

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791575

研究課題名(和文) 腫瘍細胞の幹細胞性と転移能の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Investigation of collective molecular mechanisms in stemness and metastasis in sarcoma

研究代表者

笹川 覚 (Sasagawa, Satoru)

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)・その他部局等・研究員

研究者番号：80345115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部腫瘍細胞の幹細胞性と転移能の相関に着目してマウス骨肉腫、ヒト滑膜肉腫の細胞株を用いて分子スクリーニングを行った結果、この2つの性状を調節する分子としてTwist1を同定した。siRNAによりTwist1を恒常的に発現抑制したマウス骨肉腫細胞をマウスに移植した結果、有意に肺転移が減少した。また、Twist1の発現を抑制する薬剤としてHDAC阻害剤を同定し、LM8を移植したマウスへの継続的なSAHA投与でも有意に肺転移を抑制した。更にヒト滑膜肉腫細胞におけるTwist1の強制発現はNK細胞の認識分子の発現を抑制した。すなわちTwist1は複数の作用を動員して転移を調節していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on correlation between multipotency and metastatic activity in mouse osteosarcoma and human synovial sarcoma, we performed qPCR based molecular screening and identified Twist1 as a key molecule. In normal tissue, Twist1 commits cellular stemness, regulates differentiation into bone and cartilage, regulates cell migration, and responds to hypoxia condition. Indeed, Twist1 knockdown by siRNA in mouse osteosarcoma cell line significantly suppressed lung metastasis. Drug screening identified HDAC inhibitors which can suppress Twist1 expression mouse osteosarcoma cells and daily administration to mouse with osteosarcoma xenograft significantly inhibited lung metastasis. In addition, we found that Twist1 suppressed MICA/B expression in human synovial sarcoma cells. MICA/B are recognized by NK cells, resulting in elimination of tumor cells in the body. In conclusion, it is thought that Twist1 drives lung metastasis via regulating multiple cellular functions in sarcomas.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：骨軟部腫瘍 転移

1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍は全腫瘍発症例数の 1%以下と症例数は少ないものの、若年齢層に限れば全発症例数の十数%を占めている。また、骨軟部腫瘍は肺を始めとする遠隔臓器へ転移を起こしやすく、これにより予後の悪い患者が多い。骨軟部腫瘍は放射線耐性、薬剤耐性が高いものが多く、現在の骨軟部腫瘍の第一治療選択は外科手術となっている。そのため、骨軟部腫瘍治療における効果的な化学療法剤、特に転移を抑制できる薬剤が殆ど無いことから、新規の分子標的薬の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

骨軟部腫瘍(肉腫)は転移をし易い、幹細胞性が高いなどの特徴がある。しかしながら、他の上皮系腫瘍と比較して細胞の性状が大きく異なり、また骨軟部腫瘍は亜種も含めると 100 種類近くに分類されるため、それぞれの骨軟部腫瘍に特化した治療や研究が進められてきた。本研究では骨軟部腫瘍に広く共通する悪性化の分子メカニズムや細胞特性を同定し、これらの情報から治療のための分子標的となりうる分子を探索し、転移抑制に有効な薬剤の探索を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス骨肉腫細胞株(親株 Dunn および高肺転移株 LM8)とヒト滑膜肉腫細胞株(低転位患者由来 Aska-SS および高転移患者由来 Yamato-SS)を材料に、qRT-PCR ベースの遺伝子発現プロファイリングを行い、腫瘍の悪性化を規定する転移と幹細胞性の双方に重要な分子の探索を行った。

(2) 見出された分子及び周辺分子についてタンパク質レベルでの発現確認、解析を生化学的手法で行った。

(3) 薬剤スクリーニングは培養細胞に対して文献で用いられていた最高濃度から希釈系列を準備し、様々な濃度で細胞を処理した後、生化学的手法により発現解析を行った。

(4) 標的遺伝子の発現抑制もしくは強制発現はプラスミドベクター及びレンチウイルスベクターを用いた siRNA もしくは cDNA により行った。

(5) 動物実験では、腫瘍細胞をマウス背部皮下に移植した後、HDAC 阻害剤の腹腔内投与を行った。

すべての遺伝子操作実験および動物実験はガイドラインに沿って施設内の各種委員会の審査を受け、許可を受けた上で実施した。

4. 研究成果

(1) マウス骨肉腫細胞(Dunn vs LM8)、ヒト滑膜肉腫細胞(Aska-SS vs Yamato-SS)を材料として qRT-PCR ベースの遺伝子発現の比較プロファイリングを行った結果、転移能に正の相関を示す遺伝子の一つとして Twist1 を見出した。さらにウエスタンブロッティング

