

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791383

研究課題名（和文） 滑膜肉腫幹細胞の同定・解析と新規分子標的治療への応用

研究課題名（英文） Identification of synovial sarcoma stem cell as a new therapeutic target

研究代表者

木村 太一（KIMURA TAICHI）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90435959

研究成果の概要（和文）： 無血清・低接着条件によるsphere形成法を用いて滑膜肉腫幹細胞の分離・濃縮を試み、幹細胞性の有無の指標として、Oct3, Nanog, Sox2等の幹細胞性の維持にかかわる遺伝子群の発現量を半定量的RT-PCR法により確認したところ、形成されたsphereにおいて有意に発現量の増加を認めた。次にsphere成分とnon-sphere成分をNOD/SCIDマウスの皮下に移植し腫瘍形成能の検討を行った結果、sphere群で有意に高い腫瘍形成能が見られた。また両者のgene expression profileの比較解析を行い幹細胞マーカー候補となりうる表面抗原を複数同定した。候補分子に対する特異抗体及びセルソーターを用いて陽性群と陰性群を分離したところ陽性群で有意に高い造腫瘍能を認めた。

我々は初めて滑膜肉腫細胞株において腫瘍幹細胞様の性質を有する細胞群を分離・濃縮する事に成功し、滑膜肉腫幹細胞マーカーの同定にも成功した。このことは滑膜肉腫における新規治療標的を探索する上で極めて重要な発見であると考ええる。

研究成果の概要（英文）： We attempted to identify a synovial sarcoma stem cell with sphere culture. The higher expression of stemness genes, Oct3, Nanog, and Sox2 was observed in the sphere subpopulation, and higher tumorigenicity was also observed in the xeno-plantation made from sphere subpopulation. Next, we compare the gene expression profiles between sphere and non-sphere subpopulation and determined candidate genes of the stem cell marker. Using the specific antibodies and cell sorter, we divided candidate gene positive and negative subpopulation, and analyzed the difference of tumorigenicity. We conformed that candidate gene positive subpopulation possess higher tumorigenicity than negative one.

In this study, we first detect synovial sarcoma stem cell and stem cell marker, and these findings play a very important role about exploitation the new therapy against synovial sarcoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：滑膜肉腫、癌幹細胞

## 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悪性腫瘍で、若年成人の四肢関節近傍に好発し、予後不良で現状では有効な治療法は存在しない。様々な肉腫と同様に滑膜肉腫においても染色体相互転座による特有のキメラ遺伝子 SYT-SSX の形成、発現がほぼ全例で見られる。組織学的には上皮性成分と肉腫成分が混在して見られ、近年の研究からその発生母地は滑膜ではなく間葉系の未分化な細胞由来の可能性が示唆されている。

近年、組織幹細胞特異的なマーカーの発見により、癌にもまた正常組織と同様のヒエラルキーが存在し、その頂点に位置する少数の幹細胞様癌細胞(癌幹細胞)のみが強い自己複製能と癌形成能を有することが明らかになってきた。最近の研究では癌幹細胞は様々な抗癌剤や放射線療法にも抵抗性を示し癌治療の重要な標的として癌幹細胞の性状解析と新規治療法の開発が精力的に進められている。脳腫瘍や血液系腫瘍、種々の癌腫では上記のような癌幹細胞に関する知見が次々と蓄積されているのに対し、非上皮性腫瘍である悪性軟部腫瘍に関しては報告が少なく、とりわけ滑膜肉腫においては皆無である。そのため我々は滑膜肉腫における癌細胞の分離・同定を試み、その性状解析から新規治療法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

滑膜肉腫における癌幹細胞の同定・解析を行い、治療への応用を検討することを目的に 1) Side population 法, 2) Sphere 形成法を用いて滑膜肉腫における癌幹細胞の濃縮を試みる。さらに遺伝子発現プロファイルの比較から幹細胞性の維持に関わる分子群や特異的な表面抗原を候補分子とし、種々の評価系を用いて予後との相関や治療標的として

の有用性を解析することで臨床応用への可能性を評価・検証する。

## 3. 研究の方法

(1) Side population 法による滑膜肉腫幹細胞の分離: 滑膜肉腫細胞株を DNA 結合色素 Hoechst33258 で染色し、FACS を用いて蛍光強度を測定する。蛍光強度が低く、ABC トランスポーター阻害薬で処理した群で消失する細胞集団を分離する。

