

令和元年5月24日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15642

研究課題名（和文）内因性2分子間相互作用の腫瘍組織での可視化検討

研究課題名（英文）Application of in situ proximal ligation assay for detecting two molecules in tissue specimens.

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） 1,500,000円

研究成果の概要（和文）：in situ Proximity Ligation Assayを用いて病理組織切片上での2分子の結合を可視化することを試みた。具体的には、軟部腫瘍での染色体転座による融合遺伝子産物の検出を、滑膜肉腫を例にとり検討し、また、口腔扁平上皮癌での腫瘍抑制因子WWOXを障害するTMEM207分子の結合を可視化する方法を開発、報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑膜肉腫で、SS18-SSX融合遺伝子産物の検出、可視化に成功した。これは染色体転座を有する腫瘍（悪性リンパ腫を含む）で通常ホルマリン固定病理切片で、融合遺伝子産物の特異的検出が可能になる道筋をつけたと考えられる。また、口腔内癌でWWOXとTMEM207の結合を検出したことで、悪性腫瘍細胞での腫瘍抑制因子機能を不活化する異常たんぱく質発現が病理組織切片で検出可能なことを示したと考える。

研究成果の概要（英文）：We performed application of in situ proximal ligation assay to detect the crucial binding of two molecules in malignant tumors. First, we tried to detect the SS18-SSX fusion protein in synovial sarcoma. Subsequently, we detected the binding of tumor suppressor factor WWOX and a small transmembrane protein, TMEM207, in oral squamous cell carcinoma.

研究分野：病理学

キーワード：滑膜肉腫 軟部腫瘍 口腔内癌 Proximity Ligation Assay

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

### 1. 研究開始当初の背景

免疫組織学手法は病理研究および病理診断学にとって重要な情報をもたらしてくれる。2重染色方法などを用いて、同一組織、細胞での、二つのタンパク質の局在を知ることは今まで可能であったが、それらの相互作用を組織標本で推し量ることは困難であった。

そのために、主として生化学的手法を用いて悪性腫瘍でのタンパク質相互作用の解明がなされてきた。これらの研究は *in vitro* での培養細胞株を含む腫瘍細胞の可溶性分画を使用した実験が主体であり通常病理標本への応用はできなかった。

近年、2つの分子の細胞あるいは組織での結合、相互作用を可視化する方法として *in situ* proximity ligation assay が発展してきた。この方法は、それぞれの分子に対する抗体を反応させ、その抗体距離が、40 nm 以下(約50アミノ酸分の距離)の場合、rolling-circle amplification (RCA) を利用してシグナル形成を行い、分子間相互作用を可視化する方法で、内因性のタンパク質相互作用、結合を可視化できる萌芽性を有している。

クロマチン再構成因子の機能不全は、多くの発癌に関与している。子宮卵巢明細胞癌のみならず、滑膜肉腫を含め多数の悪性腫瘍で、クロマチン再構成因子 ARID1A(BAF250a)の変異、機能不全が腫瘍発生、進行につながる事が報告されている。

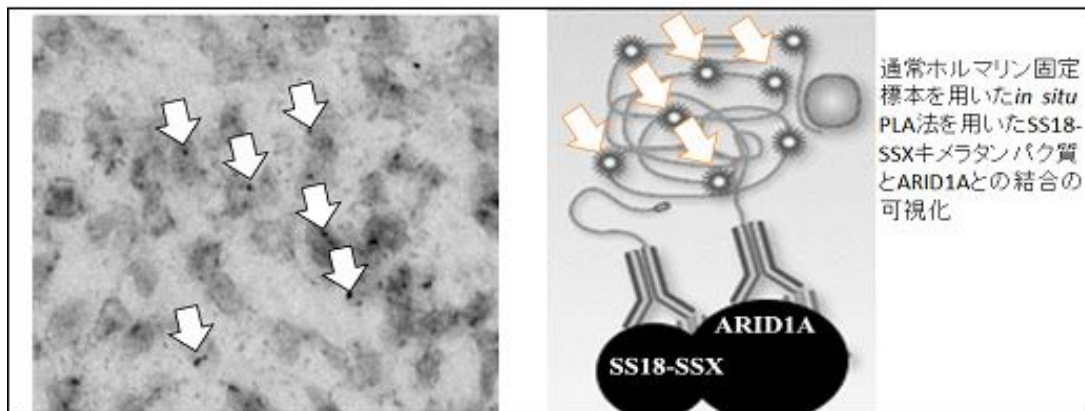
Davoli et al. 's list of tumor suppressors では PTEN, TP53, APC に次ぐ第4番目に重要な腫瘍抑制因子として ARID1A は位置づけられている。T. Davoli et al, Cell 155, 948-962 (2013)

