

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791621

研究課題名（和文） 滑膜肉腫幹細胞の分離・同定と新規診断・治療標的の探索

研究課題名（英文） Identification of synovial sarcoma initiating cells

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）：我々は滑膜肉腫細胞株におけるスフィア形成細胞群で有意に高発現しており、幹細胞性遺伝子発現と高い相関の見られる細胞表面抗原Aを同定した。表面抗原Aは滑膜肉腫細胞株から高い造腫瘍能、自己複製能、多分化能を有する細胞集団を分離・濃縮可能であり、滑膜肉腫幹細胞マーカーであることが判明した。表面抗原Aの発現の有無と悪性度との関連を検討するために、42例の滑膜肉腫症例を用いた免疫組織化学的検討では、表面抗原A陽性症例では有意に全生存期間の短縮が見られた。さらに表面抗原Aの特異的阻害剤による腫瘍増殖抑制効果の検討から、2種の滑膜肉腫細胞株で有意な増殖抑制効果を有する事が判明した。

本研究において我々は初めて滑膜肉腫幹細胞の存在を明らかにし、分離・濃縮を可能とする表面抗原Aを同定した。さらに表面抗原Aの阻害剤による滑膜肉腫の増殖抑制効果、臨床検体における予後不良因子であることも解明した。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。

研究成果の概要（英文）： We demonstrated that the cell surface antigen A is highly expressed in the sphere forming subpopulation of synovial sarcoma and correlate with the expression of stemness genes. Antigen A positive cells possessed high tumorigenic, self-renewing, and re-popularizing activity; therefore we concluded that the Antigen A can enrich synovial sarcoma initiating cells. By immunohistochemical analysis of 42 synovial sarcoma surgical specimens, Antigen A expression was well correlated with poor prognosis. Moreover, the specific inhibitor of antigen A could suppress the proliferation of synovial sarcoma cell-lines *in vitro*.

In this study, we first detect synovial sarcoma initiating cells and a specific 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
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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・腫瘍幹細胞・新規治療標的分子

## 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。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、その発生母地は滑膜ではなく間葉系幹細胞様の多能性を有する未分化な細胞の可能性が示唆されている。

近年、悪性腫瘍は clonal な細胞集団ではなく、正常組織と同様のヒエラルキーが存在し、頂点に位置する少数の幹細胞様腫瘍細胞(腫瘍幹細胞)のみが強い自己複製能と腫瘍形成能を有することがわかってきた。最近の研究では腫瘍幹細胞は種々の化学療法や放射線療法にも抵抗性を示し治療の新たな標的として性状解析と治療法の開発が精力的に進められている。

我々は腫瘍幹細胞成分のみがスフィアを形成し生存し得る培養系を用いて、滑膜肉腫においても腫瘍幹細胞を濃縮しうるかどうかを検討した。SYO-1 を一定期間培養したところ、通常の紡錘型細胞中に少数のスフィア形成が確認され、NOD/SCID マウスに皮下移植したところ有意に高い腫瘍形成能を示し、滑膜肉腫中に腫瘍幹細胞が存在し特定の培養条件で濃縮し得る事が示唆された。本研究において我々は、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として予後予測や診断に有用なバイオマーカー、分子標的治療の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では幹細胞培養法を用いて滑膜肉腫幹細胞を分離・同定し、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関連や治療

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) 治療標的及びバイオマーカー候補分子の同定と絞り込み: 遺伝子発現解析の結果から幹細胞と非幹細胞で有意な差が見られる遺伝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む。

(2) 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、移植片よりも自然な発症モデルの樹立も試みる。

(3) 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: 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、分化誘導系の確立を行う。

(4) 評価系を用いた治療効果の検証: (3)で作製した治療薬候補、バイオマーカー候補を(2)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

我々はまず cDNA マイクロアレイを用いて滑膜肉腫細胞株におけるスフィア形成細胞群と非形成細胞群の遺伝子発現比較解析を行った。その結果、スフィア形成細胞で有意に高発現しており、幹細胞性遺伝子発現と高い相関の見られる細胞表面抗原 A が同定された。表面抗原 A が滑膜肉腫細胞株における腫瘍幹細胞を分離・濃縮し得るか否かを解析するために、対特異抗体を用いて FACS により陽性細胞、陰性細胞を分取し、限界希釈法による造腫瘍能の評価、NOD/SCID マウスにおける陽性細胞由来移植片の継代移植に

よる自己複製能の評価、陽性細胞由来移植片とオリジナルの細胞株由来移植片との病理組織学的解析による多分化能の評価を行った。その結果、表面抗原 A は高い造腫瘍能、自己複製能、多分化能を有する細胞集団を分離・濃縮可能であり、滑膜肉腫幹細胞マーカーであることが判明した。実際の滑膜肉腫における表面抗原 A の発現の有無と悪性度との関連を検討するために、42 例の滑膜肉腫症例を用いて免疫染色を行い、予後やその他の臨床的事項との相関解析を行ったところ、表面抗原 A 陽性症例では有意に全生存期間の短縮が見られ、表面抗原 A が予後予測を可能とするマーカーとなり得ることが示唆された。さらに表面抗原 A の特異的阻害剤による腫瘍増殖抑制効果の検討を行ったところ、*in vitro* の系において 2 種の滑膜肉腫細胞株で有意な増殖抑制効果を有する事が判明した。現在は複数の阻害剤を用いて *in vivo* での治療モデルの確立を目指し解析を進めている。

