

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390353

研究課題名(和文)エクソーム解析からの軟骨形成性腫瘍の病態解明

研究課題名(英文) Investigation for the pathomechanism of cartilage-forming tumors by whole exome sequencing

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨形成性腫瘍疾患の病態解明に向けて、全身性の多発性病変を有するMaffucci症候群患者に着目し、両親を含めたエクソーム解析を行った。その結果、病態関連遺伝子の候補として機能未知の遺伝子(Z遺伝子と仮称)を同定した。これまでの他の軟骨形成性腫瘍を用いた解析ではZ遺伝子の変異は検出されていない。機能解析のために患者由来iPS細胞を作製し、軟骨分化能を検討したところ、変異Z遺伝子を有するiPS細胞は明らかに異常な軟骨分化像を呈し、Z遺伝子の軟骨形成性腫瘍への関与を示唆する結果が得られた。更なる機能解析のために現在、結合蛋白を同定中である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the pathomechanism of cartilage-forming tumors, we have focused on one patient with Maffucci syndrome, in whom multiple enchondromas and hemangiomas developed in almost entire body. Exome analyses of patient's and her parents' blood cells identified a mutation in a function-unknown gene (Gene Z). No mutations of Gene Z have been found in other cartilage-forming tumors so far. To investigate the significance of mutant Z protein, we have established iPS cells from the patient and induced chondrogenic differentiation. The results clearly indicated that cells with mutant Z have abnormal chondrogenic property, suggesting the involvement of mutant Z in cartilage-forming tumor. For further investigation, we are now trying to identify the binding protein.

研究分野：整形外科学、分子腫瘍学、幹細胞生物学

キーワード：軟骨形成腫瘍 Maffucci症候群 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

内軟骨腫及び軟骨肉腫はともに軟骨組織を形成する腫瘍であり、それぞれ良性及び悪性腫瘍に分類されているが組織学的な連続性が指摘されている。しかしながらこれまで両者のゲノム変異の共通性に関しては明らかではなかった。一方、内軟骨腫の多発を特徴とする Ollier 病、更に多発性血管腫を合併する Maffucci 症候群は、その臨床病態より、体細胞性モザイクであると想定されており、遺伝性因子は同定されていなかった。本課題申請の発端となった Maffucci 症候群患者は、全身性に内軟骨腫及び血管腫が発生しており、経配偶子性変異の存在を強く示唆する病態を呈した患者であった。

2. 研究の目的

軟骨形成性腫瘍疾患の病態解明に向けて、多発性病態(Ollier 病及び Maffucci 症候群)罹患者の体細胞のエクソーム解析を行い、病態関連候補遺伝子を同定する。そして孤発性腫瘍における変異解析を行うことで、軟骨形成性腫瘍の発生への関与を明らかにする。次に軟骨肉腫細胞株を用いた遺伝子発現抑制実験や間葉系幹細胞を用いた遺伝子導入実験、更に変異遺伝子を導入した遺伝子改変マウスの解析等により、その病態関連遺伝子の機能を解明し、治療法の開発につながる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 病態関連候補遺伝子の同定

広範な病変を有する Maffucci 症候群本人及び両親よりインフォームドコンセントを取得後、体細胞を採取し、次世代シーケンサーを用いて全エクソンの配列を解析(以下、エクソーム解析)する。そして両親のゲノムに存在せず、罹患者のゲノムにのみ存在する配列を同定する。

(2) 病態関連候補遺伝子としての検討

同定された病態関連候補遺伝子の変異を、他の Ollier 病及び Maffucci 症候群患者の体細胞及び腫瘍組織、孤発性の軟骨形成性腫瘍、及び軟骨形成性腫瘍以外の骨軟部腫瘍のサンプルに用いて解析する。

siRNA 等を用いた発現阻害実験、及び発現ベクターを用いた強制発現実験により、候補遺伝子の生物学的作用を解析する。同時に抑制前後で網羅的遺伝子発現解析を行い、関連する遺伝子群を同定する。これらの結果を統合し、その関連するシグナル系を同定する。

