

機関番号：84409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591771

研究課題名（和文） 骨・軟部腫瘍の転移に対する SSX を標的とした治療法の開発

研究課題名（英文） Development of target therapy for SSX of sarcoma metastasis

研究代表者

吉岡 潔子（YOSHIOKA KIYOKO）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター（研究所）・研究所・研究員

研究者番号：40342993

研究成果の概要（和文）：滑膜肉腫（Synovial sarcoma）に特異的な融合遺伝子 SS18-SSX を形成する SSX は正常組織では精巣のみに発現しており、骨軟部腫瘍で発現が高くステージの進んだ症例でより高い。これまでの研究結果から、SSX は悪性腫瘍の進展、転移に重要な役割をしていることが明らかとなり、分子標的治療の候補となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The SSX genes were initially identified as fusion partners to the SS18 gene in synovial sarcoma. Besides adult human testis, SSX genes were highly expressed in sarcoma, and positively correlated with clinical stage, especially the metastatic case present very high SSX expression. Our results suggested that SSXs would be novel proteins regulate cancer metastasis and potential molecular target(s) under clinical setting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：SSX、骨軟部腫瘍、浸潤、転移

1. 研究開始当初の背景

Nucleic Acid Sequence-Based Amplification 定量系を用いて骨軟部腫瘍検体の発現解析を行ったところ、SSX mRNA が高発現してい

たのは SS18-SSX が直接がん化に関与している synovial sarcoma を除けば、osteosarcoma, malignant fibrous histiocytoma (MFH) や malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) など比較的頻度の高い骨軟部腫瘍

であった。又、ステージの進んだ肺転移症例で **SSX** の高発現が認められることを認めた。これらのことより **SSX** が肺転移に関与すると考え研究を開始した。

2. 研究の目的

我々は、がんの浸潤・転移を制御する細胞内シグナルの解析とその結果から得られた候補分子に対する標的治療を目的とした臨床応用をめざしている。現在までにがん細胞の運動の調節には低分子量G蛋白質 Rho familyによるアクチン細胞骨格系の制御 (Rho-ROCKシグナリング、LIM kinase-cofilinシグナリング) と、分子モーターミオシンの活性化が重要であることを報告してきた。しかし、これらの制御機構はリンパ球が炎症巣へ向かって浸潤していくのと同様であり、またROCK阻害剤は骨軟部腫瘍の肺転移動物実験モデルでは無効であった。本研究では、**SSX** 遺伝子の骨軟部悪性腫瘍の進展、増悪における役割を明らかにし、最終的に**SSX**を分子標的とした骨軟部腫瘍肺転移治療の開発をめざした。

3. 研究の方法

- (1)内因性に **SSX** を高発現しているヒト線維芽肉腫細胞株 HT1080 および中程度に発現しているヒト骨肉腫細胞株 Saos-2 に **SSX** cDNA を導入、安定発現株を作製、生物学的機能を解析した。
- (2)逆に **SSX** 遺伝子を target にした siRNA をデザインし導入、phenotype の変化を検討した。
- (3)**SSX** に対する siRNA を内包した Liposome を担がんマウスに投与し、その抗腫瘍効果の検討をした。

4. 研究成果

- (1)ヒト骨肉腫細胞株 Saos-2、ヒト線維芽肉腫細胞株 HT1080 に **SSX** を過剰発現させた安定株を樹立し、浸潤能の増加 (親株の 3-5 倍)、軟寒天中の colony formation の亢進を認めた。
- (2)Saos-2 の **SSX** transfectants を nude mice に移植すると腫瘍を形成し、病理組織像では osteoid の形成が観察された (Mock では腫瘍形成を認めなかった)。
- (3)HT1080 の **SSX** transfectants は nude mice に移植すると親株 (1/10) に比べ高率 (8/10) に肺転移を認めた。
- (4)**SSX** を内因性に発現している Saos-2 および HT1080 に **SSX** 遺伝子を target とした siRNA を導入すると運動能、浸潤能の低下を観察した。
- (5)**SSX** に対する siRNA を担がんマウスに投与し、腫瘍の増殖抑制、肺転移の抑制の結果を得た。
- (6)HT1080 と **SSX** 導入過剰発現株、**SSX** siRNA 導入抑制発現株を用いてマイクロアレイにて標的遺伝子の検索を行い、MMP-1 を含む複数の候補を得ている。さらに、クロマチン免疫沈降法により、MMP-1 promoter 領域に **SSX** が結合している結果を得た。
- (7)**SSX** 結合蛋白質として HistoneH1, H2A, H2B, H3, H4 および Poly ADP-ribose polymerase を分離、同定した。
これらの結果から、**SSX** は細胞増殖に殆ど影響を与えず浸潤能を制御していること、又腫瘍に限局して発現していることから、**SSX** の発現を低下させることにより、腫瘍の増殖や転移を抑制できる可能性があり、骨軟部腫瘍の新規分子標的治療の候補と考えている。

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 8 件)

