

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390372

研究課題名(和文)骨軟部腫瘍幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel target therapy for soft tissue sarcoma stem cells

研究代表者

伊藤 和幸 (Itoh, 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・部門長

研究者番号：20301806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：強い幹細胞性を有する骨軟部腫瘍の3次元増殖に、血管内皮増殖因子(VEGF)が重要な役割を演じている。滑膜肉腫では原因融合遺伝子を抑制すると、VEGFが3次元増殖より管腔構造を有した内皮細胞への分化を誘導する事から、滑膜肉腫は内皮細胞への分化可能な多機能幹細胞を起源とし、融合遺伝子により、VEGFが3次元増殖を制御している事が示唆された。VEGF signalが強く抑制されるとchemokineであるSDF-1alphaとreceptorであるCXCR4-axisが活性化される。CXCR4阻害薬をVEGF阻害薬と併用する事で極めて効率的に骨軟部腫瘍の増殖を抑制出来る事を見いだした。

研究成果の概要(英文)：VEGF-targeting anti-angiogenic therapy has been approved for soft-tissue sarcoma, including synovial sarcoma (SS); however, the mechanism underlying VEGF signal for sarcomagenesis in SS is unclear. Here, we show that SS fusion gene :SS18-SSX directs the VEGF signal outcome to cellular growth from differentiation. SS cells secrete large amounts of VEGF under spheroid culture conditions in autocrine fashion. SS18-SSX knockdown altered the VEGF signaling outcome, from proliferation to tubular differentiation, without affecting VEGF secretion, suggesting that VEGF signaling promoted cell growth in the presence of SS18-SSX. Thus, VEGF inhibitors blocked both host angiogenesis and spheroid growth. Simultaneous treatment with VEGF and CXCL12/CXCR4 inhibitors and/or ifosfamide effectively suppressed tumor growth both in vitro and in vivo. SS18-SSX directs the VEGF signal outcome from endothelial differentiation to spheroid growth, and VEGF and CXCR4 are critical therapeutic targets for SS.

研究分野：医歯薬学

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：骨軟部腫瘍 分子標的治療 転移 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究は、H20-21 年度萌芽研究“骨軟部悪性腫瘍からのがん幹細胞の分離・同定と、浸潤・転移における役割の解析”の継続研究であり、当センターで現在まで 10 症例の細胞株を樹立している。滑膜肉腫患者検体より新規に樹立した 2 例の骨軟部腫瘍細胞株 (Yamato, Aska と命名) は、共がん幹細胞の性質 (造腫瘍能、自己複製能、多分化能) を有した細胞株で、幹細胞関連遺伝子 (Oct3/4, Nanog, SOX2, KLF4) の高発現を呈しており、滑膜肉腫原因融合遺伝子 SS18-SSX の siRNA による knockdown にて、*in vitro*, *in vivo* の 3 次元増殖能の抑制、骨、軟骨のみならず、脂肪、マクロファージへの多分化能の出現をみた。

2. 研究の目的

本研究では、さらに研究を進展させ、幹細胞の浸潤、転移、悪性化に関する因子の同定を行うと共に、種々の阻害薬 (抗体や低分子化合物) を用いた *in vivo* の分子標的治療を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

既に承認されて開始している倫理委員会の protocol に従い、患者検体より種々の骨軟部腫瘍細胞株を樹立し、幹細胞としての性質を調べる。現在まで nude mice に移植可能な骨軟部腫瘍細胞株を 10 株樹立しており、さらに樹立をめざす。樹立した細胞株には幹細胞性を有するものが多く、幹細胞に特異的に発現する遺伝子 (Oct3/4, Nanog, SOX2, KLF4)、融合遺伝子 (滑膜肉腫の場合 SS18-SSX)、以前より悪性化 (浸潤・転移) に関与する標的分子として研究を行っている SSX の幹細胞性や分化等に与える影響に関して、siRNA-based の *in vitro*, *in vivo* の抑制実験を行い、検討する。得られた結果より、骨軟部腫瘍幹細胞の標的として、最適な分子の絞り込みを行い、低分子、抗体、siRNA-liposome (Wrapsome[®]) 等を用いた分子標的治療の開発を (製薬企業と共同で) 行う。研究体制-下記のグループで毎月 meeting を開いて discussion を行う。

