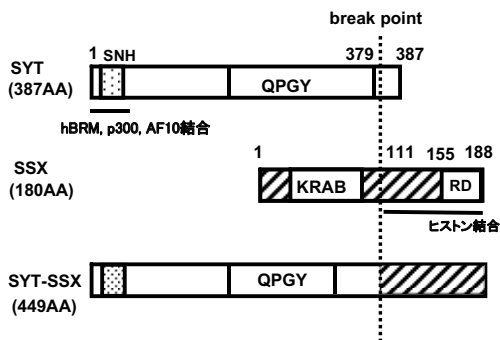


図1 SYT, SSX, SYT-SSX の構造

4. 研究成果

(1)SYT ノックアウトマウスの作成：SYT-SSX キメラ遺伝子の癌化機構を解明する場合には、本来の SYT および SSX 分子（図1）の生理機能を明らかにすることは不可避である。この目的を達するために、申請者らは SYT ノックアウトマウスの作成をした。その結果 SYT ホモ欠損マウスは胎性致死となり、SYT は個体形成に必須の分子であることが判明した。SYT(-/-)マウスは図2のように neural tubule の閉鎖不全と心嚢水腫および心室壁形成異常がおこる。この心臓の表現形は BAF60c などのクロマチンリモデリング因子に共通して見られるものであり、SYT は個体発生段階に於てもクロマチン制御に関連して重要な役割を担っていることが明らかとなっている。また、図3に示すように p300 の発現が著明に低下しており、SYT は p300 の発現制御に関連する可能性も示唆された。

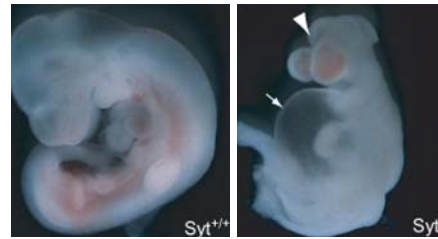


図2 SYT ノックアウトマウス。左) 野生型、右) SYT(-/-)。著明な心嚢水腫と神経堤の閉鎖異常がみられる。

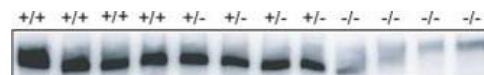


図3 p300 のウエスタンブロット
SYT(+/+), SYT(+/-), SYT(-/-) whole embryo

(2)滑膜肉腫モデルマウスの作成：これまでの研究において申請者らはSYT-SSX1のトランスジェニックマウス作成を試みた。プロモーターはubiquitousに高発現が期待できるCAG (chicken actin globin fusion)プロモーターを使用し計約150匹の出産マウスにおいて遺伝子導入を試みたが、遺伝子導入を検出できなかった。原因としてはSYT-SSXがp21誘導能を有する事からSYT-SSX1は発生過程で致命的に作用することが考えられた。本研究では、この問題を解決するために、CAG promoterに比してやや活性が弱いCMV promoterを用いてSYT-SSXトランスジェニックマウスを作成した。しかしながらこの系では腫瘍形成マウスを得ることができなかった。そこで p53(+/-)マウスと交配させることで、いくつかの腫瘍形成を認め、病理組織学的に紡錘形細胞を主体とするものの一部には、管腔形成がみられ、biphasic typeの滑膜肉腫に類似した所見であった。

また、SYT-SSXの発現を誘導するためにテトラサイクリン存在下でSYT-SSXの発現誘導可能なプロモーターを使用しトランスジ

エニックマウスを作成した。現在 pTRE-tet-off- SYT-SSX1 遺伝子導入した heterozygous 個体を得ている。今後は homozygous を作成するとともにテトラサイクリン発現制御因子 hCMVrtTA を組み込んだマウスを Jackson 社より購入し、かけ合わせて SYT-SSX1 発現誘導マウスを作成し、腫瘍発生の有無を検討する。

