

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2007～2008
課題番号：19890088
研究課題名（和文） 滑膜肉腫関連 SYT / SSX 遺伝子のオーロラ遺伝子に対する作用と分子標的治療の探究
研究課題名（英文） The study on the function of synovial sarcoma related SYT/SSX fusion gene against Aurora genes and its application for molecular targeting therapy.
研究代表者 増田 剛宏（MASUDA TAKAHIRO） 岐阜大学・医学部附属病院・助教 研究者番号：20444250

研究成果の概要： 悪性骨軟部腫瘍は小児に高頻度で見られ、現在でもなお生命予後不良で治療へむけた研究は大きく遅れている。一方、オーロラキナーゼは細胞分裂の多くの過程に関与し癌組織でも観察されるため、オーロラキナーゼと腫瘍関連遺伝子、特に SXT/SSX との関連を追及することが本研究の目的である。まずは骨肉腫、滑膜肉腫などの骨軟部腫瘍培養細胞のオーロラの過剰発現の検証、オーロラ A、B プロモーター部分を、滑膜肉腫細胞（Cell line Fuji）に導入した際のオーロラの相対的活性化度の検証を行い、オーロラの過剰発現を証明した。次いで線維芽細胞腫細胞（Cell line HT1080）に SYT/SSX+93（SYT 部分が通常より+93 の塩基配列を有する滑膜肉腫細胞）と SYT/SSX-93（通常の滑膜肉腫細胞）、SYT+93、SYT-93 の 4 種類のプラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、オーロラ A、B とともに、すべてのプラスミドにおいて（特に SYT/SSX1+93 が）有意な相対的活性上昇を認めた。また deletion study において、オーロラ A、B プロモーターともに一定の場所で有意な活性低下を認め、そこに何らかの転写因子の結合部位があることが示唆された。さらに SYTSSX-93 をもつ滑膜肉腫細胞（Fuji）に対して SiRNA を作成して導入したところ、STY/SSX の発現減少を認めた。一方、マウスに導入すべく、SYT/SSX+93 をテトラサイクリンで発現コントロールが可能なベクター（pTREhyg2）に組み込んでプラスミドを作成している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・整形外科学

キーワード： 遺伝子、滑膜肉腫、分子生物学、ゲノム、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍は小児に高頻度で見られ、現在でもなお生命予後不良な疾患であるが、

癌に比べ症例数が少ないため、治療へむけた研究は大きく遅れているのが現状である。またユーイング肉腫、滑膜肉腫などで、分子生

物学的異常な融合遺伝子 EWS/Fli-1、SYT/SSX などが産生される。

我々はこれまで、ユーイング肉腫をはじめとする、軟部組織発生メラノーマ、横紋筋肉腫などに発現しているキメラ遺伝子、特に EWS/Fli-1 蛋白の解析を中心に行ってきた。そして EWS/Fli1 蛋白が塩基配列特異的な DNA 結合蛋白であり強力な転写因子であること、アンチセンスにより抑制することにより造腫瘍性が消失すること⁵⁾、RNA 結合蛋白であることなどを示し、さらに、これらの遺伝子の発癌、分化、シグナル伝達における意義、siRNA により異常融合遺伝子発現を制御でき、細胞増殖を抑制可能であることなどについて報告してきた。また、滑膜肉腫に特異的な融合遺伝子 SYT/SSX に関して、これまで転写活性因子であることなどが報告されているが、その癌化関与のメカニズム、生理的機能など、ほとんど明らかになっていない。よって今後、これら発癌に直接関与しているとされる融合遺伝子の protein-protein-interaction を時間的、空間的に詳細に解析し、分子標的治療に向けてさらに研究を推進することが急務であると考えられる。

一方、オーロラキナーゼは細胞分裂における多くの過程に関与し、その過剰発現が、乳がん、肝がん、大腸がん、膵がんなど、種々のヒトがん組織で観察され、様々な転写活性因子との関与などが報告されている。しかし、悪性骨軟部腫瘍領域においては、まだ研究がなされておらず、異常細胞増殖という点で類似しているため、その関与の可能性が十分予想される。

