

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390420

研究課題名（和文） 細胞系譜特異的ノックアウトシステムを用いた滑膜肉腫モデルマウスの創成

研究課題名（英文） Establishment of mouse model of synovial sarcomas using lineage-specific gene targeting system

研究代表者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40273502

研究成果の概要（和文）：

滑膜肉腫が神経堤細胞を起源とすることを実証するために、P0 遺伝子を指標として特異的融合遺伝子である SYT-SSX 遺伝子が神経堤細胞で発現するマウスを作成した。発生初期より発現させた場合は、頭頸部の骨軟骨組織の著しい低形成のために出生直後に死亡したため、発現誘導型マウスを作成した。P0 遺伝子の発現に一致して、SYT-SSX 遺伝子及びその下流遺伝子の発現が誘導されることが確認でき、滑膜肉腫の発生過程を理解する上で、極めて有用なモデルの作成に成功した。

研究成果の概要（英文）：

To prove out hypothesis that cell-of-origin of synovial sarcomas (SS) is neural crest derived cells, we established transgenic mice in which the expression of SS-specific fusion gene, SYT-SSX was induced in neural crest cells using the P0 gene as a driver. The expression of fusion gene *in utero* inhibited the development of craniofacial bone and cartilage tissues causing stillbirth. Then we established inducible transgenic mice using tamoxifen-ER system. Treatment with tamoxifen successfully induced the expression of SYT-SSX and also its downstream gene in P0 positive cells, indicating that this mouse model is a useful tool to understand the development of synovial sarcomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：骨軟部腫瘍学、幹細胞生物学

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：滑膜肉腫、神経堤、融合遺伝子、ノックインマウス

1. 研究開始当初の背景

間葉系組織に発生する悪性腫瘍である肉腫は、分子遺伝学上、非特異的変異が主体で

ある腫瘍と特異的変異をもつ腫瘍とに二分される。前者の代表的なものが骨肉腫であり、癌抑制遺伝子である Rb 遺伝子及び p53 遺伝

子の変異が主体である。後者の代表が本研究で取り上げる滑膜肉腫であり、18番染色体とX染色体の相互転座によって発生するSYT-SSX1あるいはSYT-SSX2融合遺伝子の存在を特徴とする。この融合遺伝子変異は、感受性（個々の疾患において融合遺伝子が存在する率）と特異性（その融合遺伝子が検出される腫瘍における当該腫瘍の割合）の両面において、極めて高い値を示すことから、腫瘍発生過程を理解する上において、極めて有用な手がかりとなる。近年、申請課題に関連して、マウス発生工学を駆使したアプローチによって、極めて興味深い結果が得られてきている。申請課題で取り上げる滑膜肉腫は1910年に正常滑膜との類似した肉腫として報告された症例を端緒とする肉腫であるが、現在では滑膜起源説は否定され、起源細胞は未だ不明である。Capecchiらは一連の筋発生関連転写因子のCreマウスとの交配実験により、Myf5陽性細胞においてSYT-SSXを誘導した場合のみ、ヒト滑膜肉腫と類似した腫瘍が発生したことから、筋衛星細胞を起源とする説を提唱している(Halder, et al. Cancer Cell, 2007)。この結果は滑膜肉腫の細胞起源を理解する上で、貴重な情報を提供するものであるが、留意すべき点もある。筋発生初期に作用すると考えられるPax3あるいはPax7をCreのドライバーとして用いた場合、胎生致死となり腫瘍発生への関与の有無は確認できていない。またMyf5で発生した腫瘍は病理学的にはいくつかの類似点があるものの、全体の遺伝子発現パターンはヒト滑膜肉腫とかなり異なるものであった。一方で、融合遺伝子陽性腫瘍の起源が組織幹細胞であることを示す報告も相次いでいる。例えばユーイング肉腫においてEWS/Flt1遺伝子の発現を抑制すると間葉系幹細胞様の多分化能を獲得できること(Tirode, et al. Cancer Cell, 2007)、逆に間葉系幹細胞にEWS/Flt1遺伝子を導入すると多分化能が失われることが報告され(Riggi, et al. Cancer Res, 2008)、ユーイング肉腫の起源が間葉系幹細胞であることが提唱されている。更に本申請課題のキーワードである神経堤細胞と間葉系幹細胞の関連性に関して、少なくとも胎生期においては間葉系幹細胞は神経堤由来細胞が分化したものであることを示唆する報告がある(Takashima, et al. Cell, 2007)。つまり神経堤細胞は融合遺伝子をもつ腫瘍の細胞起源となりうると考えられる。

