

令和元年6月17日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07131

研究課題名(和文) 胞巣状軟部肉腫をモデルとした血行性転移機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of hematogenous metastasis mechanism using a mouse model for alveolar soft tissue sarcoma

研究代表者

田中 美和 (Tanaka, Miwa)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 発がん研究部・研究員

研究者番号：70345883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胞巣状軟部肉腫(ASPS)は高転移性の若年者の肉腫である。本研究ではASPSの転移と、原因遺伝子ASPL-TFE3の転写機構の解明を目標とした。マウスの解析から、転移の際には、腫瘍細胞は血管細胞に被われた胞巣構造のまま血中を移動していて、これが宿主免疫からの回避法であると考えられた。この現象はヒトASPSでも観察された。また腫瘍細胞が血管内に侵入する際には、ASPL-TFE3の標的であるGPNMBの発現が不可欠であることも見出した。さらにASPL融合蛋白の造腫瘍能には、MIT/TFEファミリーのTFE3とTFEBで共通し、MITFやTFECには存在しない機能領域が関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少がんである胞巣状軟部肉腫は、初診時にしばしば転移が指摘される若年者の肉腫である。マウスモデルの解析によって、転移の際には、肉腫細胞が血管でできた小さなカプセルに包まれた状態で血管内を移動していることが分かった。これは、宿主免疫からの回避法である可能性が考えられた。また、肉腫細胞が血管内に侵入する際には、原因遺伝子ASPL-TFE3(AT3)の標的であるGPNMBの発現が不可欠であることも見出した。さらに、肉腫の発症に必須なAT3の機能領域を絞り込むことができた。今後は、GPNMBが治療標的になり得るかどうかの検証と、AT3の発がん機能を制御するエピゲノム環境の解析を行う。

研究成果の概要(英文)：Alveolar soft part sarcoma (ASPS) occurs mostly in young adults with frequent hematogenous metastasis even at the initial diagnosis. Our ASPS model showed prominent angiogenesis and vascular involvement, resulting in frequent lung metastasis. The lining of hemangiopericytes were characteristic in ASPS vasculature and on the surface of tumor emboli, suggesting that the protection by hemangiopericytes is important for the survival of ASPS's circulating-tumor-cell. In addition, we identified Gpnmb that plays an important role in intravasation of ASPS tumor cells as a direct target of the ASPL-TFE3 fusion transcription factor. Enhanced localization of GPNMB at the front of tumor invasion and intravasation in both mouse and human ASPS were observed. To examine the oncogenic activity of ASPL fusion genes, artificial chimeric genes were generated consisting of the 5' ASPL and 3' MIT/TFE sequences. The ASPL-TFE3 and ASPL-TFEB but not ASPL-TFEC and ASPL-MITF induced sarcoma.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ASPL-TFE3 融合遺伝子 胞巣状軟部肉腫 骨軟部腫瘍 転移 血管新生 MIT/TFEファミリー マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 胞巣状軟部肉腫(Alveolar soft part sarcoma: ASPS)は、発症の原因となる融合遺伝子 ASPL-TFE3 を有する AYA 世代のがんである。組織像は豊富な血管網を示し、この血管網に腫瘍細胞の侵入がしばしば観察されることから、高頻度に血行性転移を生じる。化学療法に対する感受性が低く、有効な治療法の確立が急務となっているが、特に予後を左右する転移を抑制するには、腫瘍血管の形成を阻止することが重要である。

(2) 融合蛋白 ASPL-TFE3 を構成する C 末端側の TFE3 は、MIT/TFE ファミリーに属する bHLH-LZ 型転写因子である。ASPL-TFE3 の機能を明らかにすることは、ASPS の発生機序や転移の理解と治療法の開発に貢献するものと期待される。また、MIT/TFE ファミリー蛋白は相互の相同性が高く、TFEB と MITF も腎細胞癌や悪性黒色腫の原因遺伝子となっている。それ故 TFE3 との機能モチーフの実験的比較は、有益な知見をもたらすことが期待できる。

2. 研究の目的

がんの転移は生命予後に影響を及ぼす重要なファクターである。転移は多くの過程を経て成立するが、その全体像を解明するには良い動物モデルを用いた研究が不可欠である。一般に、原発巣における血管形成の豊富ながんは、転移頻度が高い。胞巣状軟部肉腫(ASPS) は、原発巣における成熟した血管形成を誘導し高頻度に血行性転移を示す。このような成熟した血管構築と高頻度の転移は、腎臓癌や内分泌系腫瘍でも認められ、脆弱な腫瘍血管を形成する腫瘍とは異なる転移様式を示すと考えられる。本研究では ASPS のモデルマウスを用いて、腫瘍と血管の相互作用と原因遺伝子 ASPL-TFE3 の機能解析を行い、がんの血行性転移に関わる分子基盤を理解する。

