

機関番号： 32620

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20590375

研究課題名 (和文)

悪性骨軟部腫瘍における浸潤・転移能獲得および治療抵抗性の分子機構の解明

研究課題名 (英文)

Molecular mechanisms of invasion and metastasis in bone and soft-tissue sarcomas.

研究代表者

齋藤 剛 (SAITO TSUYOSHI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号： 80439736

研究成果の概要 (和文)：

悪性骨軟部腫瘍の1つであるdesmoplastic small round cell tumor(DSRCT)においては、腫瘍特異的に観察されるキメラ融合遺伝子であるEWS-WT1(KTS+)が新規分子治療標的となり得る可能性を示した。また、このEWS-WT1(KTS+)融合遺伝子産物は、病理組織学的な上皮分化を含むこの腫瘍の組織形態に強く関与している可能性が示された。若年成人に発生することが多く、良性腫瘍でありながら再発することの多いgiant cell tumor of bone(GCT)の悪性転化の分子病理学的指標に*p53*の遺伝子異常の検出が有用である可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

We identified EWS-WT1(KTS+) fusion gene as a novel therapeutic target in desmoplastic small round cell tumor. Furthermore, exogenous expression of EWS-WT1(KTS+) in HeLa cells resulted in the acquisition of epithelial characteristics as evidenced by E-cadherin and β -catenin expression. Identification of *p53* mutation in giant-cell tumor of bone might be a molecular pathological marker for malignant transformation of this tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 人体病理

キーワード： 悪性骨軟部腫瘍、転移・浸潤、分子治療標的

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨・軟部肉腫は主に小児あるいは比較的若年成人の四肢に発生する高悪性度の腫瘍である。近年のバイオサイエンスの進展に基づいた悪性腫瘍の基礎研究の急速な進展により、悪性腫瘍における腫瘍発生の分子機構も徐々に明らかになってきた。こうした基礎研究の成果によりこれまでには有効な治療法に乏しか

った悪性腫瘍に対しても新たな治療法が確立されつつある。しかしながら、骨軟部肉腫は癌腫に比べると比較的稀であることもあり、こうした基礎研究も十分に進んでおらず、未だに有効な治療法のないものも少なくなく、その開発と確立は社会的にも強く望まれているものである。

(2) 現在のところ、骨軟部悪性腫瘍の治療法

は、外科的切除に加え、術前・術後化学療法あるいは放射線療法を組み合わせた集学的治療が主体である。原発腫瘍の外科的な完全切除を目指して腫瘍サイズの縮小を図る術前化学療法には、一部を除き骨軟部肉腫は抵抗性を示すものが多い。原発腫瘍の外科的な完全切除が可能であるかどうかを左右するのは、悪性腫瘍細胞の微小環境を含めた周囲組織への浸潤の有無であり、これは腫瘍細胞の浸潤能に基づく部分が大きい。また、外科的手術による原発腫瘍の切除にも関わらず、その後の長期的な生命予後を左右するのは、悪性腫瘍細胞の遠隔転移能である。これら悪性腫瘍細胞の補助療法に対する抵抗性の獲得および浸潤・転移能獲得の分子機構を明らかにすることは、悪性骨軟部腫瘍患者の生命予後の更なる改善には必要不可欠な事項である。

(3) 本研究は、代表研究者らのこれまでの基礎および臨床研究によって得られた発癌、増殖、浸潤・転移、薬剤耐性化などに関する知見を駆使し、さらにプロテオーム解析などの新しい手法を取り入れることによって、主に「細胞の浸潤・転移」と「補助療法に対する抵抗性」という2つの重要な細胞現象に焦点を当てることにより、テーラーメイド治療を含む新たな分子標的治療法の確立を目指すものである。

2. 研究の目的

上記理由から、治療に難渋する腫瘍に対して、新たな分子治療標的となる可能性のある遺伝子あるいはタンパク質の探索あるいはテーラーメイド治療に結びつく基礎データの集積を目標とする。細胞株を用いた実験から得られたデータと悪性骨軟部腫瘍の臨床検体を用いて得られたデータをクロスリファレンスすることにより、悪性骨軟部肉腫における浸潤・転移を規定する因子ならびに化学療法等の補助療法に対する抵抗性を規定する因子を同定することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 特徴的なキメラ融合遺伝子を有する骨軟部肉腫の細胞株を用いて、そのキメラ融合遺伝子を標的とした tetracyclin によって誘導可能な RNAi system を構築する。

Tetracyclin の添加によるキメラ融合遺伝子の knockdown 前後において、細胞周期関連蛋白をコードする遺伝子、薬剤耐性関連遺伝子および浸潤・転移に関与する遺伝子等の発現量の変化を調べる。この際、必要に応じて cDNA microarray 解析およびプロテオーム解析を行う。また、HEK293 cells や HeLa cells などの遺伝子導入実験に適した細胞株を用いて、腫瘍特異的なキメラ融合遺伝子の発現誘導を tetracyclin の添加にて調節可能な安定細胞株を樹立し、同様に浸潤・転移関連遺

