

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07441

研究課題名(和文) 滑膜肉腫幹細胞の維持・制御に関わる遺伝子群の解析と新規治療法への応用

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

研究代表者

木村 太一 (Kimura, Taichi)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：90435959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜肉腫幹細胞中で特異的に発現制御される遺伝子の探索を行ったところ、ASCL2およびFOXD3はSS18-SSX2の発現依存性に幹細胞培養群でのみ発現の亢進が認められ、ノックダウンによりCXCR4、NANOG、OCT3/4、SOX2などの幹細胞性遺伝子群の発現が減少する一方で、SS18-SSXの発現には直接関与しないことが明らかとなった。また幹細胞特異的にSS18-SSXとの結合が示唆されたPARP1、はノックダウンにより幹細胞培養条件下でのみ細胞増殖を抑制することが示唆された。これらの遺伝子、結合タンパクのより詳細な解析を進めることで滑膜肉腫幹細胞特異的な新規治療法の開発を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑膜肉腫幹細胞に関する知見は少なく、特にマーカーに関しては我々が同定したCXCR4が世界初である。滑膜肉腫幹細胞特異的なSS18-SSX結合分子及び転写メカニズムの解析には比較・検証対象として滑膜肉腫幹細胞の同定が必須のため独自性が高いと考える。また滑膜肉腫には有効かつ統一された化学療法のレジメンが存在しない。本研究にて新規治療標的を同定し得た場合、再発症例や予後不良例に関しても幅広い治療の選択肢を提供できる。また滑膜肉腫は診断が困難であり確定診断にはキメラ遺伝子の証明が必要となる。本研究により滑膜肉腫幹細胞特異的な分子を同定し得た場合、免疫染色による有用な診断マーカーの開発が可能となる。

研究成果の概要(英文)：When we searched for genes whose expression is specifically regulated in synovial sarcoma stem cells, ASCL2 and FOXD3 were found to be up-regulated only in the stem cell culture group, depending on the expression of SS18-SSX2. While the expression of stemness genes such as NANOG, OCT3/4 and SOX2 was decreased, it was revealed that they were not directly involved in the expression of SS18-SSX. In addition, knockdown of PARP1, which was suggested to bind to SS18-SSX in a stem cell-specific manner, was suggested to suppress cell proliferation only under stem cell culture conditions. We aim to develop a novel therapeutic method specific to synovial sarcoma stem cells by advancing more detailed analysis of these genes and binding proteins.

研究分野：実験病理学

キーワード：癌幹細胞 滑膜肉腫 稀少癌

## 1. 研究開始当初の背景

滑膜肉腫は軟部腫瘍全体の約 **10%**を占める難治性の悪性腫瘍 (希少がん)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、その発生母地は初期筋芽細胞など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。

これまでの研究から **SS18-SSX** は滑膜肉腫の発症に必須であり、その機能の一つは **SWI/SNF** 型クロマチンリモデリング複合体と結合することで構成サブユニットの一つである **INI1** を複合体から排除し、異型 **SWI/SNF** 複合体としてエピジェネティックな転写調節を擾乱することであると考えられている。さらに次世代シーケンサーを用いた悪性腫瘍の網羅的な変異遺伝子解析の結果、**SWI/SNF** 型クロマチンリモデリング複合体の構成サブユニットである **ARID1a** は広範な癌腫にわたって高率に不活性型の変異をきたしていることが明らかとなり、**BRG1** や **INI1** といったその他のサブユニットの変異が複数の悪性腫瘍の発症に関与していることが報告されている。**SWI/SNF** 型クロマチンリモデリング複合体によるエピジェネティックな遺伝子制御の異常が様々な悪性腫瘍の発症、進展に密接に関与していることが示唆されているが、その詳細な分子機構には依然として不明な点が多い。

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。我々は滑膜肉腫幹細胞の存在、特異的マーカーを探索するためにスフィア形成法による腫瘍幹細胞濃縮を試みた。**cDNA** マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によりスフィア形成細胞で高発現する **CXCR4** を幹細胞マーカー候補遺伝子として解析を行ったところ、**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り、世界で初めて滑膜肉腫幹細胞マーカーの同定に成功した。