(3) シグナルアダプター分子 CRK による滑膜肉腫細胞悪性化メカニズムの解析: CRK は SH2/SH3 領域からなるアダプター分子であり、チロシンキナーゼから低分子量 G 蛋白へシグナルを伝達する。近年 CRK はヒト癌腫、脳腫瘍のいずれにおいても浸潤・転移など腫瘍細胞の悪性能に必要であることが示されてきた。しかし、CRK の下流のシグナルは単一ではなく CRK/C3G/Rap 経路、CRK/Dock180/Elmo/Rac 経路などが活性化されるが、癌化のメカニズムは不明な点が多い。申請者らは、滑膜肉腫細胞 Fuji、SYO1 細胞において CRK は Gab1 の Tyr307 のリン酸化を誘導し、GabY307F 変異体では、細胞運動が低下することを明らかにした。特に membrane の ruffling 自体には異常が見られないものの、細胞接着斑 (focal complex/or adhesion) の局在が leading edge 付近に形成されない現象を見出した(図 4)。さらに Gab1 の Y307 のチロシンリン酸化に Src が関与することを明らかにした。また、Crk は Gab1 を介して p38 を活性化することを明らかにした。

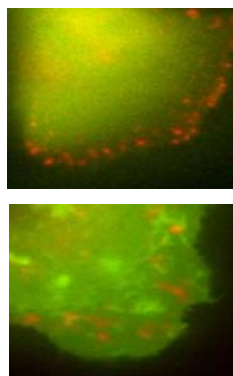


図 4 滑膜肉腫細胞株における Gab による CRK の局在変化
(上) Gab1+CRKI (下) Gab1-Y307F+CRKI

さらに詳細な CRK シグナルメカニズムを解明するために、CRK の下流分子で、癌細胞の浸潤に関与する Dock180 に焦点をあてて解析をおこなった。ELMO1 は Dock180 結合分子であるが ELMO1 は src family tyrosine kinase によりチロシンリン酸化を受け、その事によって Dock180 の Rac 活性化能を増加することを明らかにした。ELMO1 のリン酸化部位を明らかにし、そのリン酸化部位に変異を導入した変異体を恒常的に発現した細胞株を作成し、細胞運動能を測定したところ、運動能の低下がみられた (図 5)。

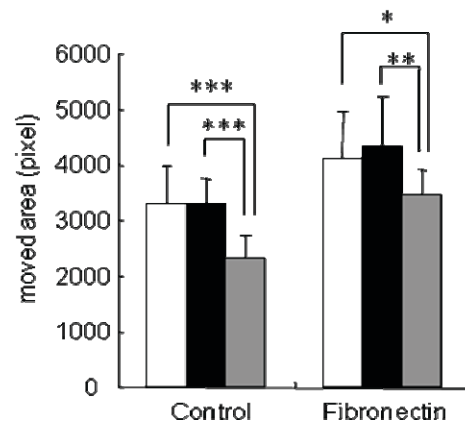


図 5 ELMO1 のリン酸化変異体による細胞運動能の低下

(4) CRK のシグナル伝達を抑制する薬剤開発スクリーニング系の確立: CRK 分子は滑膜肉腫の治療標的になることが判明したため CRK 阻害剤をスクリーニングする系を樹立した。単一の遺伝子変化に対応する薬剤スクリーニングの系を確立した (図 6)。正常細胞を hTERT と SV40TA_g にて不死化した細胞を樹立し (Mol. Cancer, 2006)、そこに 1 遺伝子のみ発現させ (図 4 GeneX)、ホタルおよびウミシイタケのルシフェラーゼを導入し共培養する。この系を用いて化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、増殖抑制効果を有する化合物を同定する。具体的には活性化型 AKT の有無のみが異なる腫瘍細胞を用いて、dual luciferase assay を行い 96 well プレートで薬剤をスクリーニングして、阻害薬を同定した。今後この系を用いて Crk 特異的シグナル

阻害薬の同定を目指す。

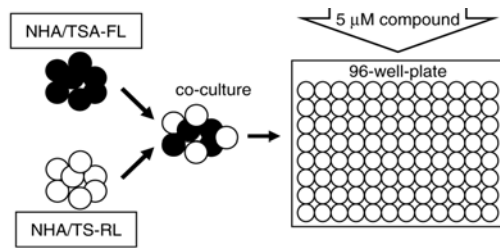


図6 Dual luciferase assay による分子特異的シグナル抑制薬剤のスクリーニング法の樹立

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 19 件)

