

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791672

研究課題名（和文） ユーイング肉腫動物モデルの確立と腫瘍発生機構の解析

研究課題名（英文） Tumorigenic mechanisms of gene fusion-related sarcoma: study using Ewing's sarcoma models

## 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

## 研究成果の概要（和文）：

ユーイング肉腫のモデルマウスを作製し、正常な細胞から腫瘍が発生する過程を経時的に観察・解析した。その結果、ユーイング肉腫は、融合遺伝子（EWS-FLI1）の標的制御に適した状態の母地細胞から発生することが示され、遺伝子発現プロファイルからは、発がん重要な標的遺伝子を同定することができた。治療に向けての解析では、融合遺伝子自体あるいは標的遺伝子を阻害する低分子化合物が、有効な治療に結びつく可能性を示し、本モデルが前臨床試験にも有用である事が考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

The Ewing's sarcoma mouse models enabled us to analyze tumorigenic processes from the initial step to the highly malignant stage, and has selected important genetic pathway in the processes. Our platform combined with tests using human cell lines will allow us to explore and evaluate novel target therapies.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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：骨軟部腫瘍、融合遺伝子、動物モデル、ユーイング肉腫、発生母地、発がん機構、EWS-FLI1、エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

ユーイング肉腫は、小児や若年者の骨・軟部組織に発生し、原発性の悪性骨腫瘍では骨肉腫に次いで多い。組織学的には、小円形細胞の旺

盛な増殖から成るが、特徴的な分化傾向を示さないことから、起源細胞を推測することが難しく、帰属不明な腫瘍といえる。発症の引き金となる分子異常としては、染色体転座に基づく融

合遺伝子 (EWS-FLI1, EWS-ERG 等) の形成が知られているが、それ以降の仕組みは殆ど明らかにされていない。

その解決の糸口となる動物モデルの作製は困難で、マウス ES 細胞や胎児線維芽細胞 (MEF) に融合遺伝子を発現すると、毒性を発揮して細胞死を引き起こし、造血細胞で発現した場合には白血病を誘発する。このことは、融合遺伝子と細胞/細胞環境との相性が重要であることを示唆していて、起源細胞を特定することは、ユーイング肉腫発症機構解明の一端を担うことに繋がる。一方、ヒトのユーイング肉腫の細胞株をヌードマウスに移植する (xenograft) 実験系では、既に二次的な遺伝子異常が生じて悪性転化した細胞が主となるために、発がんの初期を再現し、起源細胞を同定することが難しい。

そこで本研究課題では、腫瘍発生から進展に至る過程を解析できるマウスモデルの作製を行い、腫瘍の起源細胞を特定すると共に、ユーイング肉腫の病態の解明に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

ユーイング肉腫の発生には、融合遺伝子の形成や様々な遺伝子変異の蓄積など、ゲノム側の異常だけでなく、腫瘍の発生母地となる細胞や細胞環境も深く関わっている。本研究の目的は、ユーイング肉腫の動物モデルを用いて、腫瘍の発生母地の特定と、融合遺伝子と協調して働く、新規がん関連遺伝子の同定を行う。

ヒトのユーイング肉腫を反映する動物モデルを作製することは、発がんから悪性化への過程を *in vivo* で経時的に解析できるだけでなく、治療薬の効果判定など臨床でもその有用性を期待できる。また、発生母地を特定することは、細胞分化と発がんとの関係を明らかにし、融合遺伝子と共役する遺伝子を同定することは、腫瘍の発生から進展への分子経路の解明に繋がると期待される。

## 3. 研究の方法

発がん初期のプロセスを解析するために、動物モデルの作製で用いたマウス胎仔の母地細胞について、細胞分化の程度や、細胞環境に及ぼす融合遺伝子の役割を調べる。次に、腫瘍形成から進展へのプロセスを解析するために、融合

遺伝子と協調して働くがん関連遺伝子の機能を明らかにする。さらに、解析の結果を通じて、治療の標的となる細胞や分子異常を見出す。

(1) ユーイング肉腫マウスモデルの確立: マウス胎仔の間葉系組織からマイクロダイセクションによって集めた細胞に、融合遺伝子 (EWS-FLI1, EWS-ERG) を導入してヌードマウスへ移植する。このマウスは、効率よく腫瘍が発生するので、形成された腫瘍を病理学的に解析し、ユーイング肉腫の動物モデルとしての妥当性を評価する。

(2) 発生母地の特定と、細胞環境の解析: 腫瘍の発生母地となったマウス胎仔の母地細胞について、細胞の系譜と分化度を明らかにする。融合遺伝子の受け皿となる細胞の環境変化に関わる遺伝子を同定するために、融合遺伝子導入前と後とで遺伝子発現プロファイリングを行う。