今後は分離した滑膜肉腫幹細胞の化学療法、放射線療法に対する耐性の有無とその解除等を解析するとともに、今回同定した表面抗原 A 以外の候補分子と幹細胞性の制御機構との関連についても研究を進め、新規治療標的・バイオマーカーのさらなる同定を目指す。

#### 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 8 件)

1. Kohsaka, S., Takahashi, K., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara, H., Tanaka, S. Inhibition of GSH synthesis potentiates temozolomide-induced bystander effect in glioblastoma. **Cancer Letter.**, 331(1):68-75 2013, 査読有
2. Mitamura T., Watari H., Wang L., Kanno H., Hassan MK., Miyazaki M., Katoh Y., Kimura T., Tanino M., Nishihara H., Tanaka S., Sakuragi N.

Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. **Oncogenesis.**, 2:e40, 2013, 査読有

3. Kanno H, Nishihara H, Wang L, Yuzawa S, Kobayashi H, Tsuda M, Kimura T., Tanino M, Terasaka S, Tanaka S.

Expression of CD163 prevents apoptosis through the production of granulocyte colony-stimulating factor in meningioma.

**Neuro Oncol.**, 2013 Mar 28. [Epub ahead of print], 査読有

4. Kohsaka, S., Wang, L., Yachi, K., Mahabir, R., Narita, T., Itoh, T., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara H., Tanaka, S. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. **Mol Cancer Ther.**, 11, 1289-1299, 2012, 査読有

5. Kimura, T., Wang, L., Tabu, K., Nishihara, H., Mashita, Y., Kikuchi, N., Tanino, M., Hiraga, H., Tanaka, S. CD133 negatively regulates tumorigenicity via AKT pathway in synovial sarcoma. **Cancer invest**, 30, 390-397, 2012, 査読有

6. Kanno, H., Nishihara, H., Narita, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, H., Tanino, M., Kimura, T., Terasaka S., Tanaka, S. Prognostic implication of histological oligodendroglial tumor component: clinicopathological analysis of 111 cases of malignant gliomas. **PLoS One.**, 7, e41669, 2012, 査読有

7. Yanagi, H., Wang, L., Nishihara, H., Kimura, T., Tanino, M., Yanagi, T., Fukuda, S., Tanaka, S. CRKL plays a pivotal role in tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma through the regulation of cell adhesion. **Biochem Biophys Res Commun.**, 418, 104-109, 2012, 査読有

8. Wakayama, K., Fukai, M., Yamashita, K., Kimura, T., Hirokata, G., Shibasaki, S., Fukumori, D., Haga, S. Sugawara, M., Suzuki, T., Taniguchi, M., Shimamura, T., Furukawa, H., Ozaki, M., Kamiyama, T., Todo, S. Successful transplantation of rat hearts subjected to extended cold preservation with a novel preservation solution. **Transpl Int.**, 25, 696-706, 2012, 査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Hiroshi Nishihara, Hiroko Yanagi, Yusuke Fukushima, Teruki Yanagi, Lei Wang, Taichi Kimura, Mishie Tanino, Masumi Tsuda and Shinya Tanaka. : The distinct role of CRKI, CRKII and CRKL in tumorigenesis of human head and neck squamous cell carcinoma. Mechanisms & Models of Cancer Meeting 2012.8.1-4 Salk Institute (USA)
2. Shinji Kohsaka, Lei Wang, Kazuhiro Yachi, Roshan Mahabir, Mishie Tanino, Taichi Kimura, Hiroshi Nishihara, Shinya Tanaka: STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulation of MGMT expression. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting; Mechanisms and Models of Cancer 2012.8.14-18, Cold Spring Harbor Laboratory (USA)
3. Taichi Kimura, Lei Wang, Mishie Tanino, Hiroshi Nishihara, Shinya Tanaka: Identification and analysis of synovial sarcoma initiating cells. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting; Mechanisms and Models of Cancer 2012.8.14-18, Cold Spring Harbor Laboratory (USA)
4. Shinya Tanaka, Shinji Kohsaka, Kouich Tabu, Lei Wang, Masumi Tsuda, Taichi Kimura, Mishie Tanino, Hiroshi Nishihara, Hiromichi Kimura: Molecular and pathological analysis of malignant glioma: from tissues to therapeutic reagents 第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21, ロイトン札幌ほか（札幌）
5. 木村太一, 王磊, 平賀博明, 谷野美智枝, 西原広史, 田中伸哉: CD133 は AKT 経路を介して滑膜肉腫の造腫瘍能を負に制御する 第

92 回北海道医学大会腫瘍系分科会（第 106 回北海道癌談話会）2012. 10. 6, 北大（札幌）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 太一 (KIMURA TAICHI)

研究者番号：90435959

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：