

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670642

研究課題名(和文) iPS細胞技術を応用した軟骨形成腫瘍における変異IDHの機能解明

研究課題名(英文) The research on the contribution of mutant IDH gene to the formation of cartilagenous tumors

研究代表者

岡本 健 (Okamoto, Takeshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30414113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨形成腫瘍の起源細胞の候補である骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)に軟骨形成腫瘍に高頻度に変異が認められるIDH1(R132C)遺伝子を発現ベクターを用いて導入した。変異IDH1によって2-ヒドロキシングタル酸の産生、軟骨への分化マーカーであるSOX9、COL2A1の発現上昇、骨分化マーカーであるALP発現の低下が認められた。これは変異IDH1遺伝子がMSCの軟骨への分化誘導能を持つことを示した。また変異IDH1を発現させたMSCにおいてはリン4メチル化ヒストンH3、リン9メチル化ヒストンH3の発現が上昇しており、ヒストンのmodificationが起っていた。

研究成果の概要(英文)：The incidence of IDH mutations was previously shown to be detected in cartilagenous tumors, whereas they have rarely been found in other mesenchymal tumors. To address this unique tumor specificity, we examined the effects of IDH1 R132C gene into human mesenchymal stem cells(hMSC). The induction of the IDH1 R132C into hMSC markedly increased the amount of 2-HG and global histone methylation. The induction of IDH1 R132C promoted the chondrogenic differentiation of hMSC by enhancing the expression of SOX9 and COL2A1 genes in association with an increase in the active mark (H3K4me3), but disrupted cartilage matrix formation. On the other hand, IDH1 R132C inhibited expression of the ALP gene, and subsequently inhibited osteogenic differentiation in hMSC and also in human osteosarcoma cells. These results suggested that IDH1 R132C contributed to the formation of cartilagenous tumors by dysregulating the chondrogenic and osteogenic differentiation via gene-specific histone modulation.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：oncometabolite 軟骨形成腫瘍 isocitrate dehydrogenase

1. 研究開始当初の背景

軟骨形成腫瘍とは、病理組織学的に正常軟骨組織に類似した病変を呈する一群の腫瘍を指し、原発性骨腫瘍の中では骨形成腫瘍に次いで大きなグループを成す。近年、軟骨形成腫瘍の発生に関わる遺伝子として IDH(isocitrate dehydrogenase)遺伝子が同定され注目されている。IDH はクエン酸回路の酸化還元酵素であり、クエン酸からアルファケトグルタル酸(KG)を合成する。IDH 遺伝子の変異はまず、脳腫瘍の網羅的ゲノム解析から同定され、神経膠腫の 70%以上で変異が存在していることが判明した。変異は特定の部位(R132)の点突然変異であり、変異体は KG 合成能を失い、新たに 2-ヒドロキシグルタル酸(2HG)を合成する作用を獲得する。この 2HG がいわゆる oncometabolite と呼ばれるものであり、様々な面で腫瘍の発生・進展に関与していることが示されている。2HG の機能としては、これまで prolyl hydroxylase (PHD)の機能を抑制することで、間接的に hypoxia inducible factor を安定させ、その下流の VEGF の発現の亢進により腫瘍における血管新生を亢進させること、やはり PHD を介して基底膜コラーゲンの分解促進による浸潤能の獲得させること、更に KG の合成が低下することによってヒストン脱メチル化酵素の機能が阻害され、その結果ヒストン全体のメチル化が亢進するなど、幅広い作用を呈することが次々と明らかになってきている。これまでに骨軟部腫瘍における IDH 解析では下記の興味深い結果が得られている。

(1)骨軟部腫瘍において IDH 遺伝子の変異は軟骨系腫瘍においてのみ検出され、他の腫瘍では存在していない。

(2)Ollier 病及び Maffucci 症候群の体細胞において変異が検出され、これらの疾患の原因遺伝子の一つである可能性が判明した。

(3)神経膠腫では低悪性度の腫瘍から検出され、更に悪性度が高まる程、変異が存在する率が高まるが、軟骨系腫瘍の場合、良性の内軟骨腫においても変異が存在しており、かつその頻度は高悪性度の軟骨肉腫と同等である。

