

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04956

研究課題名(和文) 軟骨形成性腫瘍特異的な変異IDHの機能の解明とそれに基づく治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of functional roles of mutant IDH as specific mutations in cartilage-forming tumors and its application for the development of treatment

研究代表者

戸口田 淳也 (Toguchida, Junya)

京都大学・ウイルス・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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨形成腫瘍におけるドライバー変異であるIDH遺伝子変異の腫瘍発生における意義、そして腫瘍特異性の背景にある分子機構を明らかにするために、iPS細胞を活用した機能解析及び形質転換実験を行った。薬剤誘導型ベクターを用いて正常及び変異IDHをAAVS1遺伝子座に導入したiPS細胞を作製し、間葉系幹細胞に分化誘導してからを発現させて解析を行った。その結果、変異IDHは間葉系幹細胞の増殖を抑制すること、分化能に関しては骨分化を抑制し、軟骨関連遺伝子の発現を亢進させることが判明した。更にパッセンジャー変異として知られているp16遺伝子の欠損を導入した細胞を作製し造腫瘍能の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Mutations of IDH gene are driver mutations in cartilage-forming tumors. To understand the mechanism of tumor specificity and functional role of IDH mutations in tumorigenesis of cartilage-forming tumors, we have performed experiments using human iPS cells. We established iPS cells with a drug-inducible mutant IDH gene in the AAVS1 locus and induced the expression of mutant IDH after the differentiation into mesenchymal stem cells (MSC). As a result, we have observed that mutant IDH has an inhibitor effect for the growth of MSC and as for the effects on differentiation, it inhibited osteogenesis and promoted the expression of cartilage-related genes. To recapitulate the tumorigenesis in vitro, we further introduced the knock-out type mutations of p16 gene as a passenger mutation into IDH-AAVS-iPSCs and investigated the tumor forming capacity of iPSCs with mutant IDH and without p16 gene.

研究分野：幹細胞生物学、整形外科学

キーワード：chondrosarcoma IDH iPSC p16

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組織を形成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。次世代シーケンサーを用いた解析等により、遺伝子変異スペクトラムが明らかにされつつあり、その結果ドライバー遺伝子の一つとして IDH(isocitrate dehydrogenase)遺伝子が同定された。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。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 onco-metabolite と呼ばれるものであり、脱メチル化阻害によるゲノム及びエピゲノム修飾改変、Proline hydroxylase (PHD)阻害による HIF1- α の安定化など、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。我々は、平成 25~26 年度の挑戦的萌芽研究により以下の事を明らかにした。

(1) R132C 変異体は骨肉腫の骨分化能を抑制する。

R132C 変異型 IDH を骨肉腫細胞株に導入し骨分化誘導を行った結果、ALP 遺伝子のプロモーター領域の発現抑制性ヒストン修飾(H3K9me3 及び H3K27me3)が亢進し、遺伝子発現が抑制され石灰化結節形成能も低下した。

(2) R132C 変異体は間葉系幹細胞の軟骨関連遺伝子の発現を促進する。

骨髄間質由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC)に、R132C 変異体を発現させると、SOX9 及び COL2A1 遺伝子の発現が亢進し、その際、両遺伝子の発現調節領域のヒストン修飾の中で活性型マークである H3K4me3 が増加していた。

(3) 間葉系幹細胞と神経幹細胞で変異体のタイプによる 2HG 産生量が異なる。

Doxycyclin 誘導型変異 IDH 遺伝子を導入した iPS 細胞を、中胚葉由来 MSC 及び外胚葉由来神経幹細胞(NSC)に誘導してから、それぞれの変異体を発現させた。その結果、NSC では R132C 型と R132H 型で 2HG の産生量に差が認められなかったが、MSC では両者に著しい相違が観察された。

2. 研究の目的

上記の挑戦的萌芽研究の成果を発展させ、iPS 細胞技術を用いて軟骨形成性腫瘍におけ

る変異 IDH の機能を明らかにし、治療標的としての可能性を探索することを目指し、下記の課題に取り組んだ。

(1) Doxycyclin 誘導型変異 IDH 遺伝子を導入した iPS 細胞を樹立し、MSC 及び軟骨細胞、そして骨芽細胞に分化誘導する。

(2) 上記の過程における変異 IDH の増殖分化に対する影響及びエピゲノムへの作用を解析し、軟骨肉腫発生過程の初期段階における変異 IDH の意義を明らかにする。