タグ付き遺伝子の強制発現系を用いて、免疫沈降法及び LC MS/MS を用いて結合蛋白を同定する。

病態関連候補遺伝子の変異が同定された体細胞を用いて iPS 細胞を作製し、三次元培養法により軟骨細胞を分化誘導、その行程及び作製された軟骨様組織内の細胞を、正常 iPS 細胞を用いたものと比較し、相違点を探索する。また作製した変異陽性 iPS 細胞における変異部位を正常配列に置換した rescued iPS 細胞を作製、表現型も rescue されたかを検討し、病態関連候補遺伝子の変異が表現型に関与していることを実証する。

マウス ES 細胞の病態関連候補遺伝子のマウスホモログ遺伝子に、ヒトで検出されものと同等の変異を、相同組み換えにより導入し、変異陽性 ES 細胞を作製し、通常の方法によりキメラマウスを作製する。

4. 研究成果

(1) 病態関連候補遺伝子の同定

Maffucci 症候群の候補遺伝子の一つをエクソーム解析より同定した。同定した遺伝子は機能未知の遺伝子(Z 遺伝子と仮称)であるが、DNA 結合部位を有しており、転写制御に作用する可能性を示唆する蛋白であった。同定された部位を含めて、他の軟骨腫瘍における Z 遺伝子の塩基配列を解析したが、これまでのところ明確に変異と考えられるものは検出されていない。

(2) 病態関連候補遺伝子としての検討

機能解析のための手がかりとして、結合蛋白の同定を目指して、タグを付けた正常及び変異 Z 遺伝子を HeLa 細胞に導入した強制発現系を作製した。現在、免疫沈降及び LC MS/MS を用いて結合蛋白を同定中である。

Z 遺伝子の変異を有する Maffucci 患者の体細胞より、iPS 細胞を作製した。作製した iPS 細胞を、我々が開発した軟骨細胞への分化誘導法を用いて、軟骨細胞へと分化誘導し、標準的 iPS 細胞を用いた結果と比較検討したところ、遺伝子発現及び基質形成能の点から軟骨分化能が亢進していることが判明した。この機能の相違が、原因遺伝子によるものであることを明確にするために、siRNA 等を用いた発現阻害実験を行っている。更に他の遺伝情報の影響を除外するために、変異陽性 iPS 細胞における変異部位を正常配列に置換した rescued iPS 細胞をゲノム編集技術を用いて作製中である。

本課題が開始された後に Maffucci 症候群の原因遺伝子の一つとして単離された IDH 遺伝子と Z 遺伝子との関係を解析するために、誘導型発現ベクターに変異型 IDH 遺伝子を組み込み、これを標準的 iPS 細胞に導入した。現在、この iPS 細胞を用いて三次元培養法に

より軟骨細胞を分化誘導、その行程及び作製された軟骨様組織内の細胞を解析し、変異 IDH 遺伝子の作用及び Z 遺伝子の発現に対する影響を解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(1):302-14. 査読有 DOI: 10.1002/art.38912.
- 2) Totoki Y, Yoshida A, Hosoda F, Nakamura H, Hama N, Ogura K, Yoshida A, Fujiwara T, Arai Y, Toguchida J, Tsuda H, Miyano S, Kawai A, Shibata T. Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma. *Genome Res.* 2014; 24(9):1411-20. 査読有 DOI: 10.1101/gr.160598.113.
- 3) Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamel W, Ueki A, Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y, Nagai T, Toguchida J, Toyama Y, Muto A and Saya H. IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. *Cancer Res.* 2014;74(22):6531-41. 査読有 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0914.
- 4) Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. *PLOS ONE*, 2014;9(12):e112291. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0112291.