3. 研究の方法

(1) ASPS の血管新生と転移機構の解明：

樹立した ASPS モデルマウスは、豊富で成熟した血管新生を伴う腫瘍細胞の胞巣状パターンと、遠隔肺転移が再現されている。がんの血管新生における血管周皮細胞の役割については理解が不十分であるため、本モデルを用いて腫瘍細胞による血管周皮の誘導を介した血管構築機序を明らかにする。プロテオミクス解析と遺伝子発現解析により、ASPS 細胞による血管構築と、ASPS 細胞の血管内侵襲、肺転移の動態を *in vitro* や *in vivo* イメージングを用いて評価することで、血行性転移機構の全体像を理解する。

(2) 融合遺伝子 ASPL-TFE3 の機能解析：

ASPL-TFE3 の欠失変異体や MIT/TFE ファミリーの置換変異体を用いて、ASPL-TFE3 の機能ドメインと転写共役因子の同定を目指す。さらに、この共役因子が ASPL-TFE3 の標的遺伝子の発現制御機構にどのような役割を果たしているのかを明らかにする。ASPL-TFE3 による標的遺伝子の発現制御機構を明らかにすることで、ASPS の発症と悪性化の分子基盤を解明する。

4. 研究成果

(1) *Ex vivo* システムを応用して ASPS モデルマウスを樹立した。ASPS モデルマウスはヒト ASPS と同様に、原発巣における血管内皮(CD31+, CD34+)と血管周皮(SMA+, PDGFR+)に裏打ちされる成熟した血管構築が観察された。さらに、ヒト ASPS の特徴である胞巣状構造や血管網形成と、肺への高頻度の転移も忠実に再現していた。転移の際には、腫瘍細胞は血管周皮細胞に被われた胞巣状構造のまま血管内を移動していて、このことが宿主免疫からの回避法である可能性が考えられた。この現象はヒト ASPS でも観察された。また腫瘍細胞が血管内に侵入する際、融合遺伝子 ASPL-TFE3 の標的である GPNMB の発現が不可欠であることも見出した。遺伝子発現解析からは、オートファジーやライソソーム経路の遺伝子群の顕著な発現亢進が認められ、腫瘍細胞内に多量のライソソームの集積が観察された。

(2) ASPS は、豊富で成熟した血管新生を伴う腫瘍細胞の胞巣状パターンと血行性肺転移が特徴である。腫瘍細胞による血管周皮細胞の遊走や接着を介した血管構築機序を明らかにするため、ASPS 細胞が分泌する血管周皮細胞の遊走因子の探索を行った。ASPS 細胞の培養上清に対する血

管周皮細胞の遊走を指標としたプロテオーム解析により、血管細胞遊走因子の候補を4つに絞った。

(3) ASPL-TFE3 を構成する TFE3 は、MIT/TFE ファミリー (TFE3, TFEB, TFEC, MITF) に属する bHLH 型転写因子である。ファミリー分子の変異や過剰発現は、ASPS や腎細胞がん、悪性黒色腫の引き金となる。ASPS では、全症例で ASPL-TFE3 融合遺伝子が認められ、これがドミナントドライバーとして機能すると考えられている。そこで、ASPS 発症における ASPL-TFE3 の特異性を調べるため、ASPL-TFE3 の TFE3 部分を他のファミリー分子に置換した変異体を用いて *in vivo* 造腫瘍性試験を行った。その結果、ASPL 融合蛋白の造腫瘍能には、MIT/TFE ファミリーの TFE3 と TFEB で共通し、MITF や TFEC には存在しない機能領域が関わっていることが示唆された。さらに ASPL-TFE3 の機能領域を絞り込むために、9 つの欠失変異体を用いて *in vivo* 造腫瘍試験を行ったところ、2 箇所の欠失変異体で腫瘍形成が消失したことから、この領域が oncogenic ドメインとして機能していることが示唆された。現在、この機能領域に結合する転写共役因子を探索中である。

(4) HeLa 細胞に ASPL-TFE3 を強発現させても ASPS 様の腫瘍を形成しなかったことや、ASPS 細胞から ASPL-TFE3 の発現を抑制すると造腫瘍能を完全に失うことが分かった。この結果から、ASPL-TFE3 は ASPS 細胞特異的にエンハンサーリプログラミングを行っていることが示唆された。これらの背景から、ASPS は、ASPL-TFE3 とその機能が十分に発揮できる発生母地細胞のエンハンサー制御により発症すると考えられる。今後の展望として、ASPL-TFE3 とエピゲノムランドスケープの相関をゲノムワイドに解析することにより、ASPL-TFE3 の転写制御機構の全貌に迫りたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Shimizu R, Tanaka M, Tsutsumi S, Abratani H, Yamazaki Y, Homme M, Kitagawa Y Nakamura T. EWS-FLI1 regulates a transcriptional program in cooperation with Foxq1 in mouse Ewing sarcoma. *Cancer Sci*, 査読有り, 109(9).2907-2918, 2018. (DOI: 10.1111/cas.13710)

