

令和元年5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08703

研究課題名(和文) 滑膜肉腫における腫瘍幹細胞維持機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Analysis and application of synovial sarcoma stem cell

研究代表者

木村 太一 (Kimura, Taichi)

北海道大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：90435959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：cDNAマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現比較解析により滑膜肉腫幹細胞で特異的に発現上昇する遺伝子とSS18-SSXにより腫瘍幹細胞中で発現制御される可能性のある15遺伝子を候補遺伝子として抽出した。このうち滑膜肉腫幹細胞特異的に発現制御されている可能性の高い2遺伝子のノックダウン細胞株の樹立を行った。また腫瘍幹細胞特異的な15種のSS18-SSX結合タンパクを質量分析計を用いた詳細な解析により同定した。このうち文献上幹細胞性の制御にかかわる可能性が高い1つについてノックダウン細胞株を樹立したところ、幹細胞培養時にのみ細胞増殖が有意に低下することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて我々は滑膜肉腫幹細胞の制御・維持機構に関与する可能性のある新規候補分子を同定した。このうちの1つはノックダウンによりスフィア形成条件でのみ有意に細胞増殖が抑制することから滑膜肉腫における幹細胞治療法の標的分子となりうる可能性が示唆された。また候補分子中にはSWI-SNF型クロマチンリモデリング複合体と相互作用する分子が含まれている。クロマチンリモデリング機構が腫瘍幹細胞の発生、維持に関与するかどうかは現状不明であり、新たな研究領域の発展につながる可能性が示唆される。滑膜肉腫は稀少がんであり、現状有効な治療法が存在しないため上記の知見は治療法の探索において社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：As a result of cDNA microarray, we detected fifteen candidate genes, up-regulated in synovial sarcoma stem cells, and regulated under the control of SS18-SSX. We established knock-down cell-lines of two candidate genes by lentiviral shRNA. Furthermore, using mass-spectrometry analysis, we selected fifteen SS18-SSX-binding proteins specified by synovial sarcoma stem cells. We established the knock-down cell-line of one candidate gene by lentiviral shRNA. This cell-line exhibited marked growth retardation under the sphere-forming condition.

研究分野：実験病理学

キーワード：滑膜肉腫 癌幹細胞 クロマチンリモデリング 稀少がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

滑膜肉腫は軟部腫瘍全体の約 **10%**を占める頻度の高い腫瘍で、若年成人の四肢関節近傍に好発し、外科的切除後も転移・再発率は高く予後不良である。滑膜肉腫はキメラ遺伝子 **SS18-SSX** の発現がほぼ全例で見られる。組織学的には上皮及び肉腫成分が混在する像を示し、その発生母地は未分化間葉系細胞と推測されているが現状では依然として不明である。我々は **SS18-SSX** が滑膜肉腫発症に必須の分子であることを示し、また細胞種によっては **SS18-SSX** は細胞老化を惹起することを解明したが、発症機構の詳細な分子機序は不明であった。そこで **SS18** の生物学的機能の解明、滑膜肉腫発症との関連を解明する事を目的に、**SS18** ノックアウトマウスを樹立した。解析の結果、**SS18** は初期発生に必須の分子であり、発生時における細胞の適切な遊走を制御していることが判明した。また近年の研究では **SS18-SSX** は **SWI/SNF** 型クロマチンリモデリング複合体やヒストン脱アセチル化複合体と結合し、エピジェネティックに標的遺伝子の転写調節を攪乱する事が明らかとなった。

