

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10437

研究課題名(和文) iPS技術を用いた明細胞肉腫起源細胞の解析と、分子標的治療の研究

研究課題名(英文) Identification of the cell-of-origin of clear cell sarcoma utilizing iPS cell technology and development of novel molecular therapy

研究代表者

大野 貴敏 (Ohno, Takatoshi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60281052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：明細胞肉腫モデルマウス(JCI 2013)に発生したEWS/ATF1誘導性肉腫細胞株より iPS細胞を作製した。肉腫由来iPS細胞からキメラマウスを作製し、様々な体細胞へと再分化させた。再度EWS/ATF1発現を誘導したところ、皮下及び筋膜周囲に特異的な肉腫発生を認めた。組織学的評価、リネージトレーシングにより、Mpz およびTppp3リネージが肉腫の起源であることを同定した。マイクロアレイ、ChIPシーケンスの結果、EWS/ATF1による遺伝子発現変化は細胞種毎に異なること、それは細胞種毎に特異的なEWS/ATF1結合領域があることに起因することを同定した。

研究成果の概要(英文)：We established sarcoma-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) from EWS/ATF1-induced sarcoma cell line. We re-differentiated iPSCs into all kinds of somatic cells by generating sarcoma iPSCs-derived chimeric mice. Upon reinduction of EWS/ATF1 in somatic cells, sarcomas specifically developed around subcutaneous tissue and fascia. As a result of histological analysis and lineage tracing experiment, we revealed that Mpz and Tppp3 lineages were origin of EWS/ATF1-induced sarcomas. Moreover, microarray and ChIP-sequencing experiment revealed that transcriptional response against EWS/ATF1 expression was different from each cell type, and it depended on cell-type specific EWS/ATF1 binding to the genome.

研究分野：整形外科学

キーワード：明細胞肉腫 EWS/ATF1 iPS細胞 起源細胞

1. 研究開始当初の背景

明細胞肉腫は特定の分化傾向を示さない、起始細胞不明の肉腫である。研究代表者らは EWS/ATF1 融合遺伝子をドキシサイクリン (Dox) で発現誘導できる明細胞肉腫モデルマウスを作製し、神経堤細胞由来の細胞が起源細胞となることを報告した (JCI 2013)。肉腫に特定の起始細胞が存在するということは、その発生において肉腫特異的がん遺伝子に加えて、起始細胞特異的エピゲノム状態 (特異的遺伝子発現パターン) が重要であると考えられる。肉腫起始細胞の同定は各々の肉腫における中心のがんパスウェイの同定に役立つことが予想され、肉腫特異的分子生物学的治療の開発にも貢献することが期待される。

2. 研究の目的

細胞初期化技術を用いて肉腫細胞を iPS 細胞化し、様々な細胞へと再分化させることで、明細胞肉腫起始細胞の同定と発がんメカニズムの解析を行う。さらに、起始細胞特異的 EWS/ATF1 ターゲット遺伝子を同定し、肉腫特異的分子標的治療へと発展させることを試みる。

3. 研究の方法

【1】マウス EWS/ATF1 誘導性腫瘍細胞の iPS 細胞化と分化誘導

マウス EWS/ATF1 誘導性肉腫細胞株 (G1297) に *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *cMyc* の山中 4 因子をレトロウイルスベクターで導入して iPS 細胞作製する。多能性関連遺伝子の発現およびプロモーターの脱メチル化を realtime PCR 法、バイサルファイトシークエンスにて確認する。iPS 細胞の多能性をテラトーマアッセイ、キメラマウス形成能によって評価する。

【2】マウス EWS/ATF1 誘導性肉腫由来 iPS 細胞を用いた起始細胞同定

G1297 由来 iPS 細胞は発がんに必要なゲノム異常を有しているため、EWS/ATF1 発現を誘導した際は直ちに肉腫として振舞うことが予想される。

G1297 由来 iPS 細胞から得られたキメラマウスに Dox を投与して様々な細胞種において腫瘍化が見られるか否かを観察する。EWS/ATF1 により腫瘍化が見られる細胞種を組織学的に検討し、肉腫起源細胞を推定する。

さらに、推定起源細胞特異的な Cre マウスを導入、作製する。起源細胞特異的に EWS/ATF1 の発現を誘導することで、発がんが見られるか否かを確認する。

【3】明細胞肉腫発生メカニズム解析および特異的治療ターゲットの同定

起始細胞同定の後、起始細胞のマイクロアレイ解析を行う。EWS/ATF1 誘導性肉腫細胞株のマイクロアレイ解析結果と照合して、起始細胞特異的に発現する EWS/ATF1 ターゲット

遺伝子の候補リストを作成する。

さらに ChIP-sequencing により、候補遺伝子のプロモーター領域への EWS/ATF1 結合の有無を網羅的に評価し、起始細胞特異的な EWS/ATF1 のターゲット遺伝子と主要シグナルパスウェイの同定を試みる。

4. 研究成果

【1】マウス EWS/ATF1 誘導性腫瘍細胞の iPS 細胞化と分化誘導

G1297 に初期化 4 因子を導入したところ、EWS/ATF1 発現状態では iPS 細胞が得られなかった。Dox を OFF にして初期化 4 因子を導入したところ iPS 細胞様のコロニー形成を認め、複数のクローン単離し、拡大培養した。Realtime PCR、バイサルファイトシークエンスによって *Nanog*, *Oct3/4* 等の多能性マーカー発現の上昇と制御領域の脱メチル化を確認した。また、G1297 由来 iPS 様細胞は免疫不全マウスへの皮下移植によって三胚葉からなるテラトーマを形成し、胚盤胞移植によってキメラマウス形成が得られた。免疫染色によって G1297 由来 iPS 様細胞はキメラマウスの様々な臓器、器官に分化していることを確認した。