(3) 新規がん関連遺伝子の同定と機能解析: 融合遺伝子の形成以降の過程に関与するセカンドヒットとなるがん関連遺伝子を同定する。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、retroviral tagging が適用できるので、融合遺伝子と協調して働く遺伝子を効果的に抽出することができる。抽出された遺伝子の発現をヒト症例で解析し、協調遺伝子として同定する。融合遺伝子と協調遺伝子との機能解析の解明を通じて、その機構を標的とした分子創薬の可能性も模索する。

## 4. 研究成果

染色体転座を伴う骨軟部腫瘍では、プライマリな異常として、融合遺伝子の形成が挙げられる。融合遺伝子が腫瘍の増殖や維持に重要であることは示されているが、腫瘍の発生母地や融合遺伝子が形成されてから腫瘍がどのような発生過程を辿るのかについては未だ不明な点が多い。

そこで我々は、肉腫発生の初期から進展に至る過程を、病理組織学的・分子遺伝学的に解析できる新規の *ex vivo* 動物モデルの作製を行った。マウス胎仔の間葉系組織からマイクロダイセクションによって集めた細胞に、融合遺伝子 (EWS-FLI1, EWS-ERG) を導入してヌードマウスへ移植したところ、約8週でヒトユーイング肉腫を模倣する腫瘍を誘導することができた。さらに Cre-loxP システムを利用して、融合遺伝

子をノックアウトすると、腫瘍細胞の細胞老化が迅速に惹起されて細胞増殖ができなくなる事が示され、腫瘍細胞は、融合遺伝子依存的に増殖することが明らかとなった。

次いで、ユーイング肉腫のマウスモデルの作製に用いた胎仔細胞における遺伝子発現プロファイル解析を行い、腫瘍形成の初期で発現応答する遺伝子に着目し、EWS-FLI1 の標的遺伝子を中心にその発現を評価した。その結果 EWS-FLI1 の標的遺伝子は、母地細胞におけるヒストンのメチル化状態により、その発現応答が左右され、母地細胞と融合遺伝子とのマッチングが腫瘍形成に重要であることが示唆された。

発がん過程において、融合遺伝子と協調する遺伝子の探索をレトロウィルスタギング法で行ったが、候補となった遺伝子はいずれも強力な協調作用を示さなかった。しかし一方で、大規模な遺伝子発現アレイ解析では（マウスユーイング肉腫 30 例とヒト腫瘍 117 症例:ユーイング肉腫、悪性線維性組織球腫、粘液状脂肪肉腫、滑膜肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、神経芽細胞腫）、幾つかの重要な標的遺伝子とパスウェイを特定することができた。

このうち、特に腫瘍の増殖や維持に重要と予想される遺伝子の発現を siRNA で抑制したり、標的遺伝子産物を特異的阻害剤で抑制したりすると、ヒトとマウスのユーイング肉腫細胞の増殖が抑えられることが分かった。

融合遺伝子のノックアウト実験と、標的遺伝子のノックダウン実験の結果から、ユーイング肉腫においては、融合遺伝子自体を標的とした治療と、プロファイリングから得られた分子標的に対する治療の両者が有効である可能性が示唆された。

## 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 田中美和、融合遺伝子 (キメラ遺伝子) を用いた動物モデル: 骨軟部腫瘍発生機構の解析と治療への応用、第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 7 日、札幌

- (2) Miwa Tanaka, Animal model of fusion related sarcoma to explore tumorigenic mechanisms and novel therapeutics, Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, 2013 年 2 月 24 日、Maui (U.S.A)

- (3) 田中美和、キメラ遺伝子を有する肉腫の発症と進展機構: 動物モデルを用いた解析、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、札幌

- (4) 田中美和、キメラ遺伝子を有する肉腫の発症と進展機構、発癌病理研究会、2012 年 8 月 30 日、修善寺

- (5) 田中美和、ユーイング肉腫モデルマウスを用いた発生起源の同定と遺伝子発現解析、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、横浜

- (6) 田中美和、SYT-SSX1 を導入した滑膜肉腫モデルの解析、平成 23 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ、2012 年 1 月 19 日、大津

- (7) 田中美和、新しいユーイング肉腫モデルマウスを用いた遺伝子発現解析と発生起源の同定、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、横浜

- (8) 田中美和、ユーイング肉腫特異的な Ews-Fli1 転座マウスは拡張型心筋症を発症する、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋

- (9) 田中美和、マウスモデルを利用したユーイング肉腫の発がん過程の解析、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 30 日、横浜

[図書] (計 1 件)

田中美和、株式会社エル・アイ・シー、疾患モデルの作製と利用: がん・骨軟部腫瘍、2012、9(600-608)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田中 美和（がん研・発がん・研究員）

研究者番号：70345883

### (2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

### (3)連携研究者

（ ）

研究者番号：