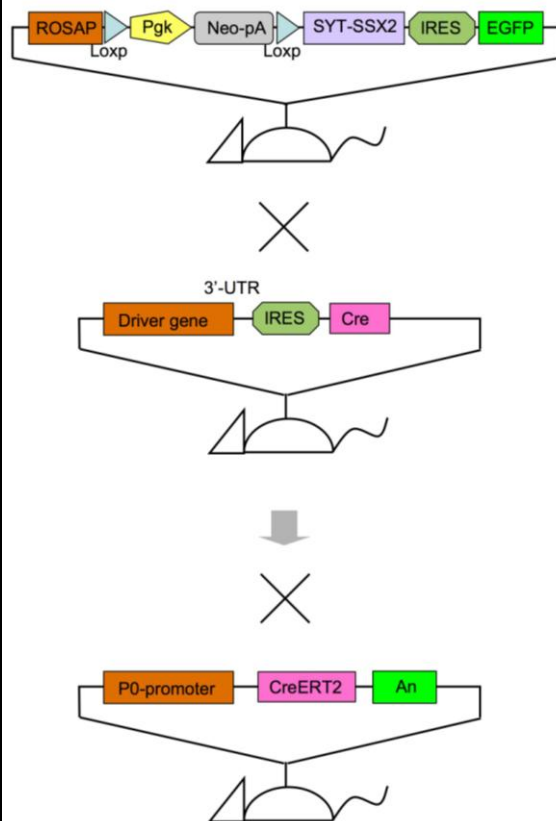
2. 研究の目的

本研究では、代表的な軟部肉腫である滑膜肉腫の細胞起源について、我々がこれまで提唱している神経堤由来細胞説を実証するために、マウス発生工学を駆使したアプローチにより神経堤由来細胞より滑膜肉腫を発生

させることを目指した。以上の研究により得られる成果は病態発生過程を正しく理解し、新たな治療法・創薬のための動物モデルを作成するために有意義なものとなることが期待される。

3. 研究の方法

- (1) 米国ユタ大学 M. Capecchi 博士らが作成した ROSA 遺伝子座に SYT-SSX 遺伝子が組み込まれ、その発現が Cre 遺伝子の発現に依存するマウス (ROSA-SSM2 マウス) を、滑膜肉腫発生モデルとして用いる。
- (2) 交配させるマウスとして神経提関連遺伝子の発現により Cre が誘導されるマウスを用いる。
- (3) 転写制御領域に Cre を結合させた遺伝子を導入したマウス IRESCreER カセットを用いて内在性遺伝子の発現にリンクさせ、かつ tamoxifen にて発現誘導可能なマウスを用いる。
- (4) 交配によって形成された腫瘍の病理組織学的検索、網羅的遺伝子発現検索等により、ヒト滑膜肉腫との類似性を解析し、ヒト滑膜肉腫細胞の細胞起源及び発癌機序を解明する。



4. 研究成果

- (1) ROSA-SSM2 マウスと P0-Cre マウスの交配

実験: ROSA-SSM2/P0-Cre マウスは、出生直後に死亡した。形態学的には四肢の形成は正常であったが、頭部及び顔面に著しい異常が認められた。脳表に向かって神経組織の層構造が不明瞭であった。精査の結果頭蓋骨及び顔面骨が殆ど形成されていないことが判明した。一方、脳組織も正常の層構造が形成されていなかった。これは頭頸部の骨軟骨組織が神経堤由来細胞により形成されることから、神経堤由来細胞において発生初期から SYT-SSX 遺伝子が神経堤由来細胞の正常な分化過程を阻害することを示唆し、我々の仮説を支持するデータであると考えられた。

- (2) ROSA-SSM2 マウスと Prxl-Cre マウスの交配実験: 一方、間葉系組織細胞の初期転写遺伝子である Prx をドライバーとして用いた Cre マウスとの交配実験では、予想に反して形態学的に正常なマウスが生まれた。詳細な組織解析が必要であるが、P0-Cre マウスとの相違は、やはり我々の仮説を支持する結果であると考えられた。
- (3) ROSA-SSM2 マウスと P0-CreERT2 マウスの交配実験: ROSA-SSM2 マウスと P0-Cre マウスが致死であったことから、生後にタモキシフェン投与により SYT-SSX の発現を誘導できるように P0-CreERT2 マウスとの交配を行った。生後 4 週より投与を開始し、2 週後に各組織における遺伝子発現を確認したところ、P0 遺伝子の発現と一致して Cre 及び SYT-SSX 遺伝子の発現が誘導されていることが判明した。更に我々が下流遺伝子として同定した FZD10 遺伝子の発現も誘導されており、SYT-SSX 蛋白が機能していることが確認できた。現在、複数のラインでこの結果を確認し、長期観察による腫瘍形成の有無を解析している。

以上より、当初の目標であった滑膜肉腫の起源が神経堤由来細胞であることを証明するためのモデルマウス系を確立することが出来た。

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 6 件)

- 1) Mitsui H, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Maruyama T, Kanaji T, Fujimura S, Sugihara H, Nishiura A, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. Prostaglandin E2 receptor type 2 receptor-selective agonist prevents the degeneration of articular cartilage in rabbit knees with traumatic instability, *Arthritis Res Ther* 2011; 13(5): R146. (査読有) <http://arthritis-research.com/content/13/5/R146>

