

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19051

研究課題名(和文) 滑膜肉腫SYT-SSX融合遺伝子産物検出法の確立

研究課題名(英文) Detection of SYT-SSX fusion gene product in tissue section.

研究代表者

齊郷 智恵美 (Saigo, Chiemi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10547681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：軟部腫瘍では、しばしば、染色体転座の結果、腫瘍特異的融合遺伝子が、生じ、それを検出することで確定診断が可能である。しかし、通常ホルマリン固定標本作成後に、融合遺伝子産物の確認が必要となり、RNAが保存された材料の確保に困難が生じる場合が少なくない。従来は、FISH法、あるいは、パラフィン標本から抽出したRNAを材料としてのRT-PCRが試みられることが多かったが、一般病理検査室への普及には難点があった。通常ホルマリン固定標本で、滑膜肉腫の融合遺伝子産物SYT-SSX(SS18)を免疫組織染色法で検出する技法の確立を目的として、SYT-SSX接合部に反応する特異抗体を開発した。

研究成果の概要(英文)：Synovial sarcoma is an aggressive sarcoma with specific reciprocal chromosomal translocation of SS18 (also known as SYT) and SSX genes. In the present study, we aimed to detect the SS18-SSX fusion gene product in routinely processed pathological synovial sarcoma tissue section. Monoclonal antibodies to amino acids peptide, which covered the fusion region of SS18-SSX, were newly established and subsequently characterized by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Western-immunoblotting, and Immunohistochemical staining. We generated over thirty antibodies, which immunostained SS18-SSX gene product in routinely processed formalin-fixed and paraffin-embedded tissue section; however, most antibodies exhibited the cross reactivity with SS18 and/or SSX proteins as well as SS18-SSX chimera protein. By contrast, a monoclonal antibody designated AS1SS, preferably reacted with boundary region of SS18-SSX chimera protein.

研究分野：人体病理学

キーワード：滑膜肉腫 特異抗体

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫・軟部腫瘍などでは、しばしば、染色体転座の結果、腫瘍特異的融合遺伝子が生じ、それを検出することで確定診断が可能である。しかし、特に軟部腫瘍などでは、通常ホルマリン固定標本作成後に、融合遺伝子産物の確認が必要となり、RNA が保存された材料の確保に困難が生じる場合が少なくない。従来は、FISH 法あるいは、パラフィン標本から抽出した RNA を材料としての RT-PCR が試みられることが多かったが、蛍光顕微鏡、PCR 装置、電気泳動装置を含め、一般病理検査室への普及には難点があった。また、安定した結果を得るためには技術的経験も必要である。

申請者の研究室では軟部培養細胞株を用いたクロマチン再構成因子複合体・転写伸長因子異常の研究のため滑膜肉腫細胞数種、SYT-SSX 融合遺伝子組み換えベクターなどを整え研究を行っている(参考文献参照)。近年、SYT-SSX 融合境界ペプチドを用いた滑膜肉腫のペプチドワクチン治療の基礎的研究が報告され、MHC での抗原提示が起こり得ることが報告された。すなわち、SYT-SSX 融合境界ペプチドが免疫源となりうるということが判明した。

参考文献

- 1) Sonobe H, Takeuchi T, Taguchi T, Shimizu K, Iwata J, Furihata M, Ohtsuki Y. *J Pathol.* 187:594-597, 1999
- 2) Sonobe H, Takeuchi T, Liag SB, Taguchi T, Yuri K, Shimizu K, Iwata J, Furihata M, Ohtsuki Y, Testa JR. *Int J Cancer.* 82:459-464, 1999
- 3) Takeuchi T, Nicole S, Misaki A, Furihata M, Iwata J, Sonobe H, Ohtsuki Y. *Am J Pathology* 158:663-672, 2001
- 4) Takeuchi T, Heng HH, Ye CJ, Liang SB, Iwata J, Sonobe H, Ohtsuki. *Am J Pathol.* 163:1395-1404, 2003
- 5) Takeuchi T, Adachi Y, Sonobe H, Furihata M, Ohtsuki Y. *Oncogene* 25: 7059-7069, 2006
- 6) Takeuchi T, Adachi Y, Nagayama T. *Carcinogenesis* 33, 548-554, 2012
- 7) Yasukawa T, Bhatt S, Takeuchi T et al. *Cell Report.* 2013; 2:1129-1136,