(3) 変異 IDH 導入 iPS 細胞に更にパッセンジャー変異を導入し、その造腫瘍能を評価し、創薬研究のツールとなる、ヒト軟骨形成性腫瘍のモデルを樹立する。

(4) 変異 IDH 導入 iPS 細胞を NSC に誘導し、MSC において得られた変異 IDH の作用と比較することで、同一遺伝子変異により全く異なる腫瘍が発生する分子機構を理解するための情報を得る。

3. 研究の方法

(1) Doxycyclin 誘導型変異 IDH 遺伝子を導入した iPS 細胞を樹立する。予備実験はゲノム上にランダムに挿入された細胞を用いて行ったが、その後サイレンシングにより発現が著しく低下し、形質転換実験等の長期にわたって発現を維持する実験には不適であることが判明した。この問題を解決するために、シングルコピーを AAVS1 遺伝子座へ導入したもの (IDH-AAVS1-iPSC) を作製する。

(2) これまでに樹立した分化誘導法により、IDH-AAVS1-iPSC より MSC を誘導し (IDH-AAVS1-iMSC)、各変異 IDH 遺伝子を発現させ、遺伝子発現プロファイルを比較する。更に骨あるいは軟骨細胞に誘導し、その結果を比較検討する。同時に、DNA メチル化やヒストンアセチル化を網羅的に解析し、分化能への影響の分子機構を解析する。

(3) パッセンジャー変異としてまず p16 遺伝子の欠損を導入し、形質転換を評価する。

(4) 各種変異 IDH を導入した iPS 細胞から NSC を誘導する (IDH-AAVS1-iNSC)。誘導後、変異 IDH を発現させ、その NSC のマーカー遺伝子の発現に対する影響を解析する。

4. 研究成果

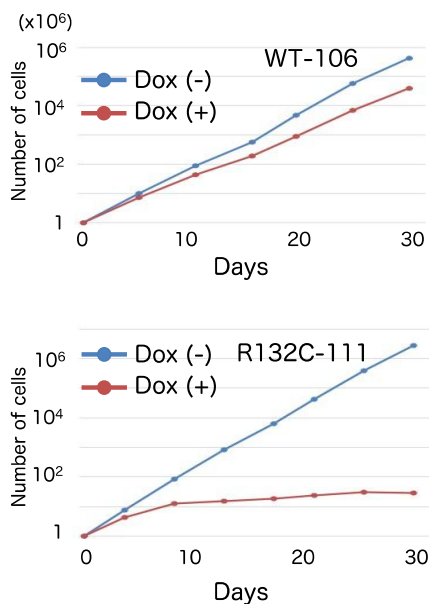
(1) Doxycyclin 誘導型変異 IDH 遺伝子を導入した iPS 細胞の樹立。

AAVS1 遺伝子座に薬剤誘導型 R132C あるいは

は R132H 変異 IDH 遺伝子を挿入した iPS 細胞(mutIDH-AAVS1-iPSC)を作製、それぞれ複数のクローンから、変異 IDH 遺伝子の発現量が同程度のクローンを選択した。選択した各クローンから側板中胚葉を経る系で iMSC を誘導、二次元誘導法により iNSC を誘導し、それぞれで Doxycyclin により IDH の発現が誘導可能なことを確認した。

(2) 変異 IDH の iMSC の増殖に対する作用の解析。

R132C 及び R132H 型変異それぞれの IDH-AAVS1-iPSC を側板中胚葉を経る系により iMSC に誘導してから Doxycyclin を添加し、長期間、変異 IDH を発現維持させることに成功した。mutIDH-AAVS1-iMSC は親株あるいは正常 IDH を導入した対照細胞(wtIDH-AAVS1-iMSC)と比較して増殖能の低下を認め、変異 IDH が増殖に関しては抑制的に作用することが明らかになった。



また mutIDH-AAVS1-iMSC を骨、軟骨及び脂肪に分化させたところ、骨分化能が阻害され、軟骨関連遺伝子の発現が亢進しており、骨髄由来 MSC を用いて得られた結果と同様な結果が得られた。

