

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月8日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460443

研究課題名(和文)新規シグナル経路GLI1-CXCR4による肉腫悪性形質制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Roles of the newly identified GLI1-CXCR4 signaling in synovial sarcoma cells.

研究代表者

稲熊 真悟 (Inaguma, Shingo)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：80410786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高悪性度軟部肉腫のひとつである滑膜肉腫の発生・進展におけるヘッジホッグ系転写因子GLI1の重要性を、滑膜肉腫培養細胞株を用いたin vitroの実験系、およびマウス肺転移モデルを用いて解析し、GLI1が新規標的遺伝子CXCR4を介して、滑膜肉腫細胞の増殖や、浸潤遊走能、肺転移巣の形成を亢進させることを実験的に証明した。
また、ヒト正常間葉系細胞を用いてGLI1、SYT-SSX1融合遺伝子の標的遺伝子群を同定し、これらの滑膜肉腫診断における病理組織学的診断マーカーとしての有用性を検討したが、有用な遺伝子の同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to uncover the importance of Hedgehog-related transcription factor GLI1 in synovial sarcoma, one of the highly malignant soft tissue tumors. We found that GLI1 accelerates cellular proliferation, migration, and invasion through newly identified transcriptional target gene CXCR4. In mouse lung metastasis model, GLI1 enhanced lung metastasis of synovial sarcoma cells.
We also tried to identify diagnostic marker for synovial sarcoma, based on the information of potential transcriptional target genes identified from cDNA microarray analyses performed using GLI1 or SYT-SSX1 fusion gene transfected normal mesenchymal cells. However, no specific immunohistochemical marker was found.

研究分野：病理学

キーワード：GLI1 CXCR4 滑膜肉腫

1. 研究開始当初の背景

骨軟部に発生する肉腫は、その浸潤性の強い増殖形態や、解剖学的な観点から治療切除が困難な場合も多く、局所再発や肺をはじめとする他臓器への浸潤、転移性病変の形成、加えて高い薬剤耐性能などがその予後を不良としている。

近年、ヘッジホッグ(Hh)-GLI 経路等の個体発生に重要なシグナル経路が、上皮性悪性腫瘍の発生、進展に寄与していることが多数報告されているが、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫等の骨軟部腫瘍においても Hh 系転写因子 GLI が活性化していることが報告されており、腫瘍発生メカニズムの解明、および治療標的としての重要性の観点から注目されている。

2. 研究の目的

骨軟部肉腫の発生には、EWS/FLI1(ユーイング肉腫)や PAX3/FKHR(胞巣状横紋筋肉腫)といった特異的融合遺伝子の形成に起因するものと、上皮性腫瘍のように Hh-GLI シグナルの活性化を含む複数の遺伝子異常が関与する場合(胎児型横紋筋肉腫、未分化肉腫)が知られているが、多くの組織型に共通して骨軟部腫瘍の悪性形質(転移・浸潤能、薬剤耐性能)を制御するシグナル経路として CXCL12-CXCR4 シグナルが挙げられる。

申請者は、腓骨がんにおける Hh 系転写因子 GLI1 の重要性を、その転写標的遺伝子の同定、機能解析を通して行ってきたが、その過程で GLI1 が CXCR4 の発現制御を介して、腓骨細胞の悪性形質を制御している可能性を見出した。

本研究計画では、新規シグナル経路である GLI1-CXCR4 経路が滑膜肉腫をはじめとする肉腫細胞の浸潤・遊走能、薬剤耐性能を制御している可能性について、そのメカニズムを解明し、将来的な分子標的治療への応用を視野に入れ、骨軟部腫瘍における悪性形質制御の分子基礎を確立することを目指すものである。

また、正常間葉系幹細胞に、SYT-SSX1 をはじめとする融合遺伝子を導入することで誘導される遺伝子群を同定し、病理組織診断における免疫組織学的マーカーの同定も試みる。

3. 研究の方法

本研究計画では、GLI1 による CXCR4 転写調節機構の解明と、GLI1-CXCR4 シグナルによる肉腫細胞の悪性形質制御の可能性に関して、将来の治療応用に結びつく分子基盤を明らかにすることを目的として、以下の研究を計画した。

(1) レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法を用いた GLI1 による CXCR4 転写調節機構の解析

(2) GLI1 安定遺伝子発現株を用いた、

GLI1-CXCR4 シグナルによる肉腫細胞の悪性形質制御メカニズムの解明

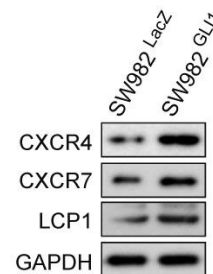
(3) cDNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析 - GLI1、および SYT-SSX1 融合遺伝子標的遺伝子の同定 -