(4)神経膠腫における変異は 90%異常がほぼ全て R132H であるのに対して軟骨系腫瘍における変異の大多数が R132C である。

以上の結果は、特定の IDH 変異が軟骨形成腫瘍という特定の腫瘍の発生に密接に関連していることを示す。しかし軟骨形成腫瘍における役割は不明である。

2. 研究の目的

軟骨形成腫瘍のほとんどは骨髄内に発生す

ることから、骨髄内に存在する、軟骨細胞に分化できる前駆細胞(幹細胞)が腫瘍の起源細胞であると考えられる。変異 IDH 遺伝子の機能を解明するためには、これらの細胞に導入することが必要であるが、いずれも単離同定が困難な細胞であり、再現性をもって同質の細胞を用いた実験を行うことは困難である。そこで、本研究では iPS 細胞から軟骨細胞を分化誘導する系を用いる。研究分担者の戸口田は既に下記に示すように分化誘導技術を確立しており、これを応用する。そこで、軟骨形成腫瘍に特異的に存在している IDH 遺伝子を骨髄間葉系幹細胞、iPS 細胞を始めとする幹細胞に導入し、分化段階特異的に発現させてその作用を解析することで、軟骨腫瘍発生における役割を明らかにすることを目的とする。その結果は軟骨形成悪性腫瘍に特化した新規治療法の開発につながることを期待できる。

3. 研究の方法

日本人の軟骨形成腫瘍、骨形成腫瘍における IDH 遺伝子変異の頻度を調べるために 77 例の軟骨形成腫瘍、7 例の骨軟骨腫、29 例の骨肉腫を用いた。細胞への遺伝子導入のために、R132C 変異型の IDH1 を組み込んだ発現ベクターを作成した。ベクターはレンチウイルスベクター及び、ドキシサイクリン依存性に変異 IDH1 を発現させる KW111 ベクターを使用した。KW111 ベクターは Doxycyclin によって組み込まれた遺伝子の発現が誘導されるとともに mCherry 遺伝子も誘導され、誘導効率が可視化できる。更にもう一つの特徴として、トランスポゾン配列を有しており、トランスポゼースと同時に導入することで高率にゲノムに組み込まれるという利点をもつ。まずレンチウイルスベクターによってヒト骨髄由来間葉系幹細胞に変異型 IDH1 を発現させ、2-ヒドロキシグルタル酸の産生、骨・軟骨の関連遺伝子の発現解析、骨・軟骨への分化誘導を行った。発現変動があった遺伝子のプロモーターのヒストン修飾を調べた。次に骨分化能に対する変異 IDH1 の影響を確認するために、ドキシサイクリン誘導型ベクター KW111 を用いてヒト骨肉種細胞株である ANOS に R132C 変異型 IDH1 を発現させた。更に iPS 細胞にも KW111 を用いて R132C 変異型 IDH1 を導入した。

4. 研究成果

(1)日本人の骨・軟骨形成腫瘍における IDH 遺伝子変異

日本人症例においても IDH 遺伝子の変異は軟骨形成腫瘍のみで検出され、骨軟骨腫、骨肉腫の骨形成腫瘍では全く認められなかった。軟骨形成腫瘍における遺伝子変異の頻度は 77 例中 35 例約 45%であった。遺伝子変異の 71%が IDH1 変異、29%が IDH2 変異であり、IDH1 の変異には R132C、R132G、R132H の 3 種類、IDH2 の変異にも R172S、

R172T、R172W の 3 種類があることがわかった。更に IDH1 変異の 64%が R132C 型を占めた。これらは海外からの報告とほぼ同様であった。

(2) ヒト骨髄間葉系幹細胞への R132C 変異 IDH1 遺伝子導入

レンチウイルスを用いてヒト骨髄間葉系幹細胞に IDH1 R132C 変異型を発現させ、ガスクロマトグラフィー質量解析 GC-MS を行い、R132C 変異型 IDH1 を発現させた細胞で 2-HG が産生されていることを確認した。

(3) R132C 変異 IDH1 遺伝子発現によるヒト骨髄間葉系幹細胞における軟骨分化能の変化

この細胞で軟骨分化のマスター転写因子である SOX9 と軟骨基質である COL2A1 の遺伝子発現を調べたところ、両遺伝子とも発現が上昇していた。この結果から、R132C 発現によって間葉系幹細胞の軟骨細胞への自然分化が誘導されると考えられる。実際に軟骨分化を三次元培養で行うと、コントロール細胞と比較して変異 IDH1 発現細胞は正常の骨髄間葉系幹細胞の様な軟骨ペレットを形成しなかった。この結果は産生された 2-HG が細胞外基質の成熟を阻害する可能性を示唆した。