- 5) Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida J, Shimizu K, Hara A, Yamada Y. EWS/ATF1 expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. *J Clin Invest.* 2013;123(2):600-10. 査読有 DOI:pil:63572.110.1172/JCI163572
- 6) Hayakawa K, Ikeya M, Fukuta M, Woltjen K, Tamaki S, Takahara N, Kato T Jr, Sato S, Otsuka T, Toguchida J. Identification of target genes of synovial sarcoma-associated fusion oncoprotein using human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432(4):713-9. 査読有 DOI 10.1016/j.bbrc.2013.01.003.
- 7) Kajita Y, Kato T Jr, Tamaki S, Furu M, Takahashi R, Nagayama S, Aoyama T, Nishiyama H, Nakamura E, Katagiri T, Nakamura Y, Ogawa O, Toguchida J. The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). *PLoS One.* 2013;8(1):e49709 査読有 DOI:10.371/journal.pone.0049709.

〔学会発表〕(計 24 件)

- 1) 玉置さくら、福田誠、早川和男、金永輝、日根野翔、Knut Woltjen、池谷真、加藤友久、戸口田淳也。細胞背景は滑膜肉腫特異的融合タンパク SS18-SSX を介したエピジェネティック制御において重要である。第 37 回日本分子生物学会年会(2014.11.25 パシフィコ横浜(横浜市))
- 2) Tamaki S, Fukuta M, Hayakawa K, Jin Y, Hineno S, Ikeya M, Kato T, Toguchida J. Cellular Context Is Important Factor For The SS18-SSX-Mediated Transcriptional Regulation. 第 19 回 CTOS (2014.10.17 Berlin (Germany))
- 3) Hineno S, Tamaki S, Yonghui J, Kawai A, Yoshida A, Okamoto T, Matsuda S, Kato T, Toguchida J. Involvement of epigenetic mechanism in the formation of epithelial structure of synovial sarcoma. 第 19 回 CTOS (2014.10.17 Berlin (Germany))

- 4) 戸口田淳也、金永輝、松永一仁、岡本健、松田秀一． 骨・軟部腫瘍の遺伝子解析 - 最近の進歩 - ． 第29回日本整形外科学会基礎学術集会(2014.10.9 城山観光ホテル(鹿児島市))
- 5) 玉置さくら、福田誠、早川和男、加藤友久、戸口田淳也． 細胞背景は滑膜肉腫特異的融合タンパク SS18-SSX のエピジェネティック制御において重要である． 第47回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2014.7.17 大阪国際会議場(大阪市))
- 6) Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, Matsunaga K, Kato T, Okamoto T, Matsuda S, Toguchida J． Mutant IDH promotes chondrogenic, but impairs osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through epigenetic modulation． 第47回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会．(2014.7.17 大阪国際会議場(大阪市))
- 7) 日根野翔、玉置さくら、金永輝、川井章、吉田朗彦、岡本健、松田秀一、加藤友久、戸口田淳也． 滑膜肉腫の上皮様構造形成におけるエピゲノム制御の関与． 第47回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2014.7.17 大阪国際会議場(大阪市))
- 8) 戸口田淳也、玉置さくら、福田誠、池谷真、加藤友久、岡本健、松田秀一． 新規治療戦略の開発をめざした肉腫起源細胞の探索． 第87回日本整形外科学会学術総会(2014.5.23 神戸国際会議場(神戸市))
- 9) Tamaki S, Fukuta M, Hayakawa K, Kato T, Toguchida J． SS18-SSX is a cell-context-dependent epigenetic regulator: implication for cell-of-origin of synovial sarcomas.第18回 CTOS(2013.10.31 New York (USA))
- 10) 戸口田淳也、福田誠、玉置さくら、早川和男、大塚隆信、岡本健、池谷真、加藤友久． 肉腫発生機構に関する多能性幹細胞からのアプローチ． 第72回日本癌学会総会(2013.10.5 パシフィコ横浜(横浜市))
- 11) 玉置さくら、加藤友久、早川和男、福田誠、高原直子、岡本健、戸口田淳也． 細胞背景は滑膜肉腫特異的融合タンパク SYT-SSX はエピジェネティック制御において重要な因子である． 第72回日本癌学会総会(2013.10.4 パシフィコ横浜(横浜市))
- 12) 加藤友久、玉置さくら、早川和男、福田誠、岡本健、戸口田淳也． 滑膜肉腫原因融合遺伝子産物 SS18-SSX の相互作用因子の同定によるエピジェネティクス制御破綻の分子基盤の解明． 第72回日本癌学会総会(2013.10.4 パシフィコ横浜(横浜市))
- 13) 金永輝、Hassan Elalaf、加藤友久、池谷真、永田早苗、仲俣岳晴、岡本健、松田秀一、戸口田淳也． 日本人の軟骨腫瘍における IDG 遺伝子の突然変異スペクトラム． 第72回日本癌学会総会(2013.10.3 パシフィコ横浜(横浜市))
- 14) 戸口田淳也． 幹細胞研究の肉腫への応用． 第46回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2013.7.12 東京ドームホテル(東京都))
- 15) 玉置さくら、加藤友久、早川和男、福田誠、高原直子、戸口田淳也． SYT-SSX による滑膜肉腫関連遺伝子 FZD10 のエピジェネティック制御機構について． 第46回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2013.7.11 東京ドームホテル(東京都))
- 16) 加藤友久、渡辺真、佐藤孝明、戸口田淳也． 滑膜肉腫特異的融合がん遺伝子 SYT-SSX によるエピジェネティック制御破綻の分子基盤の解明． 第35回日本分子生物学会年会(2012.12.12 福岡国際会議場(福岡市))
- 17) 玉置さくら、加藤友久、早川和男、福田誠、高原直子、梶田洋一郎、戸口田淳也． 細胞背景は滑膜肉腫特異的融合蛋白質 SYT-SSX のエピゲノム制御において重要な因子である． 第35回日本分子生物学会年会(2012.12.12 福岡国際会議場(福岡市))
- 18) Tamaki S, Kato T, Hayakawa K, Takahara N, Kajita Y, Toguchida J． Cell context is an important factor for the role of SYT-SSX on epigenetic regulation of transcription. 第17回 CTOS(2012.11.16 Prague (Czech Republic))
- 19) Hayakawa K, Fukuta M, Tamai S, Kato T, Ikeya M, Otsuka T, Woltjen K, Toguchida J． Application of iPS cell technology for the analysis of origin-unknown sarcoma characterized by a specific fusion gene. 第17回 CTOS (2012.11.16 Prague (Czech Republic))