2. 研究の目的

通常ホルマリン固定標本で、滑膜肉腫の融合遺伝子産物 SYT-SSX(SS18)を免疫組織染色法で検出する技法の確立を目的とする。悪性末梢神経腫瘍、明細胞肉腫を含む多数の軟部腫瘍、癌組織を利用し、この単クローン抗体の有効性を検討する。また、発現ベクター(N末端-FLAG 標識 SYT-SSX,同-SYT, 同-SSX1, 2)による外来性タンパク質発現、そのウエスタンブロット法による検討により特異性を検討する。もし、特異性が、十分ではない場

合、研究目的(概要)で記述したの方法による SYT-SSX 遺伝子産物検出方法の確立を試みる。

3. 研究の方法

SYT-SSX(SS18)ペプチドを BALB/C マウスに免疫し、通常方法で、単クローン抗体を得る。まず ELISA で免疫ペプチドに反応する単クローン抗体を得る。つぎに、通常固定標本で、免疫染色に耐える抗体を選択し、特異性の検討をウエスタンブロット法などで行って特異性有効性を検討する。

要約すると、QRPYGYDQ-IMPCKPA (SS18-SSX) 接合部ペプチドを、Keyhole limpet hemocyanin(KLH) に結合させ、KLH-QRPYGYDQ-IMPCKPA conjugate を作成し、BALB/c マウスに免疫し、常法どおり、Hybridoma を作成した。ELISA 法により、免疫ペプチドに反応する単クローン抗体を産生する Hybridoma をスクリーニングし、限界希釈法によりクローン化した。樹立した抗体と、PQRPYGYDQ (SS18 peptide), IMPCKPA (SSX peptide), GQYGNYYQ (C-terminus of SS18 peptide), QRPYGYDQ-IMPCKPA (SS18-SSX peptide) との反応性を ELISA 法で検討した。N 末端に FLAG tag を付した SS18, SSX, SS18-SSX 融合タンパク質を、一過性に 293FT 細胞を用いて発現ベクターにより作成し、イムノブロット法で抗体との反応性を検討した。滑膜肉腫を含む軟部腫瘍切片を免疫組織染色し反応性を検討した。

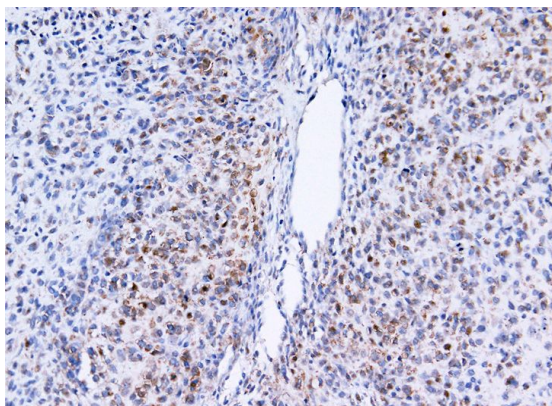
4. 研究成果

計 30 種類以上の、QRPYGYDQ-IMPCKPA (SS18-SSX) 接合部ペプチドに反応する単クローン抗体を作成した。SS18 の QRPYGYDQ でみられる glutamine and tyrosine rich repeat は、種々の核内タンパク質でみられ、免疫原性が強く、今回、申請者が樹立した単クローン抗体の多くが、この SS18 領域に反応し、このために、SS18-SSX 融合タンパク質に対する特異性が得られなかった。これに対して BG35 と命名した抗体は、ELISA 法で、SS18-SSX 接合部に特異的な反応を示し、イムノブロット法では、SS18-SSX 全長融合タンパク質には反応しなかったが、C 末端が、QRPYGYDQ-IMPCKPA である SS18-SSX タンパク質には反応した。すなわち、BG35 は QRPYGYDQ-IMPCKPA の C 末端部および、その近傍が露出したタンパク質に対して反応する酵素切断部位特異抗体であることが示唆された。トリプシン消化により SS18-SSX の C 末端が、QRPYGYDQ-IMPCKPA となることを期待されたため、病理組織切片を、トリプシン処理したうえで、免疫組織染色を行ったところ、BG35 は 9 症例の滑膜肉腫細胞に反応性を示したが、今回検討しえた、他の軟部肉腫標本には反応性がみられなかった。BG35 の immunoreactivity は滑膜肉腫細胞の核にみられ、これは、SS18-SSX タンパク質が、核に局在するとの、従来の報告と合致する結果と考えられた。現時点で、滑膜肉腫の約半数の

