

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659272

研究課題名（和文） 遺伝子発現誘導可能なヒト iPS 細胞を用いた肉腫起源細胞の同定

研究課題名（英文） Identification of cell-of-origin of sarcomas using human iPS cells containing inducible expression vectors

研究代表者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40273502

研究成果の概要（和文）：

滑膜肉腫の細胞起源を、iPS 細胞を用いて同定することを目的とし、特異的融合遺伝子である SYT-SSX 遺伝子を、発現誘導型ベクターとトランスポゾンシステムを用いてヒト iPS 細胞に導入した。樹立された iPS 細胞は、非誘導状態では未分化状態が維持されていたが、SYT-SSX 遺伝子の発現誘導により、幹細胞マーカーの発現は低下し、同時に各分化系譜特異的な遺伝子の発現が誘導され、SYT-SSX 蛋白の機能が分化制御に係わることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The object of this project is to identify the cell-of-origin of sarcomas using human iPS cells. Using drug-inducible expression vector and transposon-supported gene introduction system, we successfully established genetically modified iPS cells. Without drug-treatment these cells retained undifferentiated state. When the SYT-SSX gene was induced, however, the expression level of stem cell markers were down-regulated and at the same time those of lineage-specific genes were up-regulated, suggesting the involvement of SYT-SSX protein in the process of differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	330,000	3,130,000

研究分野：骨軟部腫瘍学、幹細胞生物学

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：骨軟部肉腫、人工多能性幹細胞、遺伝子発現誘導、融合遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

肉腫は血液系を除く非上皮組織から発生する悪性腫瘍と定義される。病理学的診断は極めて多岐に及ぶが、分子遺伝学的には、特徴的な遺伝子変異を有するものと、有さないものに二分される。前者に存在する変異の代

表的なものが、染色体相互転座による融合遺伝子である。特異性が高く、RT-PCR 法により容易に検出されることから診断上の意義が高く、補助診断法としての意義が確立されつつある。しかし一方で融合蛋白の発癌過程における意義の全容は明らかにされておらず、

なぜ特定の融合遺伝子が特定の病理像をもつ腫瘍に存在するのか、そして融合遺伝子が形成されたのち、どのような過程を経て完全な形質転換細胞にいたるのかという重要な点は未解明である。

これらの課題に対する直接的なアプローチは、前駆細胞へ融合遺伝子を導入することであるが、多くの肉腫で前駆細胞は不明である。近年、各組織における幹細胞が癌の標的であるとの仮説のもとで、多くの研究が進められており、肉腫の場合は間葉系幹細胞がそれに相当する。既に代表的な融合遺伝子であるユーイング肉腫関連 EWS-Flt1 融合遺伝子に関しては、間葉系幹細胞へ導入することで、ヒトのユーイング肉腫に形態及び遺伝子発現プロファイルが類似した細胞が得られたとの報告があり、類似の研究が他の融合遺伝子を用いても行われている。しかしながら間葉系幹細胞の定義はいまだ定まっておらず、分化段階の異なる様々な幹細胞や前駆細胞を含む不均一な細胞集団であり、研究結果が一定していない。また異なる系譜の幹細胞が標的である可能性も否定できない。すなわち、この課題に取り組むためには、あらゆる細胞に分化できる多能性幹細胞を用いる必要がある。

一方、iPS 細胞は転写因子の導入による体細胞のリプログラミングにより、多分化能が賦与された細胞であり、本課題の遂行には至適な材料であるが、導入効率の高いレトロウイルス発現ベクター系は多能性幹細胞特有の機構によりサイレンシングを受けるため使用できず、未分化幹細胞の段階で発現を誘導すると、アポトーシスに陥ってしまう可能性があり、実験系の構築が困難であった。