(3) 変異 IDH のエピゲノムに対する作用の解析。

上記 mutIDH-AAVS1-iMSC を増殖がほぼ停止した段階まで培養し、経時的に網羅的な DNA メチル化及びヒストンメチル化に関して解析を行った。現在、データを解析中

である。

(4) 変異 IDH 誘導 iMSC を用いた in vitro 形質転換実験。

上記の薬剤誘導型変異 IDH 遺伝子を導入した iPS 細胞において、p16 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いて KO することを試みた。結果として、複数の p16+/- 及び p16-/- 細胞を得た。これらの細胞を in vitro において長期間培養を継続し、上記 1 の実験と同様に、エピゲノムの網羅的解析を進めている。またそれぞれの細胞の in vitro (血清依存性及び足場依存性増殖) 及び in vivo (免疫不全マウスの骨髄内に移植) での癌細胞としての形質の評価を行っている。

(5) 異なる細胞系譜における変異 IDH の作用の比較解析

各変異型の mutIDH-AAVS1-iPSC を NSC に誘導し、変異 IDH による 2-HG 産生量を比較し、予備実験で得られた結果と同様に、NSC では R132C 型と R132H 型で 2HG の産生量に差が認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Konishi E, Nakashima Y, Mano M, Tomita Y, Kubo T, Araki N, Morii E, Yoshikawa H, Haga H, Toguchida J, Ueda T, Osawa M, Hoshi M, Inoue T, Aono M, Yanagisawa A. Chondroblastoma of extra-craniofacial bones: Clinicopathological analyses of 103 cases. *Pathol Int.* 査読有、2017;67(10):495-502. doi: 10.1111/pin.12586.

Tamaki S, Fukuta M, Sekiguchi K, Jin Y, Nagata S, Hayakawa K, Hineno S, Okamoto T, Watanabe M, Woltjen K, Ikeya M, Kato T Jr, Toguchida J. SS18-SSX, the Oncogenic Fusion Protein in Synovial Sarcoma, Is a Cellular Context-Dependent Epigenetic Modifier. *PLoS One.* 査読有、2015;10(11):e0142991. doi: 10.1371/journal.pone.0142991.

Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, Tamaki S, Hineno S, Matsunaga K, Woltjen K, Kobayashi Y, Nagata S, Ikeya M, Kato T Jr, Okamoto T, Matsuda S, Toguchida J. Mutant IDH1 Dysregulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Association with Gene-Specific Histone Modifications to Cartilage- and Bone-Related Genes. *PLoS One.* 査読有、

2015;10(7):e0131998. doi:
10.1371/journal.pone.0131998.
Konishi E, Nakashima Y, Mano M, Tomita Y, Nagasaki I, Kubo T, Araki N, Haga H, Toguchida J, Ueda T, Sakuma T, Imahori M, Morii E, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Futani H, Wakasa K, Hoshi M, Hamada S, Takeshita H, Inoue T, Aono M, Kawabata K, Murata H, Katsura K, Urata Y, Ueda H, Yanagisawa A. Primary central chondrosarcoma of long bone, limb girdle and trunk: Analysis of 174 cases by numerical scoring on histology. *Pathol Int*. 査読有、2015;65(9):468-75. doi: 10.1111/pin.12324.
Shibayama T, Okamoto T, Nakashima Y, Kato T, Sakurai T, Minamiguchi S, Kataoka TR, Shibuya S, Yoshizawa A, Toguchida J, Haga H. Screening of BCOR-CCNB3 sarcoma using immunohistochemistry for CCNB3: A clinicopathological report of three pediatric cases. *Pathol Int*. 2015;65(8):410-4. doi: 10.1111/pin.12319.

[学会発表](計 15 件)