(4) 軟部紡錘形肉腫腫瘍組織アレイを用いた GLI1、SYT-SSX1 融合遺伝子標的遺伝子群の発現と滑膜肉腫病理組織診断マーカーとしての重要性の解析

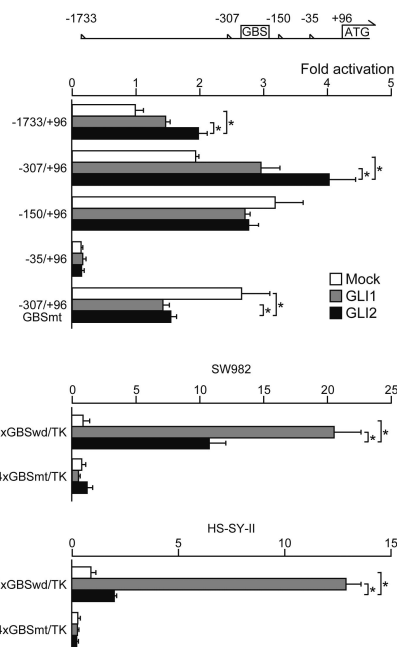
4. 研究成果

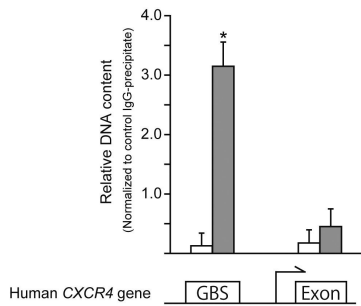
(1) GLI1 による CXCR4 転写調節機構の解析

滑膜肉腫細胞株 SW982 にレンチウイルスを用いて、GLI1 および LacZ を導入し、これらの遺伝子を安定発現する SW982 細胞を樹立した。これらの遺伝子安定発現細胞株を用いて、qRT-PCR 解析および Western blotting を行い、GLI1 が CXCL12-CXCR4 シグナルの構成因子である CXCR4、CXCR7、LCP1 の発現を誘導することを明らかにした。



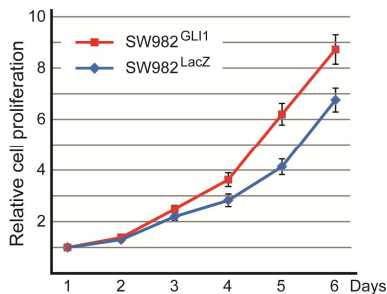
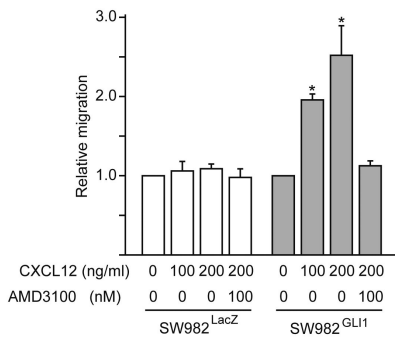
次いで、CXCR4 のプロモーター配列を pGL4 レポーターベクターに導入し、レポーターアッセイを行い、CXCR4 プロモーター領域内の GLI1 結合配列(GBS)を明らかにした。次いで、クロマチン免疫沈降法を用いて GLI1 が CXCR4 プロモーター配列内の GBS に直接結合していることを証明し、GLI1 による CXCR4 転写調節機構を明らかにした。



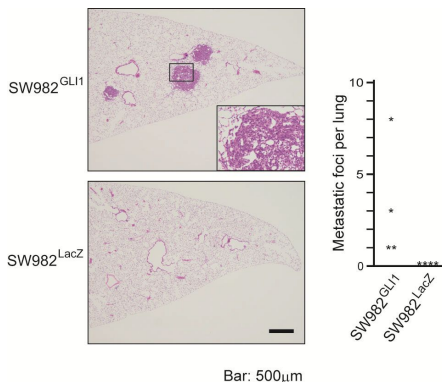


(2) GLI1 安定遺伝子発現株を用いた、GLI1-CXCR4 シグナルによる滑膜肉腫細胞の悪性形質制御メカニズムの解明

Boyden chamber 法を用いて、GLI1 及び LacZ 導入 SW982 滑膜肉腫細胞株の浸潤遊走能を比較検討したところ、GLI1 が SW982 の浸潤・遊走能を亢進させることを明らかにした。一方で、GLI1 は SW982 細胞株の細胞分裂能も亢進させることを見出した。



また、これらの細胞株を、免疫不全マウス尾静脈より注射し、肺転移能を比較したところ、GLI1 導入株で転移巣の形成が有意に亢進しており、GLI1 が生体内においても、滑膜肉腫細胞株の悪性形質を亢進させることを明らかにした



(3) cDNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析 - GLI1、および SYT-SSX1 融合遺伝子標的遺伝子の同定 -

ヒト正常間葉系幹細胞に、GLI1 および、滑膜肉腫細胞にて観察される SYT-SSX1 融合遺伝子を導入し、cDNA マイクロアレイを用いて、発現遺伝子の変化を網羅的に解析し、転写標的遺伝子群を同定した。この遺伝子情報をもとに、National Institutes of Health (NIH), National Cancer Institute (NCI)との共同研究として、滑膜肉腫を含む紡錘形細胞肉腫の組織アレイを用いた免疫組織学的解析を行い、滑膜肉腫の診断に有用な組織学的診断マーカーの同定を試みた。しかしながら、同腫瘍に特異的な発現を示すタンパク質の同定には至らなかった。

今後も引き続き、GLI1-CXCR4 シグナル経路の治療標的としての可能性や、滑膜肉腫の病理組織学的診断マーカーの解析・同定を継続していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲熊 真悟 (INAGUMA, Shingo)

愛知医科大学・医学部・病理学講座・講師

研究者番号：80410786

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()