(4) R132C 変異 IDH1 遺伝子発現によるヒト骨髄間葉系幹細胞における骨分化能の変化

R132C 変異 IDH1 遺伝子を発現したヒト骨髄間葉系幹細胞に骨分化誘導を行ったところ、石灰化に必須である ALPL 遺伝子の発現は明らかに抑制された。Alizarin red 染色と細胞培養液中のカルシウム含有量を測定を行った結果、骨分化誘導後、R132C 変異 IDH1 遺伝子を発現したヒト骨髄間葉系幹細胞では Alizarin red の染色性やカルシウム含有量が正常の骨髄間葉系幹細胞と比較して有意に低かった。この結果は R132C 変異 IDH1 遺伝子発現は間葉系幹細胞の骨分化能を抑制すると考えられる。例えば骨肉腫の診断基準は腫瘍細胞自体が骨形成をすることであり、以上の結果は IDH 遺伝子の変異が骨肉腫に認められないことと合致する。

(5) 変異 IDH1 遺伝子発現によるヒト骨髄間葉系幹細胞におけるヒストンメチル化の変化

Western blot を行うことで、エピジェネティックな変化であるヒストン H3 の修飾を調べた。変異 IDH1 遺伝子導入によってグローバルなヒストン H3 のメチル化が有意に上昇した。これらのヒストン H3 メチル化には、転写活性化マーカーであるリシン 4 メチル化ヒストン H3(H3K4me3)と、抑制マーカーであるリシン 9 メチル化ヒストン H3(H3K9me3)とリシン 27 メチル化ヒストン H3(H3K27me3)が含まれた。

R132C の間葉系幹細胞の分化能への影響が、ヒストンの修飾を介しているかを調べるため、R132C によって発現が促進された軟骨分化のマスター転写因子である SOX9 のプロモーター解析を行った。その結果、転写の active marker である H3K4me3 の発現のみが有意に上昇した。同様に発現が促進された軟骨基質である COL2A1 の promoter においても、転写の active marker である H3K4me3 の発現有意に上昇していた。COL2A1 の enhancer region も転写活性に重要であることから、同様の手法で Enhancer region のヒストン修飾を調べたところ Promoter 領域と同じように、転写の active marker である H3K4me3 の発現が有意に上昇していた。一方、変異 IDH1 発現によって発現が抑制された ALPL のプロモーター領域では、転写の Repressive marker である H3K9me3 の発現が有意に上昇していた。この結果は変異 IDH1 発現による 2-HG 産生がエピジェネティックな修飾を介して骨・軟骨分化に関連する遺伝子発現を制御していることを示唆している。

(6) 変異 IDH1 遺伝子発現による骨肉腫細胞株 ANOS 細胞における骨分化能の影響

ドキシサイクリン誘導型ベクター KW111 を用いて ANOS 細胞に変異 IDH1 遺伝子を発現させ、骨分化を誘導すると、ヒト間葉系幹細胞と同様、R132C 変異 IDH1 の発現は ALPL の発現を有意に抑制した。Alizarin red 染色とカルシウム含有量の計測でも同様に有意に石灰化が抑制された。

(7) iPS 細胞への変異 IDH1 遺伝子導入

続いて iPS 細胞を用いた実験系確立に向けて、R132C 変異 IDH1 遺伝子をドキシサイクリン融合型ベクターを用いて iPS 細胞に導入し、薬剤（ドキシサイクリン）を用いて任意の分化段階で変異 IDH1 遺伝子を誘導できる、doxycycline-inducible iPS を作成することに成功した。この iPS 細胞を Mesoderm 由来の間葉系幹細胞に分化させた後にドキシサイクリンを添加し、変異 IDH1 遺伝子の発現が誘導されることを確認した。

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)

[学会発表](計3件)

- (1) Mutant IDH1 dysregulates the differentiation of mesenchymal stem cells in association with gene-specific histone modifications to cartilage- and bone-related genes. 金永輝、2015年2月21日、第39回近畿肉腫研究会、メルパルク京都(京都市)
- (2) Mutant IDH promotes chondrogenic, but impairs osteogenic differentiation of human

mesenchymal stem cells through epigenetic modulation. 金永輝、岡本健、松田秀一、戸口田淳也、2014年7月17日、第47回日本整形外科学会 骨・軟骨腫瘍学術集会、大阪国際会議場（大阪市）

- (3) Mutant spectrum of IDH genes in Japanese cartilaginous tumors. Younghui Jin. 2013年10月3日、第27回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 健 (OKAMOTO TAKESHI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：30414113

(2) 研究分担者

金 永輝 (JIN YOUNGHUI)
京都大学・再生医科学研究所・研究員
研究者番号：90620344

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

(3) 連携研究者

なし