

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462264

研究課題名(和文)滑膜肉腫特異的融合遺伝子のin vivo機能解析及び創薬ターゲットの探索

研究課題名(英文)Functional analysis of synovial sarcoma specific fusion-gene and identification of new therapeutic targets

研究代表者

濱田 健一郎 (Kenichiro, Hamada)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50649043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜肉腫は特異的融合遺伝子SS18-SSXが発がん因子と考えられている難治性希少疾患です。我々はヒト滑膜肉腫細胞株を用いてSS18-SSXを制御することにより一度がん化した腫瘍を再度抑えることができるのかをドキシサイクリン誘導システムを用いて検討しました。この方法で検討した結果、SS18-SSXを制御することにより腫瘍化した細胞の増殖を抑えることができ、また腫瘍化することも抑えることが出来ました。この事はSS18-SSXが治療ターゲットとなりうることを示唆します。また現在、SS18-SSXが制御している遺伝子の解析を行い新たな治療ターゲットを探索しています。

研究成果の概要(英文)：Synovial sarcoma is a rare aggressive disease which is characterized by a synovial sarcoma specific fusion-oncogene SS18-SSX. We examined the possibility to control the tumors by silencing SS18-SSX using doxycycline inducible system. Then, we successfully suppressed the tumor growth by silencing the fusion-oncogene SS18-SSX both in vitro and in vivo using this system. In addition, we confirmed that silencing of SS18-SSX resulted in significantly less tumor formations in vivo. These results indicated that silencing of SS18-SSX could be a treatment option for local tumors or metastases. Furthermore, we are now analyzing gene expressions regulated by SS18-SSX using this system to explore a new treatment target for synovial sarcoma.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：滑膜肉腫 新規治療開発 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

滑膜肉腫は疾患特異的融合遺伝子 SS18-SSX が腫瘍の発生原因とされている転座関連肉腫で、若年者に好発する予後不良な難治性悪性疾患である。手術による外科的切除が治療の中心となっており、化学療法の有効性については一定の見解がない。近年、融合遺伝子の分子生物学的メカニズムが徐々に解明されてきており、創薬ターゲットとなる可能性がでてきた。しかしながら融合遺伝子は細胞をエピジェネティックに制御することが判明しており、一度エピジェネティックに癌化された細胞が融合遺伝子を抑制することにより本当に抑制できるのかという検証は不十分であった。

2. 研究の目的

滑膜肉腫特異的融合遺伝子 SS18-SSX の機能解析を In vitro, In vivo で行い SS18-SSX を抑制することによる抗腫瘍効果を検証する事を目的とし以下の事を検討した。

- 1) ヒト滑膜肉腫細胞株をヌードマウスに移植し出来た腫瘍で、SS18-SSX をサイレンシングすることによる抗腫瘍効果を検討する。
- 2) SS18-SSX をサイレンシングしたヒト滑膜肉腫細胞株をヌードマウスに移植し腫瘍形成能を検討する。
- 3) SS18-SSX をサイレンシングしたヒト滑膜肉腫細胞の遺伝子発現を調査し、SS18-SSX の腫瘍原性に関する分子生物学影響を検討する。

3. 研究の方法

ヒト滑膜肉腫細胞株 Yamato-SS にドキシサイクリン誘導システムを用いて SS18-SSX が抑制できる細胞株を作成、1) 腫瘍接種したヌードマウスにドキシサイクリンを内服させ抗腫瘍効果を検討した。2) ドキシサイクリン添加細胞株をヌードマウスに移植し腫瘍形成能を検討した。3) ドキシサイクリンを添加し経時的にメチル化アレイを行い、細胞株の遺伝子変化を検討した。

4. 研究成果

1) 滑膜肉腫特異的融合遺伝子 SS18-SSX 抑制の抗腫瘍効果の検討

ヒト滑膜肉腫細胞 Yamato-SS にドキシサイクリン誘導 ShSS18-SSX を導入し、ドキシサイクリン添加により SS18-SSX がサイレンシングされる株 YSSi を樹立した。