近年の研究から悪性腫瘍は均一な細胞集団ではなく少数存在する腫瘍幹細胞が腫瘍の発症、進展、転移の本態である事が明らかとなってきた。腫瘍幹細胞は自己複製能と多分化能により定義され、高い造腫瘍能、化学放射線療法への抵抗性を呈することから新規治療標的として性状解析が進められており、研究が先行する造血系腫瘍や脳腫瘍、大腸癌、乳癌等では腫瘍幹細胞の発生、維持機構について徐々に解明が進んでいるものの、滑膜肉腫を含む悪性軟部腫瘍においては未だ解析が進んでいないのが現状である。我々は多数の悪性腫瘍で腫瘍幹細胞マーカーとされる **CD133** が滑膜肉腫幹細胞を濃縮し得るかを検討した。予想に反して **CD133** 陰性成分の方が高い増殖能、腫瘍形成能を有し、これらの表現型には **AKT** シグナルが密接に関与していることが判明した。そのため滑膜肉腫幹細胞を濃縮する別の手段としてスフィア形成法による解析を試みた。3種の滑膜肉腫細胞株を無血清・低接着条件で培養すると、いずれも紡錘型細胞中に少数のスフィア形成が確認され、幹細胞性遺伝子の高発現、**NOD/SCID** マウスにおける高い腫瘍形成能を示した。さらにスフィア形成細胞で高発現する **CXCR4** 陽性細胞は、陰性細胞に比べ **25** 倍高い造腫瘍能を示し、自己複製能、多分化能をも有する滑膜肉腫幹細胞を濃縮することが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

本研究において我々は、滑膜肉腫幹細胞において顕著な発現変動を呈する遺伝子群、**SS18-SSX** に特異的に結合するタンパク及びプロモーターを網羅的に同定し、発症機構や腫瘍幹細胞の性状、維持機構の解析を進め新規治療法の創出を目指す。

## 3. 研究の方法

- 1) **滑膜肉腫幹細胞に特異的な SS18-SSX 結合タンパクの同定と下流分子の探索**: Sphere 形成群又は **CXCR4** 陽性群で特異的に **SS18-SSX** に結合するタンパク、**SS18-SSX** を含む複合体が特異的に結合するプロモーター及び特異的に発現変動が見られる遺伝子群を後述する方法にて同定する。
- 2) **候補分子の評価、絞り込み**: 同定した分子群が幹細胞の分離・濃縮に有用か、もしくは幹細胞性の維持に関わるかを解析し候補分子を絞り込み、腫瘍幹細胞の維持等に関わる特異的な転写メカニズムの解明を目指す。
- 3) **治療薬、診断・予後マーカー開発に有用な評価系の作製**: 滑膜肉腫検体から初代培養細胞、組織アレイ及びマウス皮下移植モデルを直接作製し、実際の腫瘍を反映した評価系の作製を行う。また遺伝子改変動物の交配により滑膜肉腫発症モデルの樹立も試みる。
- 4) **候補分子を基盤とした治療薬及びバイオマーカーの開発と評価、検証**: ケミカルライブラリースクリーニングによる特異的な低分子化合物の同定と中和抗体の作製を行い、3)の評価系で解析し、臨床応用への可能性を検討する。

## 4. 研究成果

本研究で我々は滑膜肉腫幹細胞特異的に **SS18-SSX** に結合するタンパクを同定し、その結合により制御されるプロモーター領域と転写調節のメカニズムを解明することで腫瘍幹細胞の性状解析、新規治療法の創出を目指すものである。

現在までに cDNA マクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現比較解析により **CXCR4** 陽性の滑膜肉腫幹細胞及び幹細胞培養群で特異的に発現上昇する遺伝子と **SS18-SSX** により腫瘍幹細胞中で発現制御される可能性のある 15 遺伝子を候補遺伝子として抽出した。これらの 15 遺伝子はいずれも幹細胞性や転写調節にかかわるものであり、候補遺伝子の抽出はおおむね妥当と考えている。このうち 2 遺伝子が滑膜肉腫幹細胞特異的に発現制御されている可能性が示唆されたため、レンチウィルスベクターを用いたノックダウン細胞株の樹立を行った。現在ノックダウン細胞株と対照群を用いて幹細胞関連遺伝子の発現、造腫瘍能、幹細胞性に及ぼす影響を解析中である。

腫瘍幹細胞特異的な **SS18-SSX** 結合タンパクの同定に関しては、本研究課題に先んじて施行した研究により幹細胞培養群でのみ結合する 11 のタンパクの他、質量分析計を用いた詳細な解析により新たに 15 の候補タンパクを同定した。大部分の候補タンパクは核内で転写調節にあずかるものであり、またそのうちの一つである **RBM14** は実際に **SS18-SSX** との結合が報告されて

いることから、結合実験の結果は概ね妥当と考えている。これらの候補タンパクのうち文献上幹細胞性の制御にかかわる可能性が高い1つについてレンチウイルスベクターを用いたノックダウン細胞株を樹立したところ、幹細胞培養時にのみ細胞増殖が有意に低下することが明らかとなり、引き続き造腫瘍能について解析を継続中である。