- ① Sonoshita, M., Aoki, M., Fuwa, H., Aoki K., Hosogi, H., Sakai, Y., Hashida, H., Takabayashi, A., Sasaki, M., Robine, S., Itoh, K., Yoshioka, K., Kakizaki, F., Kitamura, T., Oshima, M. and Taketo, M. M.: Suppression of Colon Cancer Metastasis by Aes through Inhibition of Notch Signaling: **Cancer Cell**: 査読有 19: 2011: 125-137
- ② 吉岡潔子、伊藤和幸、中紀文、荒木信人、竹中聡、骨・軟部腫瘍の転移に関する新規標的分子SSX、**整形・災害外科**、査読無、53 巻、No.12、2010、1344-1345
- ③ Yui, Y., Itoh, K., Yoshioka, K., Naka, N., Watanabe, M., Hiraumi, Y., Matsubara, H., Watanabe, K., Sano, K., Nakahata, T., and Adachi, S.: Mesenchymal mode of migration participates in pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma LM8.: **Clin Exp Metastasis**: 査読有 27: 2010: 619-630
- ④ Naka, N., Takenaka, S., Araki, N., Miwa, T., Hashimoto, N., Yoshioka, K., Joyama, S., Hamada, K., Tsukamoto, Y., Tomita, Y., Ueda, T., Yoshikawa, H., and Itoh, K.: Synovial Sarcoma Is a Stem Cell Malignancy.: **Stem Cells**: 査読有 28: 2010: 1119-1131
- ⑤ Takenaka, S., Naka, N., Araki, N., Hashimoto, N., Ueda, T., Yoshioka, K., Yoshikawa, H., and Itoh, K.: Downregulation of *SS18-SSX1* expression in synovial sarcoma by small interfering RNA enhances the focal adhesion pathway and inhibits anchorage-independent growth *in vitro* and tumor growth *in vivo*. **Int. J. Oncology**: 査読有 36(4): 2010: 823-831
- ⑥ 吉岡潔子、中紀文、竹中聡、伊藤和幸、SSX(synovial sarcoma X chromosome

breakpoint)遺伝子、**臨床整形外科**、査読無、45 巻、Vol.2、2010、168-171

- ⑦ Nakasaki, M., Yoshioka, K., Miyamoto, Y., Sasaki, T., Yoshikawa, H., and Itoh, K.: IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts.: **Bone**: 43: 査読有 2008: 869-879
- ⑧ Nishimura, Y., Yoshioka, K., Bereczky, B., and Itoh, K.: Evidence for efficient phosphorylation of EGFR and rapid endocytosis of phosphorylated EGFR via the early/late endocytic pathway in a gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell line.: **Molecular Cancer**: 査読有 7(42): 2008: 1-13

[学会発表] (計 14 件)

- ① 吉岡潔子、SSX の浸潤・転移における Rac1-myosin の経路と MMP-1 の関与、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府)
- ② 吉岡潔子、骨・軟部腫瘍の肺転移に関する分子標的 SSX、第 43 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2010 年 7 月 15 日、京王プラザホテル (東京都)
- ③ 吉岡潔子、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤・酪酸ナトリウムによるがん細胞浸潤の抑制、第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会、2010 年 6 月 16 日、金沢市文化ホール (石川県)
- ④ 吉岡潔子、骨・軟部腫瘍の肺転移に対する分子標的 SSX の機能解析、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 6 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑤ 吉岡潔子、SSX の浸潤・転移における PARP-1、Histone H1、MMP-1 の関与、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

- ⑥吉岡潔子、骨軟部腫瘍の肺転移に対する分子標的 SSX の機能解析、第 18 回日本がん転移学会 学術集会・総会、2009 年 7 月 24 日、旭川グランドホテル（北海道）
- ⑦吉岡潔子、骨・軟部腫瘍の肺転移に対する分子標的 SSX の機能解析、第 42 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2009 年 7 月 16 日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- ⑧ Itoh, Kazuyuki: SSX regulate cancer invasion via PARP-1, Histone H1 and MMP-1 signaling.: The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting: 2008 年 12 月 16 日 Moscone Center, San Francisco, U.S.A
- ⑨吉岡潔子、骨・軟部腫瘍の肺転移に関する分子 SSX の機能解析、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場（愛知県）
- ⑩吉岡潔子、骨・軟部腫瘍の肺転移に関する分子 SSX の機能解析、第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、2008 年 10 月 24 日、京都国際会議場（京都府）
- ⑪Naka, Norifumi: A novel highly metastatic synovial sarcoma cell line, Yamato-SS, is enriched cancer stem cells.: Joint Metastasis Research Society-AACR Conference on Metastasis: 2008年8月5日 The Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, Canada
- ⑫Itoh, Kazuyuki: SSX-New Molecular target Regulating Cancer Invasion and Metastasis.: Joint Metastasis Research Society-AACR Conference on Metastasis: 2008年8月4日 The Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, Canada
- ⑬吉岡潔子、骨・軟部腫瘍の肺転移に関する分子 SSX の機能解析、第 17 回日本がん転移学会総会、2008 年 7 月 24 日、鹿児島サンロイヤルホテル（鹿児島県）

- ⑭吉岡潔子、骨・軟部腫瘍の転移に対する新規分子標的 SSX の機能解析、第 4 1 回整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2008 年 7 月 18 日、アクトシティ浜松（静岡県）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/biology.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 潔子 (YOSHIOKA KIYOKO)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター（研究所）・研究所・研究員
研究者番号：40342993

(2) 研究分担者

伊藤 和幸 (ITO KAZUYUKI)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター（研究所）・研究所・部長
研究者番号：20301806

(3) 連携研究者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)
大阪大学・大学院医学系研究科器官制御外科学・教授
研究者番号：60191558