戸口田淳也、玉置さくら、金永輝、鎌倉武史、吉富啓之 多能性幹細胞の肉腫研究への応用 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 29 日
鎌倉武史、金永輝、玉置さくら、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也 : 軟骨形成性腫瘍における変異型 IDH の機能的意義について 第 30 回日本軟骨代謝学会、京都、2017 年 3 月 4 日
鎌倉武史、金永輝、渡辺真、松永一仁、玉置さくら、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也 間葉系幹細胞の分化及び形質転換に対する D-2-HG 産生型変異 IDH1 の作用 第 39 回 日本分子生物学会年会、神奈川、2016 年 12 月 1 日
Kamakura T, Jin Y, Matsunaga K, Watanabe M, Tamaki S, Okamoto T, Yoshitomi H, Toguchida J. EXPLORATION OF CANDIDATE GENES TO INDUCE CARTILAGE TUMORS WITH MUTANT IDH1 GENE USING IPSC. CTOS 2016 Annual Meeting, Lisbon, November 11, 2016.
Jin Y, Watanabe M, Tamaki S, Okamoto T, Toguchida J. Mutant IDH1 dysregulates the differentiation of mesenchymal

stem cells in association with gene-specific histone modifications to cartilage- and bone-related genes. The CTOS 21th Annual Meeting, Lisbon, November 11, 2016.
Tamaki S, Fukuta M, Sekiguchi K, Hayakawa K, Jin Y, Okamoto T, Woltjen K, Yoshitomi H, Toguchida J. SS18-SSX, the oncogenic fusion protein in synovial sarcoma, is a cellular context-dependent epigenetic modifier. CTOS 2016 Annual Meeting, Lisbon, November 10, 2016
金永輝、Hassan Elalaf、渡辺真、玉置さくら、日根野翔、松永一仁、Knut Woltjen、岡本健、松田秀一、戸口田淳也 変異型 IDH1 は遺伝子特異的なヒストン修飾を介して、間葉系幹細胞から軟骨及び骨への分化を脱制御する 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 8 日
鎌倉武史、金永輝、渡辺真、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也 D-2-HG 産生を伴う IDH1/2 変異が及ぼす骨・軟骨分化への影響 第 89 回 日本生化学会大会、宮城、2016 年 9 月 26 日
金永輝、Hassan Elalaf、渡辺真、玉置さくら、日根野翔、松永一仁、Knut Woltjen、岡本健、松田秀一、戸口田淳也 変異型 IDH1 は遺伝子特異的なヒストン修飾を介して、間葉系幹細胞から軟骨及び骨への分化を脱制御する 第 40 回近畿肉腫研究会、京都、2016 年 2 月 6 日
Tamaki S, Fukuta M, Sekiguchi K, Hayakawa K, Jin Y, Hineno S, Okamoto T, Watanabe M, Woltjen K, Ikeya M, Kato T, Toguchida J. SS18-SSX, the oncogenic fusion protein in synovial sarcoma, is a cellular context-dependent epigenetic modifier. CTOS 2015 Annual Meeting, Salt Lake City, November 6, 2016.
岡本健、金永輝、玉置さくら、松田秀一、戸口田淳也 . 間葉系幹細胞の骨軟骨分化能における変異型 IDH1 の影響. 第 53 回日本癌治療学会、京都、2015 年 10 月 31 日
河村真吾、秋山治彦、大野貴敏、山田一成、戸口田淳也、山田泰広. 細胞初期化技術を用いた肉腫発生メカニズム解析. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、富山、2015 年 10 月 23 日
金永輝、Hassan Elalaf、渡辺真、玉置さ

研究者番号：60506765

くら、日根野翔、松永一仁、Knut Woltjen、岡本健、松田秀一、戸口田淳也。変異型 IDH1 は骨・軟骨関連遺伝子のヒストンを遺伝子特異的に修飾し、間葉系幹細胞の分化能を脱制御する。第 74 回日本癌学会総会、名古屋、2015 年 10 月 10 日
戸口田淳也。iPS 細胞技術の肉腫研究への応用。第 48 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会（2015.7.10 高松）
金永輝、Hassan Elalaf、渡辺真、玉置さくら、日根野翔、松永一仁、Knut Woltjen、岡本健、松田秀一、戸口田淳也。間葉系幹細胞の骨分化能における変異型 IDH1 の影響。第 48 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、高松、2015 年 7 月 9 日

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA, Junya)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授
研究者番号：40273502

(2) 研究分担者

池谷 真 (IKEYA, Makoto)
京都大学・iPS 細胞研究所・准教授
研究者番号：20442923

(3) 研究分担者

金 永輝 (JIN, Yonghui)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号：90620344

(4) 研究分担者

岡本 健 (OKAMOTO, Takeshi)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30414113

(5) 連携研究者

渡辺 亮 (Watanabe, Akira)
京都大学・iPS 細胞研究所・特定拠点助教