伝子等の発現の変化を調べる。

(2) 次に、細胞株を用いた in vitro 系の実験で得られた結果を、悪性骨軟部腫瘍の臨床検体を用いて検証する。また、骨軟部腫瘍を生物学的および臨床的な予後良好群・不良群に分類し、それらに関与するバイオマーカーを検出する。

4. 研究成果

(1) ①悪性骨軟部肉腫の培養細胞株を用いた研究では、悪性骨軟部腫瘍の1つである desmoplastic small round cell tumor (DSRCT) 細胞株および HeLa 細胞株を用いた。用いた DSRCT 細胞株は、腫瘍特異的なキメラ融合遺伝子である EWS-WT1 (KTS+) を有しており、このキメラ融合遺伝子が分子治療標的となり得るかどうかを検証する実験を行った。まず、HeLa 細胞株を用いて、このキメラ融合遺伝子の発現を tetracyclin 添加によって調節可能な安定細胞株を樹立した。Tetracyclin 添加により、このキメラ融合遺伝子を誘導すると細胞増殖能はあまり大きな変化がなられなかった。これはおそらく parental cell line である HeLa 細胞株自体が高い細胞増殖活性を有するためと思われた。しかしながら、EWS-WT1 (KTS+) 誘導 HeLa 細胞株と非誘導 HeLa 細胞株を serum-free 下において観察すると、EWS-WT1 (KTS+) 誘導細胞株は非誘導株に比べ耐性を示した。また、EWS-WT1 (KTS+) 誘導に伴い、 β -catenin を含む細胞間接着因子の発現が増強することも見出した。さらに、DSRCT の臨床検体を用いた免疫組織化学を行うと、E-cadherin, β -catenin 等の細胞接着蛋白の高発現が確認できた。

②DSRCT 細胞株を用いて、tetracyclin により誘導可能な RNAi system により EWS-WT1 (KTS+) を knockdown させると、細胞増殖能が低下することを見出した。

これらの結果から、キメラ融合遺伝子 EWS-WT1 (KTS+) は DSRCT における新たな分子治療標的となる可能性が示唆されるとともに、この腫瘍に特異的な組織形態との関連も強く示唆され、これを継続して調べている。

(2) また、若年～成年に発生する Giant cell tumor of bone (GCT) の悪性転化に関与あるいは悪性転化を推測することができるようなバイオマーカーの検出も行っている。GCT は良性腫瘍でありながら再発することが多いため臨床的に治療に難渋する腫瘍であり、稀に悪性転化することが知られている。また、病理組織学的に腫瘍細胞に明らかな異型性がみられないような場合にも肺に良性の転移性病変を形成するなど、その悪性転化を含む生物学的活性の病理学的指標が樹立されていない。今回研究代表者の在職する施設において悪性転化した GCT を数例経験したので、conventional

GCT, benign-metastasizing GCT, と比較検討しながら、分子病理学的な生物活性の指標を見つけ出そうと試みた。まず、各々の腫瘍から genomic DNA を抽出し、*p53* tumor suppressor の遺伝子異常の検索をしたところ、検索した Malignant GCT 症例 3 例全例に、アミノ酸置換を伴う遺伝子異常を認め、免疫組織学的な *p53* 蛋白の過剰発現と一致していた。一方、再発を繰り返す症例や肺転移を来すものの生命予後に影響を与えないような症例では、*p53* の遺伝子異常はみられなかった。以上より、*p53* の遺伝子異常の検出が悪性化の分子病理学的指標になる可能性が示唆された。

(3) 消化管に発生する間葉系悪性腫瘍である gastrointestinal stromal tumor (GIST) では proteome 解析により *Pfetin* 蛋白の発現が予後良好因子であることが示されている (Suehara et al. Clin Cancer Res, 2008)。しかしながら、その発現制御機構の詳細は不明であり、*Pfetin* の発現制御に関する研究も行った。現在までに、その発現低下と *Pfetin* のプロモーター領域のメチル化が相関するという結果を得ている。