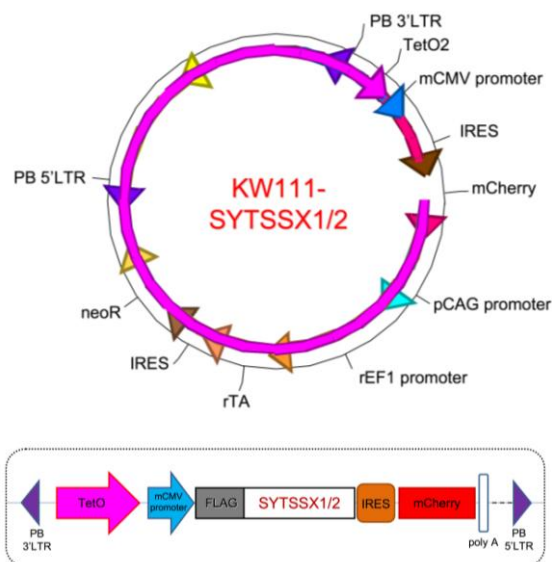
## 2. 研究の目的

本研究では、薬剤により遺伝子発現が誘導できる発現ベクターを用いることで上記の問題点を克服し、未分化状態での下流遺伝子の探索、そして特定の方向に分化させた後の下流遺伝子を探索し、腫瘍のプロファイルと対比し、類似性を検討し、各腫瘍における前駆細胞の系譜、分化段階を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究の対象として、滑膜肉腫における腫瘍特異的融合遺伝子である SYT-SSX 遺伝子を選択した。安定発現細胞を得るためのゲノムインテグレーションの効率を上げるために、発

現ベクターはトランスポゼースを応用した PiggyBac トランスポゾンシステムを用いた。まず Tet-ON システムと SYT-SSX 遺伝子を組み込んだ PiggyBac ベクターを作成し、トランスポゼース発現ベクターと同時にリポフェクションにより未分化状態のヒト iPS 細胞に導入した。ヒト iPS 細胞はレトロウイルスあるいはプラスミドベクターにより 4 因子を導入することで樹立した細胞を用いた。その中から薬剤の濃度依存性に融合遺伝子の発現が誘導されるクローンを選択した。次に選択したクローンを用いて、未分化状態で融合遺伝子を発現させ、誘導前後の遺伝子発現プロファイルから下流遺伝子群を同定した。次に我々が起源細胞であると考えている神経堤細胞に誘導分化させた後に、SYT-SSX 遺伝子の発現を誘導、発現プロファイリングから下流遺伝子群を同定、未分化状態での下流遺伝子と比較検討することで、細胞の背景が融合遺伝子の機能にどのような影響を与えるのかを解析した。



## 4. 研究成果

いずれの iPS 細胞からも、ドキシサイクリンの濃度依存性に SYT-SSX 遺伝子の発現が誘導できるクローンが樹立できた。樹立された iPS 細胞は、非誘導状態では、形態及び増殖能に変化はなく、遺伝子発現レベルでの解析でも幹細胞マーカーの発現など未分化状態が維持されていた。しかし、ドキシサイクリン添加により、SYT-SSX 遺伝子の発現を誘導すると、未分化状態の維持が困難となり、幹細胞マーカーの発現は低下し、同時に各分化系譜特異的な遺伝子の発現が誘導され、細胞は増殖を停止、アポトーシス様の形態変化を示した。一方、神経堤細胞へ誘導したのちに発現を誘導した場合は、形態学的な変化はな

く、増殖も維持されていた。現在、遺伝子発現レベルを比較検討中である。以上の結果は、作成した iPS 細胞が SYT-SSX 融合遺伝子の機能を解析するための有力なツールとなることを示している。現在、滑膜肉腫患者由来 iPS 細胞を樹立中であり、多分化能を確認出来次第、同様な遺伝子導入 iPS 細胞を作成する予定である。

#### 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 6 件)

- 1) Mitsui H, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Maruyama T, Kanaji T, Fujimura S, Sugihara H, Nishiura A, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. Prostaglandin E2 receptor type 2 receptor-selective agonist prevents the degeneration of articular cartilage in rabbit knees with traumatic instability, *Arthritis Res Ther* 2011; 13(5): R146. (査読有) <http://arthritis-research.com/content/13/5/R146>
- 2) Nishigaki T, Teramura Y, Nasu A, Takada K, Toguchida J, Iwata H. Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution, *Int J Dev Biol*, 2011; 55(3): 305-11. (査読有) <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=103145tn>
- 3) Furu M, Kajita Y, Nagayama S, Ishibe T, Shima Y, Nishijo K, Uejima D, Takahashi R, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Nakashima Y, Ikegawa M, Imoto S, Katagiri T, Nakamura Y, Toguchida J. Identification of AFAP1L1 as a prognostic marker for spindle cell sarcomas, *Oncogene* 2011; 30(38): 4015-25. (査読有) DOI: 10.1038/onc.2011.108.
- 4) Uejima D, Nishijo K, Kajita Y, Ishibe T, Aoyama T, Kageyama, Iwaki H, Nakamura T, Iida, Yoshiki T, Toguchida J. Involvement of cancer biomarker C7orf24 in the growth of human osteosarcoma, *Anticancer Res* 2011; 31(4): 1297-305. (査読有) <http://ar.iiarjournals.org/content/31/4/1297.abstract?sid=010f53b0-9eb4-4f97-9316-4b6362d91b81>
- 5) Nakayama R, Mitani S, Nakagawa T, Hasegawa T, Kawai A, Morioka H, Yabe H, Toyama Y, Ogose A, Nakayama, T, Toguchida, J, Yoshida T, Ichikawa H. Gene Expression Profiling of Synovial Sarcoma: Distinct Signature of Poorly Differentiated Type, *Am J Surg Pathol* 2010; 34(11): 1599-607. (査読有) [http://journals.lww.com/ajsp/Abstract/2010/11000/Gene\\_Expression\\_Profiling\\_of\\_Synovial\\_Sarcoma\\_.5.aspx](http://journals.lww.com/ajsp/Abstract/2010/11000/Gene_Expression_Profiling_of_Synovial_Sarcoma_.5.aspx)