2. 研究の目的

悪性骨軟部腫瘍領域におけるオーロラ遺伝子の関与、過剰発現の有無の確認について、特に滑膜肉腫に特異的である異常融合遺伝子 SYT/SSX との関連性を検証し、分子標的治療のターゲットとなりうるかを、マウスを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨軟部腫瘍におけるオーロラ遺伝子の発現

骨肉腫、滑膜肉腫、ユーイング肉腫などの骨軟部腫瘍の培養細胞、RT-PCR によりオーロラ遺伝子の転写活性を視覚的に把握する。このとき、線維芽細胞 (NIH3T3) をコントロールとして用い、これらを特殊なソフト (Multigauge: Fujifilm) にて定量化し、正常細胞と腫瘍細胞の RNA 転写活性を比較する。また、細胞より蛋白を抽出し、ウエスタンブロットで蛋白レベルでの確認を行う。

(2) 滑膜肉腫におけるオーロラ遺伝子の解析

肉腫発現関連遺伝子として SYT/SSX および滑

膜肉腫とオーロラ遺伝子 A および B との関連を解析する。具体的には、クロマチン免疫沈降、ルシフェラーゼアッセイを用いる。

クロマチン免疫沈降により、SYT/SSX 蛋白がオーロラプロモータ部分に結合することをまずは確認する。つまり、FLAG を有する SYT/SSX のプラスミドをクローニングし、オーロラ A もしくは B のプラスミドと同時に正常細胞 (NIH3T3) に導入する。もし、SYT/SSX 蛋白がオーロラに結合すれば、anti-FLAG 抗体により、蛋白 DNA 複合体が検出される。

(3) オーロラ遺伝子の正常細胞への導入

オーロラ遺伝子を正常細胞に導入し、過剰発現した際の細胞動態を Colony formation assay などにより解析する。この際、ダブル・チミジン・ブロックにより、細胞周期どの時期に転写活性が最も活発に行われているかの確認、および、SYT/SSX 蛋白による変化の検証も行う。

(4) オーロラ遺伝子に対する siRNA の導入

オーロラ遺伝子に対する siRNA および SYT/SSX に対する siRNA を作成後、これらを滑膜肉腫細胞、繊維肉腫細胞 (HT1080)、あるいは各種骨軟部腫瘍細胞に導入し、オーロラ活性度、細胞増殖数の変化などの検証を行う。siRNA による発現抑制は、これまでに EWS/Fli1 では確認されている。これによりオーロラ遺伝子に対する分子標的治療の可能性を探求する。

(5) マウスモデルを使った検証

さらには滑膜肉腫マウスモデル (SYT/SSX をもつトランスジェニックマウス) の作成をし、in vivo での siRNA などの分子標的治療効果判定を行う。

4. 研究成果

(1) オーロラの過剰発現は、種々の腫瘍細胞においても認められ、ウエスタンブロットで蛋白レベルでの確認も行った。

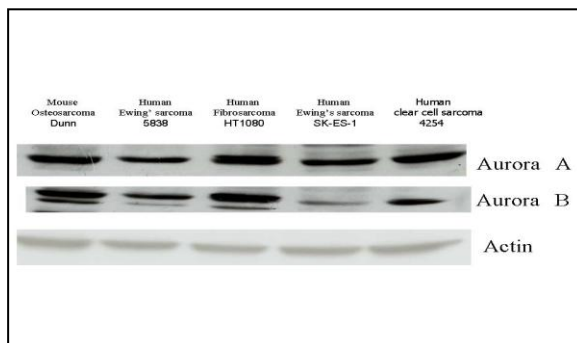


図1 各種骨軟部腫瘍におけるオーロラ A、B 蛋白の検出

(2) 滑膜肉腫発現関連遺伝子 SYT/SSX とオーロラキナーゼ A および B との関連を、ルシフェラーゼアッセイを用いて解析すべく、オーロラプロモータ部分を PGL3 ベクター