- 2) Nishigaki T, Teramura Y, Nasu A, Takada K, Toguchida J, Iwata H. Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution, *Int J Dev Biol*, 2011; 55(3): 305-11. (査読有) <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=103145tn>
- 3) Furu M, Kajita Y, Nagayama S, Ishibe T, Shima Y, Nishijo K, Uejima D, Takahashi R, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Nakashima Y, Ikegawa M, Imoto S, Katagiri T, Nakamura Y, Toguchida J. Identification of AFAP1L1 as a prognostic marker for spindle cell sarcomas, *Oncogene* 2011; 30(38): 4015-25. (査読有) DOI: 10.1038/onc.2011.108.
- 4) Uejima D, Nishijo K, Kajita Y, Ishibe T, Aoyama T, Kageyama, Iwaki H, Nakamura T, Iida, Yoshiki T, Toguchida J. Involvement of cancer biomarker C7orf24 in the growth of human osteosarcoma, *Anticancer Res* 2011; 31(4): 1297-305. (査読有) <http://ar.iiarjournals.org/content/31/4/1297.abstract?sid=010f53b0-9eb4-4f97-9316-4b6362d91b81>
- 5) Nakayama R, Mitani S, Nakagawa T, Hasegawa T, Kawai A, Morioka H, Yabe H, Toyama Y, Ogose A, Nakayama, T, Toguchida J, Yoshida T, Ichikawa H. Gene Expression Profiling of Synovial Sarcoma: Distinct Signature of Poorly Differentiated Type, *Am J Surg Pathol* 2010; 34(11): 1599-607. (査読有) http://journals.lww.com/ajsp/Abstract/2010/11000/Gene_Expression_Profiling_of_Synovial_Sarcoma_.5.aspx
- 6) Aoyama T, Okamoto T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Ito K, Jin Y, Ueda M, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Histone modifiers, YY1 and p300, regulate the expression of cartilage-specific gene, chondromodulin-I, in mesenchymal stem cells, *J Biol Chem* 2010; 285(39): 29842-50. (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M110.116319

[学会発表] (計 16 件)

- 1) Tamaki S, Kato T, Toguchida J, et al. Epigenetic regulation of FZD10 by SYT-SSX fusion oncogene during the lineage commitment. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011. 12. 16 横浜)
- 2) 玉置さくら, 加藤友久, 戸口田淳也, 他. SYT-SSX のエピゲノム発現制御機構への関与. 第 70 回日本癌学会総会 (2011. 10. 3 名古屋)
- 3) 那須輝, 布留守敏, 吹上謙一, 中山富貴, 中村孝志, 古瀬幹夫, 戸口田淳也. 神経鞘由来腫瘍におけるクローディン 19 の発現様式. 第 70 回日本癌学会総会 (2011. 10. 4

名古屋)

- 4) Toguchida J. Tissue stem cell and sarcoma stem cell. Annual Congress of the Korean Bone and Joint Tumor Society (2011.4.15Suwon)
- 5) 玉置さくら、加藤友久、戸口田淳也、他. SYT-SSX のエピゲノム発現制御機構への関与. 第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.14 京都)
- 6) 那須輝、戸口田淳也、他. 神経鞘由来腫瘍におけるクローデイン 19 の発現様式. 第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.14 京都)
- 7) 岡本健、中山富貴、仲俣岳晴、坪山直生、戸口田淳也、渡邊健一郎、中村孝志. Etoposide を使用した高悪性度骨肉腫に対する化学療法の実績. 第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.14 京都)
- 8) Tamaki S, Kato T, Toguchida J, et al. Genetic and epigenetic regulation of synovial sarcoma-associated molecule, FZD10. 第 33 回日本分子生物学会年会(2010.12.9 神戸)
- 9) Tamaki S, Kato T, Toguchida J, et al. Genetic and epigenetic regulation of synovial sarcoma-associated molecule, FZD10. 16th CTOS (2010.11.13 Paris)
- 10) 長山聡、戸口田淳也、他. 大腸癌進展におけるAFAP1L1 遺伝子の関与. 第69回日本癌学会総会(2010.9.24 大阪)
- 11) 戸口田淳也. 癌化と再生の接点としての組織幹細胞. 第 69 回日本癌学会総会 (2010.9.22 大阪)
- 12) 笠原崇、戸口田淳也、他. 網羅的発癌解析からの骨肉腫造腫瘍能の探索. 第 43 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2010.7.15 東京)
- 13) 佐藤信吾、加藤友久、戸口田淳也、他. iPS 細胞を用いた肉腫発生機構解析システムの構築. 第 43 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2010.7.15 東京)
- 14) Toguchida J. Cell-of-origin of sarcomas: insights from tissue stem cells. 第 5 回 International Symposium of Institute Network (2010.6.24 金沢)
- 15) Toguchida J, Kato,T, et al. In vivo tumor forming-signature of human osteosarcoma cells revealed by genome-wide expression profiling. 8th ISSCR (2010.6.17 San Francisco)
- 16) 戸口田淳也、加藤友久、他. 肉腫幹細胞と癌幹細胞. 第 51 回日本臨床細胞学会総会 (2010.5.31 横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：40273502

(2) 研究分担者

近藤 玄 (KONDO GEN)
京都大学・再生医科学研究所・准教授
研究者番号：40243258
加藤 友久 (KATO TOMOHISA)
京都大学・再生医科学研究所・講師
研究者番号：50301247

(3) 連携研究者

なし