1. Kimura, T., Sakai, M., Tabu, K., Wang, L., Tsunemitsu, R., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., Nishihara, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ladanyi, M., Tanaka, S., Nakayama, K. I. Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. **Lab. Invest.** Mar 30. 2009.
2. Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Konstantinou T., Nishihara, H., Majima, T., Minami, A., Feller, S. M., Tanaka, S. Crk adaptor protein-induced phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. **Cell Res.**, 19, 638-650, 2009.
3. Inuzuka, T., Tsuda, M., Tanaka, S., Kawaguchi, H., Higashi, Y., Ohba, Y. Integral role of transcription factor 8 in the negative regulation of tumor angiogenesis. **Cancer Res.**, 69, 1678-1684, 2009.
4. Miura, M., Ohnishi, N., Tanaka, S., Yanagiya, K., Hatakeyama, M. Differential oncogenic potential of geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA isoforms in mice. **Int J Cancer**, 125, 2497-2504, 2009.
5. Yokota, T., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Matsushima, S., Inoue, N., Ohta, Y., Hamaguchi, S., Sobiri, M. A., Ono, T., Suga, T., Kuroda, S., Tanaka, S., Terasaki, F., Okita, K., Tsutsui, H. Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 297, 1069-1077, 2009.
6. Birge, R. B., Kalodimos, C., Inagaki, F., Tanaka, S. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. **Cell Commun Signal.**, 7, 13, 2009.

7. Sasai, K., Nodagashira, M., Nishihara, H., Aoyanagi, E., Wang, L., Katoh, M., Murata, J., Ozaki, Y., Ito, T., Fujimoto, S., Kaneko, S., Nagashima, K., and Tanaka, S. Careful exclusion of non-neoplastic brain components is required for an appropriate evaluation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioma. **Am. J. Surg. Pathol.**, 32, 1220-1227, 2008.
8. Tabu, K., Sasai, K., Kimura, T., Wang, L., Aoyanagi, E., Kohsaka, S., Tanino, M., Nishihara, H., Tanaka, S. Promoter hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas. **Cell Res.**, 18, 1037-1046, 2008.
9. Satoh, T., Arii, J., Suenaga, T., Wang, J., Kogure, A., Uehori, J., Arase, N., Shiratori, I., Tanaka, S., Kawaguchi, Y., Spear, P. G., Lanier, L. L., and Arase, H. PILRα is a herpes simplex virus-1 entry co-receptor that associates with glycoprotein B. **Cell**, 132, 935-944, 2008.
10. Wang, L., Sasai, K., Akagi, T., Tanaka, S. Establishment of a luciferase assay-based screening system: fumitremorgin C selectively inhibits cellular proliferation of immortalized astrocytes expressing an active form of AKT. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 373, 392-396, 2008.
11. Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T., Hatakeyama, M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 105, 1003-1008, 2008.
12. Mishima, T., Iwabuchi, K., Fujii, S., Tanaka, S., Ogura, H., Watano-Miyata, K., Ishimori, N., Andoh, Y., Nakai, Y., Iwabuchi, C., Ato, M., Kitabatake, A., Tsutsui, H., and Onoe, K. Allograft inflammatory factor-1 augments macrophage phagocytotic activity and accelerates the progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **Int. J. Mol. Med.**, 21, 181-187, 2008.
13. Yanagi, T., Akiyama, M., Nishihara, H., Sakai, K., Nishie, W., Tanaka, S., and Shimizu, H. Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects. **Human Mol. Genetics**, 17, 3075-3083, 2008.
14. Kobashigawa, Y., Sakai, M., Naito, M., Yokochi, M., Kumeta, H., Makino, Y., Ogura, K., Tanaka, S., and Inagaki, F. Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. **Nature Struct & Mol. Biol.**, 6, 503-510, 2007.
15. Sasai, K., Akagi, T., Aoyanagi, E., Tabu, K., Kaneko, S., and Tanaka, S. O⁶-methylguanine-DNA

methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: implications for anti-glioma therapies. **Mol.Cancer**, 6, 36, 2007.

16.Tabu,K.,Ohba,Y.,Suzuki,T.,Makino,Y.,Ohnishi,A., Sakai, M., Watanabe, T., Kimura, T., Tanaka, S., and Sawa, H.Expression of OLIG2 suppresses the motility of human glial tumor cell line via RhoA activation. **Mol.Cancer Res.**, 5, 1099-1109, 2007.

17.Wang,L.,Tabu,K.,Kimura,T., Tsuda, M., Linghu, H., Tanino, M., Kaneko, S., Nishihara, H., Tanaka, S. Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4. **Biochem Biophys Res Commun.**, 362, 976-981, 2007.