(Promega: ルシフェラーゼをレポータ遺伝子としてもつベクター) に組み込み、オーロラプロモータの活性化をルシフェラーゼで検出できるプラスミドを作成した。これを Cell line Fuji (SYT/SSX をもつ滑膜肉腫細胞) に導入して、ルミノメータにてオーロラの相対的活性化度を測定したところ、上昇を認めた。さらに Cell line HT1080 (線維芽細胞腫細胞) に SYT/SSX プラスミドとともに導入したところ、empty vector だけを導入した細胞と比較したところ、有意に活性化の上昇を認めた。

そのため、SYT/SSX とオーロラキナーゼ A および B との関連をさらに検証すべく、SYT/SSX+93 (SYT 部分が通常より+93 の塩基配列を有する滑膜肉腫細胞) と SYT/SSX-93 (通常の滑膜肉腫細胞)、SYT+93、SYT-93 の 4 種類におけるオーロラ A、B プロモーターによる転写活性をルシフェラーゼにて検証した。

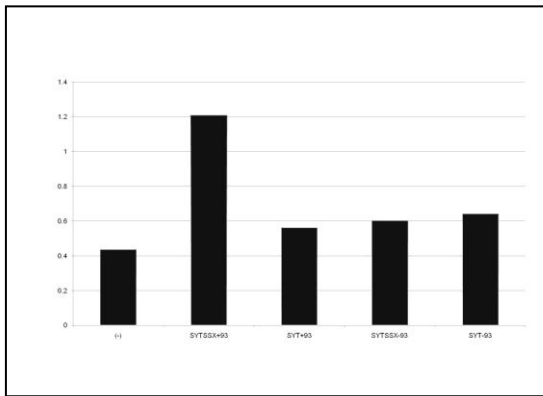


図2 オーロラ A と各種 SYT および SSX 蛋白に対するルシフェラーゼアッセイ

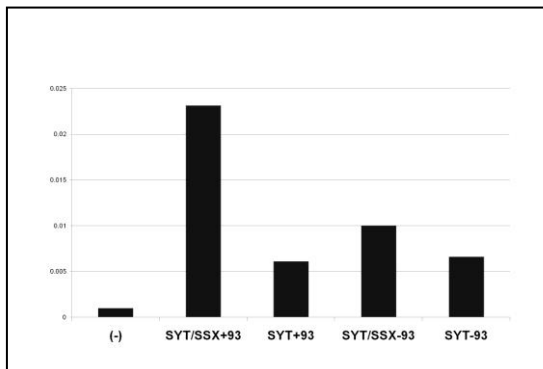


図3 オーロラ B と各種 SYT および SSX 蛋白に対するルシフェラーゼアッセイ

その結果、4 種類すべてにおいて、A、B ともにコントロールと比較して、有意な活性上昇を認めた。その中でオーロラ A、B ともに、

特に SYT/SSX+93 が高い活性度を示した。

次いでオーロラ A、B プロモーターのどの部分に SYT/SSX+93 蛋白が結合、活性化をするのかを検証すべくプラスミドと部分的に切断し短くしていったオーロラ A、B プロモータープラスミドを作成し、SYT/SSX+93 とコトランスフェクトし、同様にルシフェラーゼ活性にて検証を行った (deletion study)。結果、オーロラ A プロモーターは、-124 から -75 の間で相対的活性が低下したため、この間に SYT/SSX+93 蛋白との結合部分があると予測された。オーロラ B プロモーターについては、-104 と -74 の間で有意に相対的活性化の低下を認めたため、この間にそれぞれ SYT/SSX+93 蛋白あるいは、何らかの転写因子関連結合物質の結合部分があることが予測される。