### 2. 研究の目的

本研究は、

： *in situ* proximity ligation assay を用いて、滑膜肉腫での SS18-SSX タンパク質検出技術の開発。SS18-SSX 接合部を認識する抗体と抗 ARID1A 抗体を用いた *in situ* proximity ligation assay による2分子間相互作用、結合の有無の検討。

SS18-SSX キメラタンパク質が、SS18 のクロマチン再構成因子複合体での機能を



dominant-negative に障害することが、滑膜肉腫発生の原因であると提唱されている。

Cigall Kadoch and Gerald R. Crabtree. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics Science Advances 12 Jun 2015: Vol. 1, no. 5, e1500447

この仮説、試験管内での生化学実験の結果のように、SS18-SSX がクロマチン再構成因子複体に組み入れられているのか、SS18-SSX キメラタンパク質の接合部ペプチドに対する単クローン抗体 (BG35) とクロマチン再構成因子複体サブユニットに対する抗体を用いて *in situ* proximity ligation assay により病理組織学標本で検討する。

： での知見、経験を活かして、症例数の多い、悪性腫瘍(口腔内癌)での、分子間相互作用を検討し悪性度、予後との相関関係を検討する。ことを目的とした。

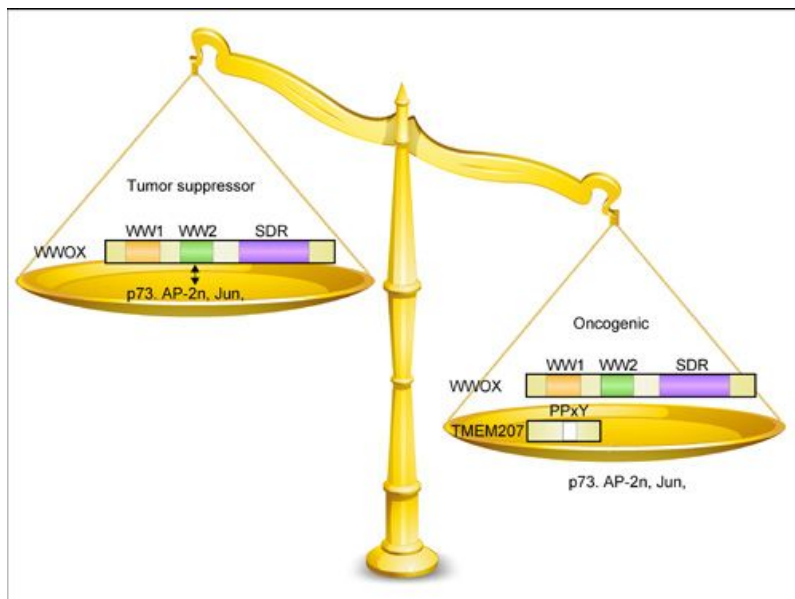
### 3. 研究の方法

通常ホルマリン固定病理標本を用いて、*in situ* proximity ligation assay による2分子間相互作用、結合の有無を可視化した。

### 4. 研究成果

：滑膜肉腫病理組織切片で、抗 SS18 抗体、抗 SSX 抗体を用いて、それぞれの分子の接合性、結合を可視化しえた。これは、SS18-SSX 融合遺伝子産物を病理組織切片で可視化できることを意味し、悪性リンパ腫や軟部腫瘍などの、染色体転座による特異的融合遺伝子産物を検出できる可能性を示したと考える。

また、上図のように、ARID1A 分子と SS18-SSX キメラ分子の結合を滑膜肉腫の病理組織切片で



による競合性結合であることを示唆する結果と考える（上図参照）。

検出した。  
この結果は、SS18-SSX キメラ分子の滑膜肉腫形成が、クロマチン再構成因子複合体の機能不全にあることを示唆する結果と考えられる。

：口腔内癌で、腫瘍抑制因子 WWOX と TMEM207 分子が結合していることを証明した。これに引き続く生化学的手法実験結果と併せると、口腔内癌で腫瘍抑制因子が、発現しているにもかかわらず、その機能が障害されている分子病理メカニズムのひとつが、異所性過剰発現タンパク質

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件) (1)~(12)のいずれも査読あり

( 1 ) Asano Y, Saigo C, Kito Y, Iwata Y, Yoshida K, Takeuchi T. Response to Yang et al. J Mol Med (Berl). 2019;97(5):739-740. doi: 10.1007/s00109-019-01775-z.