18.Nishihara,H., Tateishi,U.,Itoh,T.,Nagashima,K., Tanaka,S. Immunohistochemical and Gene Rearrangement Studies of Central Nervous System Lymphomatoid Granulomatosis. **Neuropathology** 27: 413-417, 2007.

19.Katayama,T.,Nakanishi,K.,Nishihara,H.,Kamiyama,N.,Nakagawa,T.,Kamiyama,T.,Iseki,K.,Tanaka, S., and Todo, S. Type I interferon prolongs cell cycle progression via p21 WAF1/CIP1 induction in human colon cancer cells. **Int. J. Oncol.**, 31: 613-620, 2007.

[学会発表] (計 12 件)

1) 西原広史, 村上普美, 木村憲一, 佐和弘基, 鎌田一, 田中伸哉: 髄膜腫におけるDOCK180の発現の検討. 第 50 回日本神経病理学会 2009. 6. 4. -6 高松

2) 田中伸哉, 大森優子, 榊康一, 野田頭未歩, 青柳瑛子, 伊藤民雄, 中村博彦, 西原広史, 笹井研: GlioblastomaにおけるCD133 の発現の免疫組織学的解析. 第 27 回日本脳腫瘍病理学会 2009. 5. 8-5. 9 福岡

3) 王磊, 西原広史, 田中伸哉: DOCK180 はHodgkin細胞に発現し、細胞の形態制御に重要な役割を果たしている. 第 98 回日本病理学会総会 2009. 5. 1-5. 3 京都

4) 高阪真路, 笹井研, 谷野美智枝, 野田頭未歩, 田中伸哉: Gliomaの腫瘍形成能におけるCHD5 の役割の検討. 第 98 回日本病理学会総会 2009. 5. 1-5. 3 京都

5) 津田真寿美, 渡部琢哉, 大場雄介, 田中伸哉: SYT-SSX1 トランスジェニックマウスはp53 ヘテロ環境下で滑膜肉腫様腫瘍を発生する. 第 67 回日本癌学会学術総会 2008. 10. 28-30 名古屋

6) 木村太一, 笹井研, 田賀哲也, 田中伸哉: ヒト腫瘍細胞におけるCD133 遺伝子の発現メカニズム. 第 67 回日本癌学会学術総会

2008. 10. 28-30 名古屋

7) 田中伸哉 特別講演: トランスレーショナル・パソロジーを目指して. 第 88 回北海道医学大会病理分科会・第 41 回北海道病理談話会 2008. 9. 20 札幌

8) 谷野美智枝, 王磊, 西原広史, 松野吉宏, 矢野聖二, 曾根三郎, 田中伸哉: 胸膜中皮腫におけるシグナルアダプター分子CRKの役割の解析. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 2008. 6. 15-17 神戸

9) 田中伸哉, 野田頭未歩, 青柳瑛子, 加藤正仁, 村田純一, 伊東民雄, 尾崎義丸, 藤本真, 金子貞夫, 西原広史, 笹井研, 長嶋和郎: MGMT発現評価は病理組織学的に腫瘍と非腫瘍成分を識別することが重要である. 第 26 回日本脳腫瘍病理学会 2008. 5. 23-24 東京

10) 田中伸哉, 野田頭未歩, 青柳瑛子, 王磊, 西原広史, 長嶋和郎, 笹井研: 悪性膠腫におけるMGMT発現の解析: 免疫染色法とメチル化特異的PCR法の比較. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会 2008. 5. 20-22 東京

11) 榊康一, 笹井研, 木村太一, 谷野美智枝, 青柳瑛子, 王磊, 高阪真路, 西原広史, 田中伸哉: 悪性膠腫におけるCD133 発現の分子細胞病理学的解析. 第 97 回日本病理学会総会 2008. 5. 15-17 金沢

12) 野田頭未歩, 青柳瑛子, 笹井研, 王磊, 西原広史, 長嶋和郎, 田中伸哉: 悪性膠腫におけるMGMT発現の病理組織学的解析. 第 97 回日本病理学会総会 2008. 5. 15-17 金沢

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 伸哉 (TANAKA SHINAY)

研究者番号: 70261287

北海道大学・大学院医学研究科・教授

(2) 研究分担者

西原 広史 (NISHIHARA HIROSHI)

研究者番号: 50322805

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

三浪 明男 (MINAMI AKIO)

研究者番号: 20133738

北海道大学・大学院医学研究科・教授