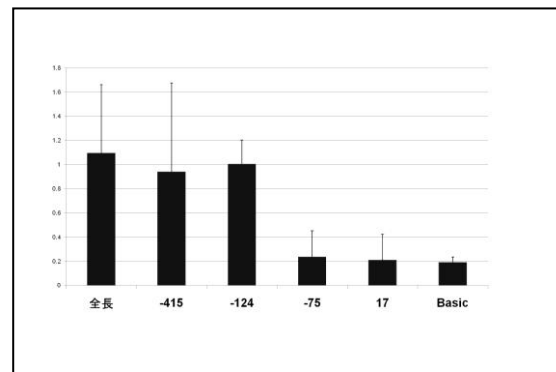


図4 オーロラ A の deletion study (SYT/SSX+93 と co-transfect)

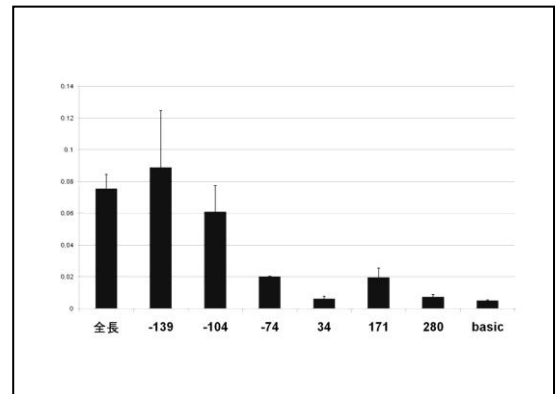


図5 オーロラ B の deletion study (SYT/SSX+93 と co-transfect)

今後、オーロラ A、B ともにこの部分に mutant をかけたプラスミドを作成し、活性化が消失することを確認する予定である。また、免疫沈降により蛋白 DNA 複合体の確認も行う予定である。

(3) オーロラ遺伝子の正常細胞への導入しての細胞周期の検証は、まだ行われていない。

(4) まずは SYT/SSX-93 をもつ滑膜肉腫細胞 (Fuji) に対して SiRNA を作成して導入したところ、SYT/SSX の発現減少を認めた。

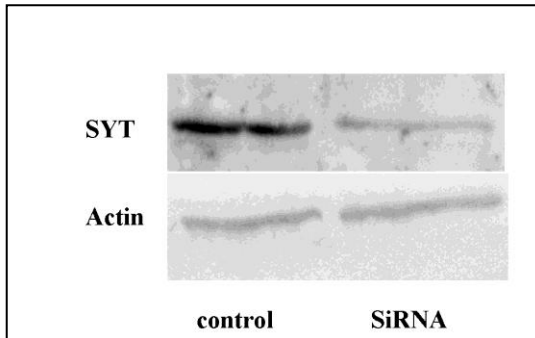


図6 滑膜肉腫細胞 (Fuji) に SYT/SSX-93 に対する SiRNA をトランスフェクトした後の蛋白発現

今後は、正常細胞、別の滑膜肉腫細胞 (HSSY-II) に対する SiRNA の効果、あるいは SYTSSX の濃度を変えて同様の実験を行う Density gradient study および SiRNA によるオーロラ活性の変化や細胞増殖の変化などの検証を行っていく予定である。また、オーロラ遺伝子に対する SiRNA の検証も、滑膜肉腫細胞および他の主要細胞において行いたい。

(5) さらに In Vivo においては、これまでの検証より発現が強いと予測される SYT/SSX+93 をテトラサイクリンで発現コントロールが可能なベクター (pTREhyg2) に組み込んでプラスミドを作成している段階である。今後、ES 細胞にエレクトロポレートし、細胞レベルでの SYT/SSX+93 の発現が確認され、stable な cell line を作成し、マウス embryo に導入していく予定である。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 剛宏 (MASUDA TAKAHIRO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20444250

(2) 研究分担者

大野 貴敏 (ONO TAKATOSHI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60281052

(3) 連携研究者