( 2 ) Inoue K, Hatano K, Hanamatsu Y, Saigo C, Kito Y, Bunai K, Shibata T, Takeuchi T. Pathobiological role of cleft palate transmembrane protein 1 family proteins in oral squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2019;145(4):851-859. doi: 10.1007/s00432-019-02843-0.

( 3 ) Asano Y, Takeuchi T, Okubo H, Saigo C, Kito Y, Iwata Y, Futamura M, Yoshida K. Nuclear localization of LDL receptor-related protein 1B in mammary gland carcinogenesis. J Mol Med (Berl). 2019;97(2):257-268. doi: 10.1007/s00109-018-01732-2.

( 4 ) Saigo C, Kito Y, Takeuchi T. Cancerous Protein Network That Inhibits the Tumor Suppressor Function of WW Domain-Containing Oxidoreductase (WWOX) by Aberrantly Expressed Molecules. Front Oncol. 2018;8:350. doi: 10.3389/fonc.2018.00350.

( 5 ) Egawa Y, Saigo C, Kito Y, Moriki T, Takeuchi T. Therapeutic potential of CPI-613 for targeting tumorous mitochondrial energy metabolism and inhibiting autophagy in clear cell sarcoma. PLoS One. 2018;13(6):e0198940. doi: 10.1371/journal.pone.0198940.

( 6 ) 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. Downregulation of ARID1A, a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, in breast cancer. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2018 Mar;26(3):206-211. doi: 10.1097/PAI.0000000000000413.

( 7 ) Bunai K, Okubo H, Hano K, Inoue K, Kito Y, Saigo C, Shibata T, Takeuchi T. TMEM207 hinders the tumour suppressor function of WWOX in oral squamous cell carcinoma. J Cell Mol Med. 2018;22(2):1026-1033. doi: 10.1111/jcmm.13456.

( 8 ) Saigo C, Iinuma K, Kameyama K, Mizutani K, Nakano M, Kito Y, Takeuchi T. Case Report Organ-confined plasmacytoid urothelial carcinoma: implication of the lack of expression of the receptor tyrosine kinase MET. Int J Clin Exp Pathol 2018;11(3):1754-1757 <http://www.ijcep.com/files/ijcep0069737>

( 9 ) Kito Y, Saigo C, Takeuchi T. Novel Transgenic Mouse Model of Polycystic Kidney Disease. Am J Pathol. 2017;187(9):1916-1922. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.05.002.

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

( 11 ) 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;8(1):1-8. doi: 10.7150/jca.16602.

( 12 ) Kawashima K, Saigo C, Hanamatsu Y, Niwa A, Kito Y, Kawaura R, Kuze B, Takeuchi T. Expression of transcription factor ZEB1 in sarcomatoid salivary duct carcinoma of the parotid gland. Int J Clin Exp Pathol 2017;10(5):5779-5783 [www.ijcep.com/](http://www.ijcep.com/) ISSN:1936-2625/IJCEP0049925

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Saigo, Chiemi / 齊郷 智恵美, Kito, Yusuke / 鬼頭 勇輔, Kawashima, Keisuke / 川島 啓佑, Hanamatsu, Yuki / 花松 有紀, Takeuchi, Tamotsu / 竹内 保  
軟部明細胞肉腫、転移モデルマウス、NK 細胞活性と転移微小環境の検討 第 107 回日本病理学会総会 (札幌) 2018 年

(2) Saigo, Chiemi / 齊郷 智恵美, Kawashima, Keisuke / 川島 啓佑, Hanamatsu, Yuki / 花松 有紀, Okubo, Hiroshi / 大久保 寛, Kito, Yusuke / 鬼頭 勇輔, Takeuchi, Tamotsu / 竹内 保  
A mouse model of clear cell sarcoma metastasis. 第 106 回日本病理学会総会 (東京) 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www1.gifu-u.ac.jp/~patho2/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

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。