Tanaka M, Yoshimoto T, Nakamura T. A double-edged sword: The world according to Capicua in cancer. *Cancer Sci*, 査読有り, 108(12), 2319-2325, 2017, Review. (DOI: 10.1111/cas.13413)

Yoshimoto T*, Tanaka M*, Homme M, Yamazaki Y, Takazawa Y, Antonescu C. R and Nakamura T. CIC-DUX4 induces small round cell sarcomas distinct from Ewing sarcoma. *Cancer Res*, 査読有り, 77(11), 2927-2937, 2017. (*equally contributed) (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3351)

Tanaka M, Homme M, Yamazaki Y, Shimizu R, Takazawa Y, Nakamura T. Modeling alveolar soft part sarcoma unveils novel mechanisms of metastasis. *Cancer Res*, 査読有り, 77(4) 897-907, 2017. (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2486)

〔学会発表〕(計20件)

国内学会

田中美和、「胞巣状軟部肉腫の発症におけるエンハンサーリプログラミングの重要性」、第2回 日本サルコーム治療研究学会学術集会、2019年2月

田中美和、「Down syndrome model to explore the mechanisms of tumorigenesis and malignant progression」、第41回 日本分子生物学会年会、2018年11月

田中美和、「Molecular dissection of ASPSCR1-TFE3, the fusion gene associated with alveolar soft part sarcoma」、第77回 日本癌学会学術総会、2018年9月

田中美和、「肉腫の発症と転移における融合遺伝子 ASPL-TFE3 の役割」、第27回 日本がん転移学会学術集会・総会、2018年7月

田中美和、「骨軟部肉腫の発症と転移に関わるエピゲノム改変機構」、第 107 回 日本病理学会総会、2018 年 6 月

田中美和、「胞巣状軟部肉腫の原因融合遺伝子 ASPL-TFE3 の転写制御機構」、第 1 回 日本サルコーマ治療研究会学術集会、2018 年 2 月

田中美和、「胞巣状軟部肉腫の原因融合遺伝子 ASPL-TFE3 の機能解析」、先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、2018 年 1 月

田中美和、「融合遺伝子陽性の骨軟部腫瘍モデルマウスの樹立と発がん機構の解明」、第 63 回 日本病理学会 秋期特別総会、2017 年 11 月

田中美和、「Molecular dissection of ASPSCR1-TFE3」、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月

田中美和、「滑膜肉腫における腫瘍微小環境に対するマイクロ RNA の役割」、第 50 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2017 年 7 月

田中美和、「miR-214 cooperates with SS18-SSX1 in malignant progression of Synovial sarcoma」、第 106 回 日本病理学会総会、2017 年 4 月

田中美和、「miR-214 は腫瘍性マクロファージ(TAM)の産生を介して滑膜肉腫を悪性化する」、先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、2017 年 2 月

田中美和、「軟部肉腫におけるペリサイトを介した血管新生・転移機構」、第 39 回 日本分子生物学会学術総会、2016 年 12 月

田中美和、「ユーイング肉腫とユーイング類縁肉腫の動物モデル開発-難治性がんの治療法開発に向けた評価系-」、第 19 回 癌と骨病変研究会、2016 年 11 月

田中美和、「The molecular mechanism of hematogenous metastasis in alveolar soft part sarcoma.」、第 75 回 日本癌学会学術総会、2016 年 10 月

田中美和、「胞巣状軟部肉腫をモデルとした血行性転移の分子機構」、第 25 回 日本がん転移学会学術集会・総会、2016 年 7 月

田中美和、「骨軟部肉腫におけるマイクロ RNA 発現の特徴」第 105 回 日本病理学会総会、2016 年 5 月

国際学会

Miwa Tanaka、「Epigenetic landscape of alveolar soft part sarcoma」、11th AACR-JCA Joint Conference、2019 年 2 月

Miwa Tanaka、「Fusion genes in sarcoma and mouse models」、Anti-Cancer Treatment Japan、2018 年 5 月

Miwa Tanaka、「The molecular function of ASPSCR1-TFE3 in alveolar soft part sarcoma」、AACR Special Conference on advances in Sarcomas: From Basic Science to Clinical Translation、2017 年 5 月

〔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

<http://www.ifcr.or.jp/laboratory/department/carcinogenesis/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。