症例は予後不良であることが知られており、手術適合のない症例や、切除術後、遠隔転移を含む再発例では難治性である。培養細胞株を用いた in vitro の検討では、SS18-SSX キメラタンパク質の発現を抑制することで、滑膜肉腫の増殖抑制が認められることにより、SS18-SSX キメラタンパク質あるいは、それがもたらす発癌分子経路を阻害する分子標的開発が待たれる。本研究で、申請者が作成した BG35 抗体は、病理組織診断を補助できる可能性があるとともに、

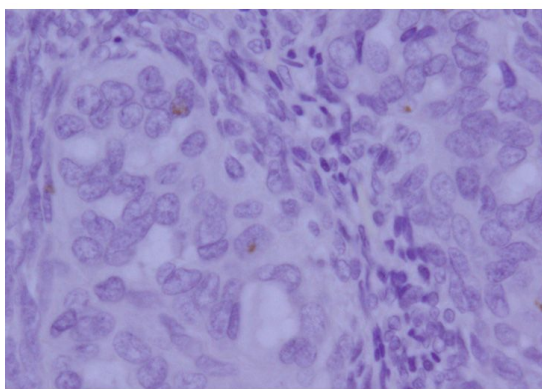
IgG 型抗体であり、proximal ligation assay に応用可能で、SS18-SSX キメラタンパク質と結合する因子の検討、それに対する分子標的薬剤の検討評価にも有用であると期待される。さらに、悪性リンパ腫や軟部腫瘍での特異的な腫瘍融合キメラタンパク質に対する特異抗体が、作成できる可能性が示唆された。

要約すると、滑膜肉腫特異的に発現する SS18-SSX キメラタンパク質のホルマリン固



定通常病理標本での検出を目的として、SS18-SSX 接合部ペプチドに対する単クローン抗体を作製した。

そのうち、BG35 と命名した単クローン抗体は、



Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) およびイムノプロット法で、C 末端に露出する SS18-SSX 接合部ペプチド領域を特異的に認識することが明らかになった。SS18-SSX キメラタンパク質をトリプシンで限定分解することにより、このエピトープが露出し BG35 と反応することより、BG35 は酵素(トリプシン)切断ヶ所特異的抗体であることが判明した。病理組織診断上、滑膜肉腫と鑑別が問題になる、各種悪性軟部腫瘍とは免疫組織学的

に反応せず、BG35 の滑膜肉腫病理診断への有用性が示唆された。滑膜肉腫細胞内局在を含め SS18-SSX キメラタンパク質の動態を検討するにも有用であることが示唆された。

さらに、proximal ligation assay を行い、SYT-SSX タンパク質に近接する癌関連遺伝子産物の同定を試みた。

上図に示すように、SSX-SYT と ARID1A が、共存していることが、あきらかになった。

抗 SYT-SSX タンパク質と抗 ARID1A 抗体による in situ proximal ligation assay で、滑膜肉腫組織を染色したものの。

図 2 in situ proximal ligation assay, 抗 TLE1 抗体と、抗 SS18-SSX 抗体による染色。

ごく少量の陽性シグナルのみ認める。

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4件、いずれも査読あり)

1. Maeda K, Saigo C, Kito Y, Sakuratani T, Yoshida K, Takeuchi T.

Expression of TMEM207 in Colorectal Cancer: Relation between TMEM207 and Intelectin-1. J Cancer. 2016 Jan 1;7(2):207-13. doi: 10.7150/jca.13732.

2. Saigo C, Kito Y, Takeuchi T.

Immunoreactivity of a Monoclonal Antibody to SS18-SSX Fusion Gene Product in Formalin-fixed Paraffin-embedded Synovial Sarcoma Tissue Section. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2016 Jun 29. [Epub ahead of print]

3. Takao C, Morikawa A, Ohkubo H, Kito Y, Saigo C, Sakuratani T, Futamura M, Takeuchi T, Yoshida K. Downregulation of ARID1A, a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, in breast cancer. J Cancer. 2017 Jan 1;8(1):1-8. doi: 10.7150/jca.16602

4. Kawashima K, Maeda K, Saigo C, Kito Y, Yoshida K, Takeuchi T. Adiponectin and Intelectin-1: Important Adipokine Players in Obesity-Related Colorectal Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2017 Apr 19;18(4). pii: E866. doi: 10.3390/ijms18040866.

[学会発表](計1件)

1. 齊郷 智恵美

SY-7-3 in situ PLA 法を応用した腫瘍診断および病態情報の獲得 第105回日本病理学会(仙台)、シンポジウム 平成26年5月12日(木)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊郷 智恵美 (SAIGO, Chiemi)
岐阜大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10547681