によりタンパク質発現を見たところ、高い肺転移能を示す LM8、Yamato-SS にのみ強いシグナルを検出した。すなわち、Twist1 はタンパク質レベルではほぼ All-or-None の発現様出会った。Twist1 は正常な個体発生において神経堤細胞が遊走する際に発現、活性化する分子として報告されており、また上皮系腫瘍の転移においては Invadopodia の形成に重要な役割を持つことが報告されている。また、Twist1 は ES 細胞及び様々な臓器の幹細胞において幹細胞性維持に必須の因子としても知られている。本研究で用いている LM8 は骨への Yamato-SS は中胚葉系系譜(骨、軟骨、血管、脂肪、マクロファージ等)への高い分化能を保持している。さらに、Twist1 は正常組織において間葉系幹細胞が骨、軟骨、腱、脂肪などへの分化にも重要な働きを持つことが知られている。すなわち、骨軟部腫瘍の悪性化と正常組織内での間葉系幹細胞分化は Twist1 が共通して作用している。このような背景から本研究では骨軟部腫瘍の悪性度を規定する因子として Twist1 に着目した。

(2) Twist1 を強く発現している LM8、Yamato-SS に対して Twist1 の発現を抑制する薬剤、生理活性物質のスクリーニングを行った。その結果、BMPs が共通して Twist1 の発現を抑制し、mTOR 阻害剤(Rapamycin)と HDAC 阻害剤(NaBu、SAHA)が LM8 の Twist1 にのみ有効に作用した。この結果から、Twist1 は骨軟部腫瘍の悪性化に広く共通した因子であると推測されるが、その発現制御メカニズムは腫瘍種によって異なることが強く示唆された。

(3) マウス骨肉腫細胞 LM8 は C3H マウスの背部に移植すると移植部に腫瘍を形成するとともに血行性に肺転移を起こす。siRNA を用いて LM8 の Twist1 の発現を低下させた細胞を作成し C3H マウスに移植したところ、有意に肺転移が減少した。また LM8 を移植した C3H マウスに SAHA を連日腹腔内投与したところ有意に肺転移が減少した。このことから、Twist1 は分子標的として有用であり、Twist1 の発言を抑制する薬剤は骨軟部腫瘍に対して有効な治療薬となり得ると推測された。

(4) Twist1 の未知の分子機能を探索した結果、ヒト滑膜肉腫細胞において Twist1 が細胞表面分子 MICA/B の発現を調節している可能性を見出した。生体内で発生した腫瘍細胞は免疫系によって除去される。特に NK 細胞は腫瘍細胞クリアランスに主要な働きをする。腫瘍細胞と正常細胞の分別に、腫瘍化した細胞表面に現れる ULBPs や MICA/B を検出している。Aska-SS と Yamato-SS で、Twist1 と MICA/B がタンパク質でトグル様の発現パターンを示していたことから Twist1 が MICA/B の発現制御に関わっているのではないかと考え、MICA/B を強く発現している Aska-SS に Twist1 を強制発現させた。その結

果、MICA/B の発現が抑制された。このことから Twist1 が MICA/B の発現を負の方向に制御していると考えられた。すなわち、Twist1 は MICA/B 等 NK 細胞に認識される分子の発現を抑制し、血流内や肺での NK 細胞による監視システムを回避するための作用を持っていると推測された。

総括として、Twist1 は骨軟部腫瘍（肉腫）に共通する悪性化因子として機能している可能性が高い。その発現メカニズムはエピジェネティックな制御や液性因子による調節を受けていることが強く示唆されたことから、Twist1 を抑制するためにこれらの周辺因子が骨軟部腫瘍の転移抑制に対する分子標的になりうると推測される。今後は、免疫監視システム回避に対する Twist1 の機能や転移抑制のための効果的な薬剤の探索に更に注力していきたい。

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 6 件)

(1) Takeda S, Sasagawa S, Oyama T, Searleman AC, Westergard TD, Cheng EH, Hsieh JJ. “Taspase1-dependent TFIIA cleavage coordinates head morphogenesis by limiting Cdkn2a locus transcription.”