(2) Sphere 形成法による滑膜肉腫幹細胞の分離: 無血清培地及び間葉系幹細胞用培地を用い検討する。また一般的な sphere 形成法で用いられる低接着性の培養 dish を使用する。上記条件により sphere が形成された場合、継代培養を複数回行い sphere 形成が維持され得るかを解析し後述する自己複製能の有無を *in vitro* で検討する。

(3) 滑膜肉腫幹細胞の Gene expression profile 解析: SP 細胞と non-SP 細胞、Sphere と non-Sphere を用いて gene expression profile の比較解析を行う。SP 法、sphere 形成法の両方で有意に変動のみられた遺伝子を後述する解析の候補遺伝子とする。候補遺伝子としては既存の幹細胞マーカーや EGFR などの増殖因子受容体を含む表面抗原、Oct3/4 等の stemness gene が同定されることを期待する。

(4) 滑膜肉腫幹細胞の mouse xenograft 作製、継代による自己複製能の検証

1), 2) で得られた SP 細胞、non-SP 細胞および sphere, non-Sphere をそれぞれ NOD/SCID マウスの両脇腹に皮下移植し腫瘍形成能を比較する。腫瘍を形成し得る最小の個数で形成された xenograft を新たな NOD/SCID マウスに継代移植し自己複製能の有無を解析する。

#### 4. 研究成果

(1) 幹細胞培養条件の最適化と sphere 形成・造腫瘍能の確認: 滑膜肉腫幹細胞を分離・濃縮するために、無血清・低接着条件による sphere 形成法を用いて滑膜肉腫幹細胞の分離・濃縮を試みた。最初に3つの滑膜肉腫細胞株を用いて、血清、培地、初期細胞数、培養日数等の種々の条件の最適化を行った。幹細胞性の有無の指標として、Oct3, Nanog, Sox2 等の幹細胞性の維持にかかわる遺伝子群の発現量を半定量的 RT-PCR 法により確認した。その結果いずれの細胞株においても sphere 成分において有意に stemness gene の発現上昇が認められた。最適化された sphere culture の条件下で培養した細胞を、通常条件で培養した細胞株をコントロールとして NOD/SCID マウスの皮下に移植し腫瘍形成能の検討を行った。その結果形成された腫瘍は sphere 成分で有意に高い造腫瘍能が認められた。

(2) Sphere 成分の遺伝子発現比較解析による候補分子の抽出: Sphere と non-sphere からそれぞれ total RNA を抽出し gene expression profile の比較解析を行った。その結果、幹細胞マーカー候補となりうる表面抗原、幹細胞性の維持に関与する可能性のある転写因子を複数同定した。

(3) 滑膜肉腫幹細胞マーカーの同定と幹細胞の分離・濃縮: 幹細胞マーカーを同定するために候補分子 A に対する特異抗体で細胞株を標識し、セルソーターを用いて陽性群と陰性群を分離しそれぞれを NOD-SCID マウスに皮下移植したところ分子 A 陽性群で有意に高い造腫瘍能を認めた。分子 A 陽性群と陰性群を NOD/SCID マウスの皮下に移植し腫瘍形成能の検討を行った。その結果形成された腫瘍は sphere 成分で有意に高い造腫瘍能が認められた。さらに移植細胞数を段階的に減少さ

せたところ、 $2 \times 10^3$  以下では sphere 成分のみ腫瘍形成が確認され、分子 A が高い腫瘍形成能を有する幹細胞成分を濃縮し得る事が確認された。

(4) 現状及び今後の展望: 現在、陽性細胞群が自己複製能、多分化能を有するかについてマウス皮下移植片の継代実験及び腫瘍細胞の形態、免疫組織化学的解析を実施中である。また同時に in vitro の系で過剰発現及び発現抑制の系を用いて候補分子が幹細胞性に関与するメカニズムの解析を行っている。今後は候補分子の幹細胞性制御のメカニズムから新規治療法の開発を目指していく。