(4) 滑膜肉腫における SYT-SSX1 variant の上皮分化誘導能に関する研究：滑膜肉腫に特異的にみられる SYT-SSX キメラ融合遺伝子の検出は、形態学的に確定診断の困難な滑膜肉腫症例の分子病理学的診断にも重要な役割を果たしている。SYT-SSX1 の SSX1 の部分に 13 amino acids の挿入を伴う SYT-SSX1 の variant を有する単相型滑膜肉腫を偶然経験したことから、このキメラ融合遺伝子の上皮分化誘導能の解析を行った。免疫組織化学では、この症例は Cytokeratin, EMA 等の上皮マーカーの発現が強く、通常型の SYT-SSX1 に比較し、上皮分化誘導能が高いことが推測された。通常型の SYT-SSX1 とともに SYT-SSX1 variant の発現ベクターを作成し、*E-cadherin*, *CK8*, *CK19* の promoter 配列を組み込んだ reporter vector を作成し、luciferase assay を行ったところ、この SYT-SSX1 variant は通常型の SYT-SSX1 に比べ、これら上皮関連遺伝子の promoter を強く活性化した。

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 7 件) 以下すべて査読あり

- 1) Yokotsuka M, Iwaya K, Saito T, Pandiella A, Tsuboi R, Kohno N, Matsubara O, Mujkai K. Overexpression of HER2 signaling to WAVE2-Arp2/3 complex activates MMP-independent migration in breast cancer. Breast

cancer Res Treat. 2011, 126:311-318.

- 2) Saito T, Mitomi H, Izumi H et al. A case of secondary malignant giant-cell tumor of bone with *p53* mutation after long-time follow-up. Human Pathol. 2011, 42:727-733.
- 3) Fujimaki M, Fukumura Y, Saito T et al. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland with CRTCl-MAML2 fusion transcript: Report of a case with review of literatures. Human Pathol, in press.
- 4) Mitomi H, Fukui N, Kishimoto I, Tanabe S, Kikuchi S, Saito T et al. Role of p16INK4a in progression of gastrointestinal stromal tumor of the stomach: alterations of members of p16INK4a network. Human Pathol, in press.
- 5) Matsuoka T, Mitomi H, Fukui N, Kanazawa H, Saito T et al. Cluster analysis of claudin-1, and -4, E-cadherin and β -catenin expression in colorectal cancers. J Surg Oncol, in press.
- 6) Matono H, Tamiya S, Yokoyama R, Saito T et al. Abnormalities of Wnt/ β -catenin signaling pathway induce tumor progression in desmoid tumors: correlation between β -catenin widespread nuclear expression and VEGF overexpression. Histopathology, in press.
- 7) Barretina J, Taylor BS, Saito T et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. Nat Genet 2010, 42:715-721.

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 野村将春、松林純、長尾俊孝、齋藤 剛、永井 毅、井上理恵、高橋礼典、泉 美貴、草間 博、向井 清。
Infarcted thymoma の 1 例。
第 97 回日本病理学会総会 2008 年 5 月 15 日 金沢
- 2) 齋藤 剛ら。
SYT-SSX1 variant の上皮分化誘導能について。
第 97 回日本病理学会総会 2008 年 5 月 15 日 金沢
- 3) 齋藤 剛ら。
SYT-SSX1 variant の上皮分化誘導能について。
第 41 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会 2008 年 7 月 17 日~7 月 18 日 浜松
- 4) 齋藤 剛ら。

Desmoplastic small round cell tumor における FGFR4 シグナルの治療標的としての可能性

第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28 日～10 月 30 日 名古屋

5) 稲垣敦史、長尾俊孝、桑原淳、片桐仁子、武田由美子、室井昭、齋藤剛ら。

乳房に発生した顆粒細胞腫の 1 例。

第 47 回日本臨床細胞学会秋期大会 2008 年 11 月 14 日～11 月 15 日 東京

6) 齋藤 剛。

A 演説「滑膜肉腫における上皮間葉および間葉上皮移行」- SYT-SSX 融合遺伝子と細胞間接着蛋白の関与-

第 54 回日本病理学会秋期特別総会 2008 年 11 月 20 日～11 月 21 日 松山

7) 齋藤 剛ら。

Desmoplastic small round cell tumor における FGFR4 高発現の意義と FGFR4 シグナルの治療標的としての可能性。

第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 3 日～5 月 5 日 大阪

8) 齋藤 剛ら。

デスマイド腫瘍における β -catenin 遺伝子異常のタイプと標的遺伝子の活性化能および細胞増殖能の比較検討。第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日～29 日 東京

9) 齋藤 剛ら

初発から 23 年、再発治療後 16 年経過した後、に悪性転化した骨巨細胞腫の 1 例。第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日～29 日 東京

10) 三富弘之、松岡隆、齋藤 剛ら。

胃間質細胞 (GIST) における p16INK4a(p16)/Retinoblastoma(Rb) 経路の破綻とその臨床病理学的意義。第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日～29 日 東京

11) 松岡隆、三富弘之、齋藤 剛ら

Claudin-1, Claudin-4, E-cadherin, β -catenin の発現低下は大腸癌における予後不良因子である。第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日～29 日 東京

〔その他〕

ホームページ等：

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/jintai_byori/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 剛 (SAITO TSUYOSHI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号： 80439736