- 6) Aoyama T, Okamoto T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Ito K, Jin Y, Ueda M, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Histone modifiers, YY1 and p300, regulate the expression of cartilage-specific gene, chondromodulin-I, in mesenchymal stem cells, *J Biol Chem* 2010; 285(39): 29842-50. (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M110.116319

[学会発表] (計 16 件)

- 1) Tamaki S, Kato T, Toguchida J, et al. Epigenetic regulation of FZD10 by SYT-SSX fusion oncogene during the lineage commitment. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011. 12. 16 横浜)
- 2) 玉置さくら, 加藤友久, 戸口田淳也, 他. SYT-SSX のエピゲノム発現制御機構への関与. 第 70 回日本癌学会総会 (2011. 10. 3 名古屋)
- 3) 那須輝, 布留守敏, 吹上謙一, 中山富貴, 中村孝志, 古瀬幹夫, 戸口田淳也. 神経鞘由来腫瘍におけるクロードイン 19 の発現様式. 第 70 回日本癌学会総会 (2011. 10. 4 名古屋)
- 4) Toguchida J. Tissue stem cell and sarcoma stem cell. Annual Congress of the Korean Bone and Joint Tumor Society (2011.4.15 Suwon)
- 5) 玉置さくら, 加藤友久, 戸口田淳也, 他. SYT-SSX のエピゲノム発現制御機構への関与. 第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011. 7. 14 京都)
- 6) 那須輝, 戸口田淳也, 他. 神経鞘由来腫瘍におけるクロードイン 19 の発現様式. 第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011. 7. 14 京都)
- 7) 岡本健, 中山富貴, 仲俣岳晴, 坪山直生, 戸口田淳也, 渡邊健一郎, 中村孝志. Etoposide を使用した高悪性度骨肉腫に対する化学療法の成績. 第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011. 7. 14 京都)
- 8) Tamaki S, Kato T, Toguchida J, et al. Genetic and epigenetic regulation of synovial sarcoma-associated molecule, FZD10. 第 33 回日本分子生物学会年会(2010.12.9 神戸)
- 9) Tamaki S, Kato T, Toguchida J, et al. Genetic and epigenetic regulation of synovial sarcoma-associated molecule, FZD10. 16th CTOS (2010.11.13 Paris)
- 10) 長山聡, 戸口田淳也, 他. 大腸癌進展における AFAP1L1 遺伝子の関与. 第 69 回日本癌学会総会 (2010.9.24 大阪)
- 11) 戸口田淳也. 癌化と再生の接点としての組織幹細胞. 第 69 回日本癌学会総会 (2010.9.22 大阪)

- 12) 笠原崇、戸口田淳也、他. 網羅的発癌解析からの骨肉腫造腫瘍能の探索. 第43回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2010.7.15 東京)
- 13) 佐藤信吾、加藤友久、戸口田淳也、他. iPS細胞を用いた肉腫発生機構解析システムの構築. 第43回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2010.7.15 東京)
- 14) Toguchida J. Cell-of-origin of sarcomas: insights from tissue stem cells. 第5回 International Symposium of Institute Network (2010.6.24 金沢)
- 15) Toguchida J., Kato,T., et al. In vivo tumor forming-signature of human osteosarcoma cells revealed by genome-wide expression profiling. 8th ISSCR (2010.6.17 San Francisco)
- 16) 戸口田淳也、加藤友久、他. 肉腫幹細胞と癌幹細胞. 第51回日本臨床細胞学会総会(2010.5.31 横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：40273502  
佐藤 信吾 (SATO SHINGO)  
京都大学・再生医科学研究所・研究員  
研究者番号：40462220  
(H21 転出)

### (2) 研究分担者

加藤 友久 (KATO TOMOHISA)  
京都大学・再生医科学研究所・講師  
研究者番号：50301247

### (3) 連携研究者

なし