研究代表者 伊藤和幸-細胞株の樹立、細胞生物実験、動物実験

分担研究者 吉岡潔子-細胞株の樹立、SSX の機能解析と臨床応用

連携研究者 吉川秀樹-全体のまとめ、臨床応用、大学院生数名の派遣

研究協力者 中紀文 (大阪大学整形外科講師) -細胞株の樹立、SS18-SSX の機能解析

濱田健一郎 (大阪大学整形外科特任助教) -臨床病理、IL-6 の機能解析

城山晋 (病院整形外科副部長) -細胞株の樹立

荒木信人 (病院整形外科部長) -臨床情報、細胞株の樹立

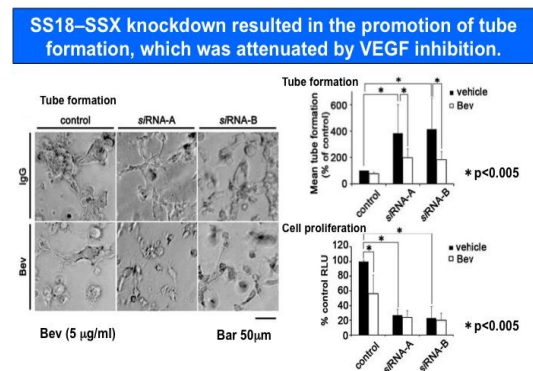
上田孝文 (大阪医療センター整形外科部長)

-臨床情報、細胞株の樹立

4. 研究成果

H23-25 年度の研究成果より、強い幹細胞性を有する骨軟部腫瘍株の 3 次元増殖に、血管内皮増殖因子 (VEGF) が非常に重要な役割を演じていることが明らかとなった。その生物学的な作用メカニズムとして、滑膜肉腫では原因融合遺伝子 (SS18-SSX) を knockdown すると、VEGF が 3 次元の増殖より管腔構造を有した血管内皮細胞への分化を誘導する事を明らかにした。この分化は、VEGF 阻害薬である Avastin (抗体) や Pazopanib (低分子化合物) で抑制できる事から、滑膜肉腫では内皮細胞への分化可能な多機能幹細胞をその起源とし、染色体転座に伴う融合遺伝子の発現により、VEGF の作用が血管新生より 3 次元増殖へ変向している事が示唆され、VEGF 阻害薬が極めて強い増殖抑制をする理由が判明した。動物実験を繰り返し行い、分子標的治療法への可能性を探る。(図 1)

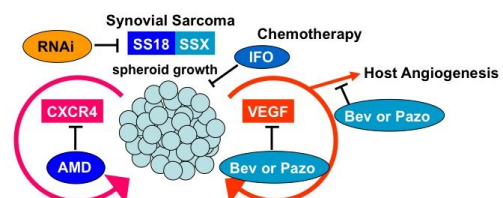
(図 1)



さらに VEGF signal が強く抑制された条件下では代償的に chemokine である SDF-1α とその receptor である CXCR4-axis が活性化される事を見だし、AMD3100 等の CXCR4 阻害薬を VEGF 阻害薬と併用する事で極めて効率的に骨軟部腫瘍の増殖を、*in vitro*, *in vivo* で抑制出来る事を見いだした。(図 2)

(図 2)

VEGF targeted therapy by combination with CXCR4 targeted therapy effectively inhibited tumor growth of SS.



又、骨軟部腫瘍の予後を規定する肺転移に関する種々因子を検討したところ、VEGFが内皮細胞の細胞間隙開裂をcontrolし、Trans Endothelial Migrationを制御している事を明らかにした。

これらの成果より骨軟部腫瘍の増殖、肺転移に関するdriver分子としてVEGF, CXCR4を明らかになったので、これらを制御する事で効果的な分子標的治療法の可能性を見いだした。研究成果は、国内外の学会で発表すると共に、論文発表を行った。下記参照。

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 9件)

(1) Yasui, H., Naka, N., Imura, Y., Outani, H., Kaneko, K., Hamada, K., Sasagawa, S., Araki, N., Ueda, T., Itoh, K., Myoui, A., and Yoshikawa, H., Tailored therapeutic strategies for synovial sarcoma: Receptor tyrosine kinase pathway analyses predict sensitivity to the mTOR inhibitor RAD001. *Cancer Lett.* 査読有 347(1), 2014, 114-122
DOI: 10.1016/j.canlet.2014.01.027

(2) Nishimura, Y., Takiguchi, S., Ito, S., and Itoh, K., Evidence that depletion of the sorting nexin 1 by siRNA promotes HGF-induced MET endocytosis and MET phosphorylation in a gefitinib-resistant Human lung cancer cell line, *International Journal of Oncology* 査読有 44, 2014, 412-426
DOI: 10.3892/ijo.2013.2194

(3) Tanaka, T., Yui, Y., Naka, N., Wakamatsu, T., Yoshioka, K., Araki, N., Yoshikawa, H., and Itoh, K., Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8-VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy, *Clinical & Experimental Metastasis* 査読有 30, 2013, 369-379
DOI: 10.1007/s10585-012-9543-8