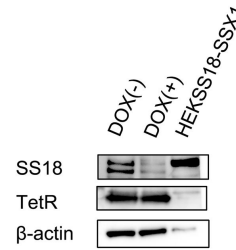


図) ドキシサイクリン添加にて SS18-SSX がサイレンシング

In vitro にて腫瘍増殖がドキシサイクリン添加にて抑制されることを確認した。次にヌードマウスに YSSi を移植し、腫瘍が触知できるようになるまで成長した段階でドキシサイクリンを内服群と PBS 内服群に振り分け経過を観察した。ドキシサイクリン内服群で有意に腫瘍増大が抑制され、SS18-SSX 抑制により抗腫瘍効果が発揮されることが確認できた。

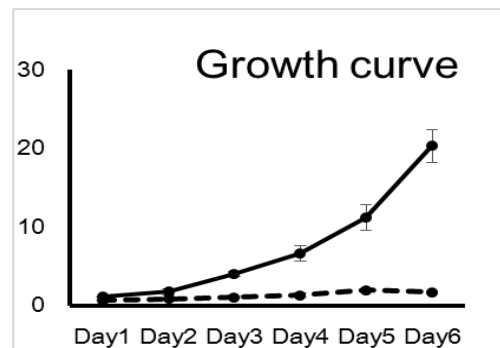


図) ドキシサイクリン添加にて腫瘍増殖が抑制

2) 滑膜肉腫特異的融合遺伝子 SS18-SSX 抑制の腫瘍原性に関する検討。

YSSi をドキシサイクリン添加群と PBS 添加群に振り分けそれぞれヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を評価した。ドキシサイクリン添加群で有意に腫瘍の形成が抑制されており SS18-SSX のサイレンシングにより一度がん化した細胞でも腫瘍形成能を抑制できることが確認できた。

3) SS18-SSX 抑制による遺伝子発現の検討
YSSi にドキシサイクリンを添加し、経時的に遺伝子のメチル化を調べその発現を調査した。現在変化のある遺伝子を調査し SS18-SSX の腫瘍原性に関係のある遺伝子を検討中である。

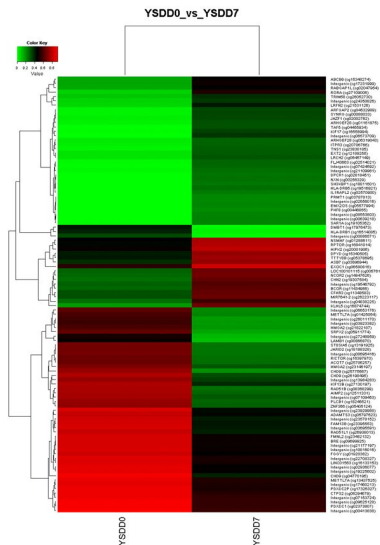


図) ドキシサイクリン添加による遺伝子のメチル化状態の変化

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4件)

Trabectedin is a promising antitumor agent potentially inducing melanocytic differentiation for clear cell sarcoma. Nakai T, Imura Y, Tamiya H, Yamada S, Nakai S, Yasuda N, Kaneko K, Outani H, Takenaka S, Hamada K, Myoui A, Araki N, Ueda T, Itoh K, Yoshikawa H, Naka N. *Cancer Med.* 査読有 2017 Sep;6(9):2121-2130. doi: 10.1002/cam4.1130.

Therapeutic potential of TAS-115 via c-MET and PDGFR signal inhibition for synovial sarcoma.

Yamada S, Imura Y, Nakai T, Nakai S, Yasuda N, Kaneko K, Outani H, Takenaka S, Hamada K, Myoui A, Araki N, Ueda T, Itoh K, Yoshikawa H, Naka N. *BMC Cancer.* 査読有 2017 May 16;17(1):334. doi: 10.1186/s12885-017-3324-3.