**CXCR4** を同定したことで、滑膜肉腫幹細胞を濃縮し使用できる実験系が確立されたため、続いて実際の治療標的分子として滑膜肉腫幹細胞の発生、制御、維持に関与する遺伝子を同定するために **cDNA** マイクロアレイを用いて **CXCR4** 陽性細胞及びスフィア形成細胞で特異的に高発現する遺伝子群を絞り込み、**ASCL2**, **FOXD3** をはじめとする幹細胞関連 **15** 遺伝子を候補遺伝子として抽出した。さらに質量分析計を用いた結合タンパクの網羅的解析により、**ADP** リボシル化酵素 **PARP1** を含む複数のタンパク質が滑膜肉腫幹細胞内でのみ **SS18-SSX** 特異的に結合する可能性を見出した。本研究課題ではこれらの候補遺伝子、結合タンパクの滑膜肉腫幹細胞における役割を解析することで、滑膜肉腫幹細胞の発生、制御、維持機構の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

滑膜肉腫は若年成人に発症する起源細胞の不明な悪性軟部腫瘍であり、進行症例に対する有効な治療法は未だ確立されていない。また自己複製能・多分化能により定義される腫瘍幹細胞は腫瘍の発症・再発・転移と密接に関与し、化学放射線療法に対し抵抗性を示すことから新規治療標的として注目され研究が進められているが、その性状に関しては依然として不明な点が多い。本研究では先行研究により同定した滑膜肉腫幹細胞においてのみ特異的に発現上昇を呈する遺伝子、**SS18-SSX** に滑膜肉腫幹細胞特異的に結合するタンパクの解析を行い、特に **SWI/SNF** 型クロマチンリモデリング複合体と腫瘍幹細胞の性状、維持機構との関連を解析する事で新規治療標的を探索・発見することを試みる。

## 3. 研究の方法

**1) 滑膜肉腫幹細胞に特異的な候補分子の評価、絞り込み:** 本研究では迅速に解析を進めるために、抽出済みの前述の **15** 遺伝子、幹細胞特異的 **SS18** 結合タンパク候補のうち、有望と推測される最大で **20** 遺伝子程度に対する **siRNA** を作製し、通常の培養条件化において **siRNA** を一過性に導入した後に幹細胞培養を行い、増殖曲線、コロニー形成アッセイを用いて増殖抑制効果の判定を行う。またスフィア形成能の変化、定量的 **RT-PCR** 法により幹

細胞性遺伝子の発現が **siRNA** 無しの対照群に比べて低下するかどうかを検討することで、幹細胞性の維持に候補分子の発現抑制が関与するかを解析する。必要に応じて野生型 **SS18** ないし **INI1** の過剰発現下における異型 **SWI/SNF** 複合体と結合プロモーターの相互作用を、クロマチンリモデリングアッセイ、**ChIP** アッセイを用いて詳細に検討する。*In vitro* で増殖能の低下または幹細胞性の喪失が見られた分子に関してはレンチウイルスベクターを用いた特異的な **shRNA** 安定発現株を作成し、幹細胞培養後に **NOD/SCID** マウスの両脇腹に皮下移植し腫瘍形成能及び幹細胞性について生体内での比較検討を行う。*In vitro* の検討を *in vivo* に先行して行い候補分子をさらに絞り込むことで、解析時間の短縮を狙う。

**2) 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:** 上記において絞り込まれた候補遺伝子に特異的な抗体を用いて実際の滑膜肉腫検体で免疫染色を施行し、陽性率と長期予後の比較検討を行い予後と相関するマーカーとなりうる遺伝子が存在するかどうかを検討する。有意な相関が見られる分子が判明した場合、継続的に免疫染色と予後追跡とを行い症例数を増やしてさらに詳細な検討を行う。また滑膜肉腫を含む悪性軟部腫瘍症例を用いて候補分子の免疫染色を行い、滑膜肉腫でのみ特異的に陽性像が得られる診断マーカーの探索も行う。探索の精度向上、ハイスループット化を狙って軟部腫瘍の **tissue array** の作製を外部業者に委託予定である。診断特異的なマーカー候補が得られた場合も継続的に当教室に提出される全軟部腫瘍に対して免疫染色を行いさらに詳細な検討を行う。候補分子のうち既存の抑制剤及び特異抗体が存在するものを優先的に検討し、薬効の評価を行う。評価系としては *in vitro* の検討は樹立した候補遺伝子に特異的な **shRNA** 安定発現株をコントロールとし同様の増殖抑制効果を有する分子をさらに絞り込む。*In vivo* の検討は既存の滑膜肉腫発症モデルマウスを譲受し効果判定を行う。効果判定は *in vitro* ではハイスループット化を狙い **MTT** アッセイを行い、*in vivo* では腫瘍のサイズ、及び壊死の有無や分化度など組織学的な検索により行う。既存薬のない候補分子に関しては研究期間、研究費の許す範囲で中和抗体の作製、ケミカルライブラリースクリーニングを委託し新規分子を特異的に抑制する低分子化合物の探索を行う。