(4) Nishimura, Y., Takiguchi, S., Yoshioka, K., Nakabeppu, Y., and Itoh, K., Silencing of SNX1 by siRNA stimulates the ligand-induced endocytosis of EGFR and increases EGFR phosphorylation in gefitinib-resistant human lung cancer cell lines. *Int. J. Oncology* 査読有 41, 2012, 1520-1530
DOI: 10.3892/ijo.2012.1578

(5) Nishimura, Y., Yoshioka, K., Takiguchi, S., and Itoh, K., Mechanisms of acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib in NSCLC cell lines: Evidence for a role of SNX1 in the regulation of EGF-dependent

phosphorylated EGFR endocytosis in a human lung cancer cells., *Recent Res. Dev. Cell Biol.* 査読有 4, 2012, 1-23

(6) 若松透、伊藤和幸、ベバシズマブ Bevacizumab-VEGF モノクローナル抗体、臨床整形外科、査読無、47、2012、240-243
<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=34523>

(7) Ichida, M., Yui, Y., Yoshioka, K., Tanaka, T., Wakamatsu, T., Yoshikawa, H., Itoh, K., Changes in cell migration of mesenchymal cells during osteogenic differentiation, *FEBS Letters* 査読有 585, 2011, 4018-4024
DOI:10.1016/j.febslet.2011.11.014

(8) Nishimura, Y., Bereczky, B., Yoshioka, K., Taniguchi, S., and Itoh, K., A novel role of Rho-kinase in the regulation of ligand-induced phosphorylated EGFR endocytosis via the early/late endocytic pathway in human fibrosarcoma cells, *Journal of Molecular Histology* 査読有 42 (5), 2011, 427-442
DOI:10.1007/s10735-011-9348-0

(9) Nishimura, Y., Yoshioka, K., Takiguchi, S., Bereczky, B., Nakabeppu, Y., and Itoh, K., A Role for SNX1 in the Regulation of EGF-Dependent Phosphorylated EGFR Endocytosis Via the Early/Late Endocytic Pathway in a Gefitinib-Sensitive Human Lung Cancer Cells, *Current Signal Transduction Therapy* 査読無 6(3), 2011, 383-395

[学会発表](計 34件)

(1) Wakamatsu, T., VEGF signal axis is a potential therapeutic molecular target for synovial sarcoma, The Connective Tissue Oncology Society 18th Annual Meeting, 2013年11月1日 Sheraton New York Times Square Hotel (New York, NY, USA)

(2) Sasagawa, S., Investigating the functional role and expression control of TWIST1 in sarcoma, The Connective Tissue Oncology Society 18th Annual Meeting, 2013年10月30日~11月2日 Sheraton New York Times Square Hotel (New York, NY, USA)

(3) 西村行生、SNX1は gefitinib 耐性肺癌細胞内において HGF 刺激によるリン酸化 c-MET エンドサイトーシスを抑制的に制御する、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月4日、パシフィコ横浜(神奈川県)

(4) 若松透、滑膜肉腫の3次元増殖における VEGF、CXCR4 シグナルの重要性および分子標的としての可能性、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、パシフィコ横浜(神奈川県)

(5) 笹川覚、Sarcomaの転移における Twist1 の発現制御と機能的役割の解析、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、パシ