【2】マウス EWS/ATF1 誘導性肉腫由来 iPS 細胞を用いた起始細胞同定

G1297 由来 iPS 細胞から作製したキメラマウスに Dox を投与し、体内のあらゆる臓器に EWS/ATF1 発現を誘導したところ、極めて短期間で明細胞肉腫の好発部位である皮下及び筋膜周囲に特異的に肉腫が発生した。一方でその他の臓器では明らかな腫瘍形成を認めなかった。詳細な起始細胞を同定するため、想定される細胞種特異的な EWS/ATF1 発現を誘導してリネージトレーシングを行った。Rosa26-stop-EWS/ATF1, Rosa26-stop-rtTA/TetO-EWS/ATF1, Scx-CreERT2, Sox10-CreERT2, Tpp3-CreERT2, Mbp-CreERT2 マウスを作製、Tyr-CreERT, Mpz-Cre, Krox20-Cre マウスを導入した。これらの実験によって、EWS/ATF1 による肉腫形成は Mpz および Tpp3 リネージから認められた。詳細な起源細胞種については現在追加解析中である。

【3】明細胞肉腫発生メカニズム解析および特異的治療ターゲットの同定

G1297 由来 iPS 細胞は肉腫たりうるゲノム異常を有していることが確認できたが、非起源細胞に分化した場合、EWS/ATF1 によっても発がんしない現象 (細胞種特異的発がん) が認められた。この結果から、発がんにはがん遺伝子 (EWS/ATF1) + がんゲノム異常 (遺伝子変異や染色体異常) に加えて、細胞の分化状態 (エピゲノム) が重要であると考えた。その機序を証明すべく、非起源細胞 (線維芽細胞) と肉腫細胞 (G1297) に EWS/ATF1 を発現させ、EWS/ATF1 の DNA への結合状態を調査するため、次世代シークエンサーを用いて ChIP

シークエンスを行った EWS/ATF1 は Creb/Atf の binding モチーフに主に結合していたが、細胞種ごとに特異的な結合領域があることを同定した。

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)

[雑誌論文](計2件)

1. Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. Hino K, Horigome K, Nishio M, Komura S, Nagata S, Zhao C, Jin Y, Kawakami K, Yamada Y, Ohta A, Toguchida J, Ikeya M. J Clin Invest. 2017 Sep; 127(9):3339-3352.

2. An EWS-FLI1-Induced Osteosarcoma Model Unveiled a Crucial Role of Impaired Osteogenic Differentiation on Osteosarcoma Development.

Komura S, Semi K, Itakura F, Shibata H, Ohno T, Hotta A, Woltjen K, Yamamoto T, Akiyama H, Yamada Y.

Stem Cell Reports. 2016 Apr ;6(4):592-606.

[学会発表](計5件)

1. EWS/ATF1 誘導性肉腫細胞株由来 iPS 細胞を用いた発がん研究

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

2015年10月22-23日 第30回日本整形外科学会基礎学術集会

2. マウス EWS/FLI1 誘導性骨肉腫モデルが明らかとした肉腫発生に関わる重要事項 EWS/FLI1 と cancer genome がもたらす細胞分化異常

河村真吾, 蝉克憲, 板倉史晃, 柴田博史, 堀田秋津, Woltjen Knut, 山本拓也, 大野貴敏 秋山治彦, 山田泰広

2016年5月12-15日 第89回日本整形外科学会学術集会

3. マウス EWS/FLI1 誘導性骨肉腫モデルが明らかとした肉腫発生に関わる重要事項 EWS/FLI1 と cancer genome がもたらす細胞分化異常

河村真吾, 蝉克憲, 板倉史晃, 柴田博史, 堀田秋津, Woltjen Knut, 山本拓也, 大野貴敏 秋山治彦, 山田泰広

2016年7月14-15日 第49回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会

4. 治療薬開発を目指した EWS 融合遺伝子の解析

大野貴敏

2016年7月14-15日 第49回日本整形外科

学会骨・軟部腫瘍学術集会

5. EWS-FLI1 誘導性骨肉腫モデルによって骨分化障害が肉腫発生に重要な役割をもつことが明らかとなった

河村真吾, 蝉克憲, 板倉史晃, 柴田博史, 堀田秋津, Woltjen Knut, 山本拓也, 大野貴敏 秋山治彦, 山田泰広

2016年10月13-14日 第31回日本整形外科学会基礎学術集会

[図書](計2件)

1. 肉腫発生機構 - 肉腫特異的ながん遺伝子異常と発がんのエピゲノム制御

河村真吾, 秋山治彦

医学のあゆみ 254, 257-262, 2015.

2. がん幹細胞 - がん細胞の heterogeneity とその制御機構

河村真吾, 山田泰広

実験医学増刊 再生医療 2015 幹細胞と疾患 iPS 細胞の研究最前線 33. 203-208, 2015.

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 貴敏 (Ohno Takatoshi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 60281052

(2) 研究分担者

秋山 治彦 (Akiyama Haruhiko)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60402830

永野 昭仁 (Nagano Akihito)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60422721

(4)研究協力者

山田 泰広 (Yamada Yasuhiro)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
東京大学・医科学研究所・教授

河村 真吾 (Komura Shingo)
岐阜大学・医学部附属病院・助教