J Clin Invest. 125(3):1203-1214, 2015.

doi:10.1172/JCI77075.

査読有り

(2) Wakamatsu T, Naka N, Sasagawa S, Tanaka T, Takenaka S, Araki N, Ueda T, Nishizawa Y, Yoshikawa H, Itoh K.

“ Deflection of vascular endothelial growth factor action by SS18-SSX and composite vascular endothelial growth factor- and chemokine (C-X-C motif) receptor 4-targeted therapy in synovial sarcoma. ”

Cancer Sci. 105(9):1124-1134, 2014.

doi: 10.1111/cas.12469.

査読有り

(3) Yasui H, Naka N, Imura Y, Outani H, Kaneko K, Hamada K, Sasagawa S, Araki N, Ueda T, Itoh K, Myoui A, Yoshikawa H.

“ Tailored therapeutic strategies for synovial sarcoma: receptor tyrosine kinase pathway analyses predict sensitivity to the mTOR inhibitor RAD001. ”

Cancer Lett. 347(1):114-122, 2014.

doi:10.1016/j.canlet.2014.01.027.

査読有り

(4) 笹川覚、小山敏尚、James Hsieh

『Taspase1 による TFIIA の切断は精子形成に必須の翻訳後修飾である』

細胞工学 Vol.33(4), p306-308, 2014

<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901528.html>

査読なし

(5) Oyama T, Sasagawa S, Takeda S, Hess RA, Lieberman PM, Cheng EH, Hsieh JJ.

“Cleavage of TFIIA by Taspase1 activates TRF2-specified mammalian male germ cell programs.”

Developmental Cell. 27(2):188-200, 2013.

doi: 10.1016/j.devcel.2013.09.025.

査読有り

(6) Takeda S, Liu H, Sasagawa S, Dong Y, Trainor PA, Cheng EH, Hsieh JJ.

HGF-MET signals via the MLL-ETS2 complex in hepatocellular carcinoma.

J Clin Invest. 123(7):3154-3165, 2013.

doi: 10.1172/JCI65566.

査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 笹川覚、伊藤和幸

『骨軟部肉腫の転移ドライバの同定と発現制御及び分子標的としての可能性の検討』

第 73 回日本癌学会学術総会

2014 年 9 月 25-27 日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(2) 笹川覚、伊藤和幸

『骨・軟部腫瘍の転移 Driver の同定と転移抑制のための分子標的探索』

第 47 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会

2014 年 7 月 17-18 日

大阪国際会議場（大阪府大阪市）

(3) 笹川覚、伊藤和幸

『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

2014 年 10 月 3-5 日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(4) 若松透、中紀文、笹川覚、田中太晶、竹中聡、荒木信人、上田考文、吉岡潔子、西澤恭子、吉川秀樹、伊藤和幸

『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

2014 年 10 月 3-5 日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(5) 笹川覚、伊藤和幸

『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 11-12 日

ホテルブエナビスタ（長野県松本市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/department/seibutsu/>

6．研究組織

(1)研究代表者

笹川 覚 (SASAGAWA, Satoru)
大阪府立成人病センター研究所
生物学部門 研究員
研究者番号：80345115

(2)連携研究者

伊藤和幸 (ITO, Kazuyuki)
大阪府立成人病センター研究所
生物学部門 部長
研究者番号：20301806

(3)研究協力者

吉川秀樹 (YOSHIKAWA, Hideki)
中紀文 (NAKA, Norifumi)
荒木信人 (ARAKI, Nobuhito)
濱田健一郎 (HAMADA, Kenichiro)
城山晋 (JOYAMA, Shin)
若松透 (WAKAMATSU, Toru)
田中太晶 (TANAKA, Takaaki)