- 20) 小林恭介、加藤友久、玉置さくら、高原直子、戸口田淳也 . 内軟骨性骨化における IkkB の機能解明 . 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.27 名古屋国際会議場 (名古屋市))
- 21) 福田誠、早川和男、玉置さくら、沖田圭介、池谷真、Knut Woltjen、大塚隆信、戸口田淳也 . iPS 細胞を用いた肉腫研究 : 滑膜肉腫の起源細胞の解明をめざして . 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26 名古屋国際会議場 (名古屋市))
- 22) 戸口田淳也、玉置さくら、早川和男、福田誠、高原直子、池谷真、加藤友久 . 肉腫の病態解明への幹細胞研究の応用 . 第 71 回日本癌学会総会 (2012.9.21 ロイトン札幌 (札幌市))
- 23) 早川和男、福田誠、玉置さくら、佐藤信吾、池谷真、大塚隆信、Knut Woltjen、戸口田淳也 . 薬剤誘導型発現ベクターを用いた SYT-SSX 融合遺伝子導入 iPS 細胞の樹立 . 第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2012.7.15 京王プラザ (東京都))
- 24) 玉置さくら、加藤友久、早川和男、福田誠、高原直子、梶田洋一郎、戸口田淳也 . 滑膜肉腫の発生機構に関して . 第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2012.7.14 東京国際フォーラム (東京都))

〔図書〕(計 0 件)

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 : 4 0 2 7 3 5 0 2

(2)研究分担者

加藤 友久 (KATO TOMOHISA)
京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員
研究者番号 : 5 0 3 0 1 2 4 7

池谷 真 (IKEYA MAKOTO)
京都大学・iPS 細胞研究所・准教授
研究者番号 : 2 0 4 4 2 9 2 3

(3)連携研究者

なし