Clinical outcomes of patients with epithelioid sarcomas: impact and management of nodal metastasis.

Outani H, Imura Y, Tanaka T, Takenaka S, Oshima K, Hamada K, Kakunaga S, Joyama S, Naka N, Kudawara I, Ueda T, Araki N, Yoshikawa H.

Int J Clin Oncol. 査読有 2018 Feb;23(1):181-188.

doi: 10.1007/s10147-017-1179-x.

Reconstruction using a constrained-type hip tumor prosthesis after resection of malignant periacetabular tumors: A study by the Japanese Musculoskeletal Oncology

Group (JMOG).

Ogura K, Susa M, Morioka H, Matsumine A, Ishii T, Hamada K, Ueda T, Kawai A. *J Surg Oncol.* 査読有 2018 Feb 23. doi: 10.1002/jso.25005.

〔学会発表〕(計8件)

濱田健一郎、中井翔、安田直弘、王谷英達、竹中聡、中紀文、吉川秀樹、神経線維腫症1型に発症した悪性末梢神経鞘腫瘍に対する治療成績、第50回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会、2017年7月14日、京王プラザホテル(東京都、新宿区)

中井翔、安田直弘、王谷英達、竹中聡、濱田健一郎、中紀文、吉川秀樹、淡明細胞肉腫に対する eribulin mesilate の抗腫瘍効果、第50回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会、2017年7月13日、京王プラザホテル(東京都、新宿区)

中井隆彰、王谷英達、中井翔、安田直弘、竹中聡、濱田健一郎、中紀文、吉川秀樹、淡明細胞肉腫に対する trabectedin (Yondelis; ET-743) の抗腫瘍効果、第50回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会、2017年7月13日、京王プラザホテル(東京都、新宿区)

王谷英達、中井翔、安田直弘、竹中聡、濱田健一郎、中紀文、吉川秀樹、初診時転移を有する軟部肉腫の治療成績、第50回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会、2017年7月13日、京王プラザホテル(東京都、新宿区)

安田直弘、中井翔、王谷英達、竹中聡、濱田健一郎、中紀文、吉川秀樹、Ewing-like sarcoma 細胞株樹立と新規癒合遺伝子の解析、第1回日本サルコーマ治療研究会学術集会、2018年2月24日、JA共済ビルカンファレンスホール(東京都、千代田区)

中井翔、安田直弘、王谷英達、竹中聡、濱田健一郎、中紀文、吉川秀樹、淡明細胞肉腫に対する Eribulin mesilate の抗腫瘍効果、第1回日本サルコーマ治療研究会学術集会、2018年2月24日、JA共済ビルカンファレンスホール(東京都、千代田区)

Hamada K, Naka N, Outani H, Takenaka S, Oshima K, Fujimoto T, Kakunaga S, Joyama S, Obata H, Myoui A, Kuratsu S, Kudawara I, Araki N, Ueda T, Aoki Y, Yoshikawa H. Clinical results of OS patients of lower extremity under 12 years-old, 38th SICOT Orthopaedic World Congress, 2017年12月1日、Cape Town International Convention Centre (Cape Town、南アフリカ)

A Nakai S, Nakai T, Yasuda N, Takenaka S, Outani H, Hamada K, Myoui A, Yoshikawa H, Naka N, Imura Y, Tamiya H, Tanaka T. Anti-tumor effects of Eribulin mesilate on clear cell sarcoma cell lines

CTOS 2017、2017年11月8日、Grand Wailea Resort (Maui、Hawaii、アメリカ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 健一郎 (HAMADA, KENICHIRO)
大阪大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：50649043

(2)研究分担者

王谷 英達 (OUTANI, HIDETATSU)
大阪大学大学院・医学系研究科・特任助教
研究者番号：60727965
研究者分担者
中 紀文 (NAKA, NORIFUMI)
大阪国際がんセンター・整形外科主任部長
研究者番号：90601964