(5) 結語: 我々は初めて滑膜肉腫細胞株において腫瘍幹細胞様の性質を有する細胞群を分離・濃縮する事に成功し、滑膜肉腫幹細胞マーカーの同定にも成功した。このことは滑膜肉腫における新規治療標的を探索する上で極めて重要な発見であると考えられる。

#### 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 5 件)

1. Wang, L., Nishihara, H., Kato, Y., Kimura, T., Tanino, M., Nishio, M., Endo, T., Koike, T., and Tanaka, S. DOCK2 regulates cell proliferation through Rac and ERK activation in B cell lymphoma. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 査読有 395, 111-115, 2010.
2. Tabu, K., Kimura, T., Sasai, K., Wang, L., Bizen, N., Nishihara, H., Taga, T., Tanaka, S. Analysis of an alternative human CD133 promoter reveals the implication of Ras/ERK pathway in tumor stem-like hallmarks. **Mol. Cancer.** 査読有 9, 39-54, 2010.

3. Takiyama, A., Wang, L., Tanino, M., Kimura, T., Kawagishi, N., Kunieda, Y., Katano, H., Nakajima, N., Hasegawa, H., Takagi, T., Nishihara, H., Sata, T., Tanaka, S. Sudden death of a patient with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection by acute respiratory distress syndrome. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 査読有 63, 72-74, 2010.

4. Ono, H., Okabe, M., Kimura, T., Kawakami, M., Nakamura, K., Dnajo, Y., Takasugi, H., Nishihara, H. Colonic metastasis from primary carcinoma of the lung: report of a case and review of Japanese literature.

**Clin. J. Gastroenterol.**, 査読有 2, 89-95, 2009.

5. Kimura, T., Sakai, M., Tabu, K., Wang, L., Tsunematsu, R., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., Nishihara, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ladanyi, M., Tanaka, S., Nakayama, KI.

Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration.

**Lab. Invest.** 査読有 89, 645-656, 2009.

[学会発表] (計 20 件)

1. 高阪真路、笹井研、高橋健太、赤城剛、谷野美智枝、木村太一、西原広史、田中伸哉  
腫瘍形成における oncogene-induced

Senescence 回避の解析

第 69 回日本癌学会学術総会

2010. 9. 22-9. 24 大阪国際会議場

2. Hiroko, Nakamura, Hiroshi, Nishihara, Taichi, Kimura, Kei, Wang, Satoshi, Fukuda, Shinya Tanaka.

Crkl plays a pivotal role in tumorigenesis of the oral squamous cell carcinoma.

第 69 回日本癌化学会学術総会

2010. 9. 22-9. 24 大阪国際会議場

3. Wang L, Nishihara H, kimura T, Tanino M, Nishio M, Obara M, Endo T, Koike T, Tanaka S.

DOCK2 regulates cell proliferation

Through Rac and ERK activation in B cell Lymphoma.

第 69 回日本癌学会学術総会

2010. 9. 22-9. 24 大阪国際会議場

4. Shinji Kohsaka, Ken Sasai,

Kenta Takahashi, Tsuyoshi Akagi,

Mishie Tanino, Taichi Kimura,

Hiroshi Nishihara, Shinya Tanaka.

Analysis of escape from oncogene-induced senescence in tumorigenesis

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting;

Mechanisms and Models of Cancer Aug.

17-21, 2010. Cold Spring Harbor, USA

5. Taichi Kimura, Lei Wang,

Miho Nodagashira, Hiroko Nakamura, Mishie

Tanino, Hiroshi Nishihara, Shinya Tanaka.

Analysis of stem-like cell features of human synovial sarcoma.

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting;

Mechanisms and Models of Cancer Aug.

17-21, 2010. Cold Spring Harbor, USA

6. 青柳瑛子、王磊、笹井研、谷野美智枝、木村太一、西原広史、藤本真、石井伸明、伊東民雄、田中伸哉

捺印標本を用いたグリオーマの MGMT 免疫染色の検討

第 51 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会)