腫瘍幹細胞特異的な SS18-SSX 結合プロモーター領域の網羅的同定に関しては、引き続き ChIP アッセイを施行する際の至適条件の検討を行っており、次年度に本実験を施行予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- 1) Ishikawa, T., Shimada, S., Fukai, M., Kimura, T., Umemoto, K., Shibata, K., Fujiyoshi, M., Fujiyoshi, S., Hayasaka, T., Kawamura, N., Kobayashi, N., Shimamura, T., Taketomi, A. Post-reperfusion hydrogen gas treatment ameliorates ischemia reperfusion injury in rat livers from donors after cardiac death: a preliminary study. **Surg Today**. 2018 Dec;48(12):1081-1088. doi: 10.1007/s00595-018-1693-0. 査読あり
- 2) Ishikawa, M., Tanino, MA., Miyazaki, M., Kimura, T., Ishida, Y., Wang, L., Tsuda, M., Nishihara, H., Nagashima, K., Tanaka, S. A Clinicopathological Analysis of Six Autopsy Cases of Sudden Unexpected Death due to Infectious Aortitis in Patients with Aortic Tears. **Intern Med**. 2018 May 15;57(10):1375-1380. doi: 10.2169/internalmedicine.8976-17. 査読あり
- 3) Shimizu Y, Yasuda S, Kimura T., Nishio S, Kono M, Ohmura K, Shimamura S, Kono M, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Fukasawa Y, Tanaka S, Atsumi T. Interferon-inducible Mx1 protein is highly expressed in renal tissues from treatment-naïve lupus nephritis, but not in those under immunosuppressive treatment. **Mod Rheumatol**. 2017 Nov 30:1-9. doi: 10.1080/14397595.2017.1404711. 査読あり
- 4) Tateno T, Onozawa M, Hashiguchi J, Ishio T, Yuzawa S, Matsuoka S, Kosugi-Kanaya M, Okada K, Shiratori S, Goto H, Kimura T., Sugita J, Nakagawa M, Hashimoto D, Kahata K, Fujimoto K, Endo T, Kondo T, Tanaka S, Hashino S, Teshima T. Disseminated toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation showing unusual magnetic resonance images. **Transpl Infect Dis**. 2017 Aug;19(4). doi: 10.1111/tid.12720. 査読あり
- 5) Inamura, N., Kimura, T., Wang, L., Yanagi, H., Tsuda, M., Tanino, M., Nishihara, H., Fukuda, S., Tanaka, S. Notch1 regulates invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma by inducing EMT through c-Myc. **Auris Nasus Larynx**. 2017 Aug;44(4):447-457. doi: 10.1016/j.anl.2016.08.003. 査読あり
- 6) Kato, M., Nishihara, H., Hayashi, H., Kimura, T., Ishida, Y., Wang, L., Tsuda, M., Tanino, MA., Tanaka, S. Clinicopathological evaluation of Sox10 expression in diffuse-type gastric adenocarcinoma. **Med. Oncol**. 2017 Jan;34(1):8. 査読あり
- 7) Shimada, S., Wakayama, K., Fukai, M., Shimamura, T., Ishikawa, T., Fukumori, D., Shibata, M., Yamashita, K., Kimura, T., Todo, S., Ohsawa, I., Taketomi, A. Hydrogen Gas Ameliorates Hepatic Reperfusion Injury After Prolonged Cold Preservation in Isolated Perfused Rat Liver. **Artif Organs**. 2016 Dec;40(12):1128-1136. doi: 10.1111/aor.12710. 査読あり
- 8) Matsumoto, R., Tsuda, M., Yoshida, K., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara, H., Abe, T., Shinohara, N., Nonomura, K., Tanaka, S. Aldo-keto reductase 1C1 induced by interleukin-1beta mediates the invasive potential and drug resistance of metastatic bladder cancer cells. **Sci Rep**. 2016 Oct 4;6:34625. doi: 10.1038/srep34625. 査読あり
- 9) Yuzawa, S., Nishihara, H., Wang, L., Tsuda, M., Kimura, T., Tanino, M., Tanaka, S. Analysis of NAB2-STAT6 Gene Fusion in 17 Cases of Meningeal Solitary Fibrous

- Tumor/Hemangiopericytoma: Review of the Literature. **Am J Surg Pathol.** 2016 Aug;40(8):1031-40. doi: 10.1097/PAS.0000000000000625. Review. 査読あり
- 10) Yuzawa, S., Nishihara, H., Yamaguchi, S., Mohri, H., Wang, L., Kimura, T., Tsuda, M., Tanino, M., Kobayashi, H., Terasaka, S., Houkin, K., Sato, N., Tanaka, S. Clinical impact of targeted amplicon sequencing for meningioma as a practical clinical sequencing system. **Mod. Pathol.** 2016 Jul;29(7):708-16. doi: 10.1038/modpathol.2016.81. 査読あり
- 11) Kimura, T., Wang, L., Tabu, K., Tsuda, M., Tanino, M., Maekawa, A., Nishihara, H., Hiraga, H., Taga, T., Oda, Y., Tanaka, S. Identification and analysis of CXCR4-positive synovial sarcoma-initiating cells. **Oncogene.** 2016 Jul 28;35(30):3932-43. doi: 10.1038/onc.2015.461. 査読あり
- 12) Ito, T., Sato, K., Ozaki, Y., Asanome, T., Nakamura, H., Tanaka, S., Kimura, T., Kanno, H. [Pineal Parenchymal Tumor with Marked Cytologic Pleomorphism: Is there a Correlation with the Malignancy Grade?]. **No Shinkei Geka.** 2016 Jun;44(6):481-7. doi: 10.11477/mf.1436203314. Japanese. 査読あり
- 13) Elmansuri, AZ., Tanino, MA., Mahabir, R., Wang, L., Kimura, T., Nishihara, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Tsuda, M., Tanaka, S. Novel signaling collaboration between TGF- $\beta$  and adaptor protein Crk facilitates EMT in human lung cancer. **Oncotarget, 2016 May 10;7(19):27094-107. doi: 10.18632/oncotarget.8314.** 査読あり
- 14) Tabu, K., Muramatsu, N., Mangani, C., Wu, M., Zhang, R., Kimura, T., Terashima, K., Bizen, N., Kimura, R., Wang, W., Murota, Y., Kokubu, Y., Nobuhisa, I., Kagawa, T., Kitabayashi, I., Bradley, M., Taga, T. A Synthetic Polymer Scaffold Reveals the Self-Maintenance Strategies of Rat Glioma Stem Cells by Organization of the Advantageous Niche. **Stem Cells.** 2016 May;34(5):1151-62. doi: 10.1002/stem.2299. 査読あり
- 15) Yuzawa, S., Nishihara, H., Tanino, M., Kimura, T., Moriya, J., Kamoshima, Y., Nagashima, K., Tanaka, S. A case of cerebral astroblastoma with rhabdoid features: a cytological, histological, and immunohistochemical study. **Brain Tumor Pathol.** 2016 Jan;33(1):63-70. doi: 10.1007/s10014-015-0241-5. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 木村太一

滑膜肉腫幹細胞の同定と制御・維持メカニズムに関わる分子の探索

第 7 回難治疾患共同研究拠点シンポジウム 東京、2016.11.29

2) 木村太一

滑膜肉腫幹細胞の同定と制御・維持機構の探索

第 113 回北海道癌談話会春季シンポジウム 札幌、2016.6.25

3) Hiroshi Nishihara, Sayaka Yuzawa, Shigeru Yamaguchi, Hiromi Mohri, Lei Wang, Taichi Kimura, Masumi Tsuda, Mishie Tanino, Hiroyuki Kobayashi, Shunsuke Terasaka, Kiyohiro Houkin, Shinya Tanaka

Clinical impact of targeted amplicon sequence for meningioma as a practical clinical sequence system.

Society for Neuro-Oncology Conference on Meningioma. Toronto, Ontario,(Canada ) 2016.6.17-18

4) 木村太一

滑膜肉腫幹細胞の制御・維持機構の解明

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名： 津田 真寿美

ローマ字氏名： **Masumi Tsuda**

所属研究機関名： 北海道大学

部局名： 医学研究院

職名： 准教授

研究者番号(8桁)： **30431307**

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。