- フィコ横浜 (神奈川県)
- (6) 若松透、滑膜肉腫における CXCL12/CXCR4 分子標的治療、第 46 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2013 年 7 月 11 日、東京ドームホテル (東京都)
- (7) 西村行生、SNX1 は gefitinib 耐性肺癌細胞内において HGF/c-MET endocytosis を抑制的に制御する、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、2013 年 7 月 11 日、ホテルブエナビスタ (長野県)
- (8) 笹川覚、骨軟部腫瘍における Twist1 の発現と機能解析、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、2013 年 7 月 11 日、ホテルブエナビスタ (長野県)
- (9) 伊藤和幸、転移の病態とがんの不均一性、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、2013 年 7 月 11 日、ホテルブエナビスタ (長野県)
- (10) Itoh, K., Sodium butyrate induced cellular senescence and inhibited invasion of cancer cells with distinct mechanism, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013, 2013 年 4 月 9 日 Walter E. Washington Convention Center (Washington, DC, USA)
- (11) 若松透、Mechanism of VEGF-targeted therapy on Synovial sarcoma、第 37 回近畿肉腫研究会、2013 年 2 月 2 日、ブリーゼプラザ 8F (大阪府)
- (12) Itoh, K., Sodium butyrate induced cellular senescence and inhibited invasion of cancer cells with distinct mechanism, The 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2012 年 12 月 17 日 Moscone Center (San Francisco, CA, USA)
- (13) Wakamatsu, T., Anti Tumor Effect of VEGF Targeted Therapy on Synovial Sarcoma, The 17th Connective Tissue Oncology Society, 2012 年 11 月 16 日 Hilton Prague (Prague, Czech Republic)
- (14) 西村行生、SNX1-siRNA 導入 gefitinib 耐性肺癌細胞内における EGFR リン酸化および downregulation の解析、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、ロイトン札幌 (北海道)
- (15) 吉岡潔子、酪酸ナトリウムによるがん細胞浸潤の抑制、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、ロイトン札幌 (北海道)
- (16) 若松透、滑膜肉腫に対する血管新生阻害薬による分子標的治療、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌 (北海道)
- (17) Wakamatsu, T., Anti-tumor effect of VEGF-targeted therapy on Synovial sarcoma, 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, 2012 年 9 月 4 日 Brisbane Convention & Exhibition Centre (Brisbane, Australia)
- (18) Yoshioka, K., Sodium butyrate inhibited invasion of cancer cells, 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, 2012 年 9 月 3 日 Brisbane Convention & Exhibition Centre (Brisbane, Australia)
- (19) 若松透、滑膜肉腫に対する VEGF 分子標的治療、第 45 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2012 年 7 月 14 日、東京国際フォーラム (東京都)
- (20) 西村行生、SNX1-siRNA 導入 gefitinib 耐性肺癌細胞内における EGFR リン酸化および downregulation の検討、第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会、2012 年 7 月 12 日、オリエンタルホテル広島 (広島県)
- (21) 伊藤和幸、どうして骨肉腫は肺転移をするのか?、第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会、2012 年 7 月 12 日、オリエンタルホテル広島 (広島県)
- (22) 西村行生、Rho-kinase シグナル系による活性型 EGFR のエンドサイトーシス制御機構、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
- (23) 吉岡潔子、酪酸ナトリウムによるがん細胞浸潤の抑制、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
- (24) Wakamatsu, T., Anti-tumor effect of Bevacizumab for Synovial sarcoma and Ewing sarcoma, SICOT 2011 25th Triennial World Congress, 2011 年 9 月 6 日~9 日 Prague Congress Centre (Prague, Czech Republic)
- (25) Tanaka, T., Sequential Detection of Circulating Tumor Cells(CTCs) in Mouse Osteosarcoma Dunn and its Highly Metastatic subline LM8, SICOT 2011 25th Triennial World Congress, 2011 年 9 月 7 日 Prague Congress Centre (Prague, Czech Republic)
- (26) Yoshioka, K., Sodium butyrate induced cellular senescence and inhibited invasion of sarcoma, SICOT 2011 25th Triennial World Congress, 2011 年 9 月 6 日~9 日 Prague Congress Centre (Prague, Czech Republic)
- (27) Itoh, K., SSXs Regulate Sarcoma Invasion via Rac1-Myosin Pathway and MMP-1, SICOT 2011 25th Triennial World Congress, 2011 年 9 月 6 日 Prague Congress Centre (Prague, Czech Republic)
- (28) 若松透、滑膜肉腫と Ewing 肉腫に対する bevacizumab の抗腫瘍効果、第 44 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2011 年 7 月 14 日、国立京都国際会館 (京都府)
- (29) 田中太晶、マウス骨肉腫細胞株 Dunn と高肺転移株 LM8 における血中循環腫瘍細胞 (CTCs) の動的・経時的解析、第 44 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2011 年 7 月 15 日、国立京都国際会館 (京都府)
- (30) 吉岡潔子、酪酸ナトリウムの悪性軟部

腫瘍に対するセネッセンスの誘導と浸潤抑制作用、第 44 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2011 年 7 月 14 日～15 日、国立京都国際会館（京都府）

(31) 西村行生、RhoA/Rho-kinase シグナル系による活性型 EGFR のエンドサイトーシス制御機構、第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会、2011 年 6 月 30 日、アクトシティ浜松（静岡県）

(32) 田中太晶、マウス骨肉腫細胞株 Dunn と高肺転移株 LM8 における血中循環腫瘍細胞 (CTCs) の動的・経時的解析、第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会、2011 年 6 月 30 日、アクトシティ浜松（静岡県）

(33) 吉岡潔子、酪酸ナトリウムの悪性腫瘍に対するセネッセンスの誘導と浸潤抑制作用、第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会、2011 年 6 月 30 日、アクトシティ浜松（静岡県）

(34) 伊藤和幸、全身多発性転移を認めた滑膜肉腫症例の原発巣滑膜肉腫原因細胞の解析、第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会、2011 年 6 月 30 日、アクトシティ浜松（静岡県）

〔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

大阪府立成人病センター 研究所 生物学部門

<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/category/biology.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 和幸 (Itoh, 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・部門長

研究者番号：20301806

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

吉川 秀樹 (Yoshikawa, Hideki)

大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60191558