#### 4. 研究成果

**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遺伝子として、各遺伝子の **gene annotation** も考慮し、**15** 遺伝子を同定した。このうち **ASCL2** および **FOXD3** は **FUJI** および **SYO-1** の 2 細胞株において幹細胞培養群で有意に発現上昇し、また **SS18-SSX2** を一過性に過剰発現させることでさらに発現が亢進することから、滑膜肉腫幹細胞特異的に発現制御されている可能性が強く示唆されたため、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。リアルタイム **PCR** の結果では通常培養条件下で 2 遺伝子のノックダウン細胞株ではいずれも対照群に比べて、**CXCR4**、**NANOG**、**OCT3/4**、**SOX2** の発現が優位に低下する一方、**SS18-SSX** の発現量に明らかな変化を認めなかった。現在 **ASCL2** および **FOXD3** のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにより幹細胞培養条件下での転写調節機構の解析を施行中である。

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、質量分析計を用いた詳細な解析により同定した **15** の候補タンパクの解析を行った。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解析を進めた。文献検索等の情報から幹細胞性の制御、維持に関与するタンパクや分子標的薬や特異的阻害剤が存在するタンパクとして **PARP1** を抽出した。そのため **293T** 細胞に **SS18-SSX2** を過剰発現させる系を用いて免疫沈降を行ったところ、**SS18-SSX2** と内在性の **PARP1** との結合が確認された。**FUJI** および **SYO-1** においてレンチウイルスベクターを用いた **PARP1** ノックダウン細胞株を樹立し解析を行ったところ、リアルタイム **PCR** の結果では通常培養条件下で **PARP1** のノックダウン細胞株ではいずれも対照群に比べて、**CXCR4** の発現は減少傾向を示し、**NANOG**、**OCT3/4**、**SOX2** の発現は上昇傾向を示す一方、**SS18-SSX** の発現量に明らかな変化を認めなかった。次に **FUJI** および **SYO-1** において **PARP1** のノックダウンが細胞増殖に与える影響を検討するために、*in vitro* での細胞増殖極性の解析したところ、**FUJI**、**SYO-1** とともに **PARP1** のノックダウン細胞株は、対照群に比べて幹細胞培養条件下では増殖抑制がかかる傾向が見られ、通常培養条件下ではいずれの細胞株でも結果は一定しなかった。幹細胞培養条件下でのみ **PARP1** ノックダウン細胞株が増殖抑制をきたすかどうか、すなわち **PARP1** が滑膜肉腫幹細胞のみの増殖に関与し、分化した腫瘍細胞の増殖には寄与しないかどうかを検討するためにノックダウン効率を上げた細胞株を樹立し検証するとともにコロニーフォーメーションアッセイやマウス異種移植片を用いた限界希釈実験を施行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 白川智沙斗、三野和宏、深澤拓夢、中積宏之、木村太一、堂本栄治、川村秀樹	4. 巻 119
2. 論文標題 脾神経内分泌腫瘍術後5年目に発症した胃 mixed neuroendocrine non-neuroendocrine neoplasm (MiNEN) の一例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 245-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐々木 耕、長島 一哲、木村 太一、加藤 茜、江上 太基、伊藤 淳、多谷 容子、中積 宏之、馬場 麗、加藤 貴司	4. 巻 64
2. 論文標題 短期間で著明な形態的变化を内視鏡的に観察しえた胃癌の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本消化器内視鏡学会雑誌	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tachibana Shion、Mizukami Yusuke、Ono Yusuke、Sugiyama Yuya、Okada Tetsuhiro、Kitazaki Arisa、Sasajima Junpei、Tominaga Motoya、Sakamoto Jun、Kimura Keisuke、Omori Yuko、Furukawa Toru、Kimura Taichi、Tanaka Shinya、Nagashima Kazuo、Karasaki Hidenori、Ohta Tomoyuki、Okumura Toshikatsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic Tracing of Clonal Expansion and Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Case Report and Multi-Region Sequencing Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.00728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagashima Kazunori、Kato Takashi、Kimura Taichi、Kishi Kazuma、Baba Urara	4. 巻 19
2. 論文標題 An elderly woman with severe enteritis mimicking infectious enteritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 482-484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5217/ir.2020.00038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	津田 真寿美  (Tsuda Masumi)  (30431307)	北海道大学・医学研究院・准教授    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------