2010. 5. 29-5. 31 パシフィコ横浜

7. 菅野宏美、西原広史、谷野美智枝、木村太一、高橋健太、山口秀、成田拓人、小林浩之、寺坂俊介、田中伸哉

新 WHO 分類に基づ malignant glioma 65 症例

の review: 組織像と全生存率の関連について  
第 28 回日本脳腫瘍病理学会

2010. 5. 21-5. 22 大阪市中央公会堂

8. 泉真祐子、長谷川祐太、高阪真路、谷野美智枝、木村太一、古山裕康、千葉進、及川光照、西原広史、田中伸哉

神経症状を初発とし診断に苦慮した血管内リンパ腫の一例

第 99 回日本病理学会総会 2010. 4. 27-4. 29  
京王プラザホテル

9. 谷野美智枝、ロシャン・マハビール、菅野宏美、鈴木宏明、山城勝重、木村太一、西原広史、丸川活史、松野吉宏、田中伸哉

放射線治療後 7 年間生存し得た原発性悪性心膜中皮腫の一例

第 99 回日本病理学会 2010. 4. 27-4. 29  
京王プラザホテル

10. 佐藤真実、谷野美智枝、木村太一、西原広史、伊東民雄、佐和広基、金子貞男、村田純一、加藤正仁、田中伸哉

神経膠腫のパラフィン包埋切片を用いた FISH 法による 1 番短腕の欠失の遺伝子解析と予後の検討

第 99 回日本病理学会 2010. 4. 27-4. 29  
京王プラザホテル

11. 菅野宏美、西原広史、谷野美智枝、木村太一、田中伸哉

Glioma に特徴的な血管構造の臨床病理学的解析

第 99 回日本病理学会 2010. 4. 27-4. 29  
京王プラザホテル

12. 湯澤明夏、柴田ひな、菅野宏美、谷野美智枝、矢野俊介、木村太一、西原広史、田中伸哉

脊髄腫瘍として発見され、ユーイング肉腫との鑑別を要した myeloid sarcoma の一例

第 99 回日本病理学会 2010. 4. 27-4. 29  
京王プラザホテル

13. 瀧山晃弘、王磊、谷野美智枝、木村太一、

西原広史、川岸直樹、國枝保幸、片野晴隆、長谷川秀樹、高木知敬、佐多徹太郎、田中伸哉

新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) 肺炎によるびまん性肺胞傷害により急死した 1 剖検例  
第 99 回日本病理学会 2010. 4. 27-4. 29  
京王プラザホテル

14. 石川麻倫、大場彩音、西原広史、菅野宏美、

木村太一、谷野美智枝、田中伸哉

シグナル伝達分子の Immunoprofiling; 胃癌 20 例における臨床病理学的検討

第 99 回日本病理学会 2010. 4. 27-4. 29  
京王プラザホテル

15. Kiyonaga Fujii, Ken Sasai, Taichi Kimura, Shinya Tanaka, Fuyuhiko Inagaki.

Quantitative Proteome Analysis in Transformed Astrocyte Cell using Spectral Counting and SILAC Methods.

Pennsylvania Convention Center.

2009. 5. 31-6. 4

Philadelphia, Pennsylvania, USA

16. 木村太一、王磊、平賀博明、西原広史、田中伸哉

滑膜肉腫細胞株における CD133 の機能解析  
第 98 回日本病理学会総会 2009. 5. 1-5. 3  
国立京都国際会館

17. 谷野美智枝、高阪真路、木村太一、西原広史、進藤正信、田中伸哉

間質性肺炎の経過中、急性に呼吸不全が悪化し死亡された 11 剖検例の検討

第 98 回日本病理学会総会 2009. 5. 1-5. 3  
国立京都国際会館

18. 石川麻倫、柴田頌太、谷野美智枝、

木村太一、西原広史、篠原敏也、田中伸哉

Clostridium 属によるガス壊疽により死亡した 2 剖検例

第 98 回日本病理学会総会 2009. 5. 1-5. 3  
国立京都国際会館

19. 吉永智彰、西原広史、福島祐介、佐和弘

基、村上普美、木村太一、谷野美智枝、田中  
伸哉

hCG 産生大腸癌の分子病理学的検討

第 98 回日本病理学会総会 2009. 5. 1-5. 3

国立京都国際会館

20. 野田頭未歩、笹井研、木村太一、青柳瑛  
子、

田中伸哉

グリオーマにおかえる Olig2 発現制御機構と  
機能解析

第 98 回日本病理学会総会 2009. 5. 1-5. 3

国立京都国際会館

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 太一 (KIMURA TAICHI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90435959

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし