

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18398

研究課題名(和文) IDH変異による軟骨腫瘍発生メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of cartilage-specific IDH mutant mice for explication of underlying mechanism in chondrosarcoma development

研究代表者

平田 真(Hirata, Makoto)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50401071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨肉腫ではイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)1/IDH2の体細胞変異が高頻度に生じていることが知られている。本研究の目的は組織特異的に変異型IDHを発現するマウスを作成し、軟骨腫瘍発生、進展メカニズムを解明することである。軟骨組織特異的に変異型IDH1、IDH2を発現するマウスを作成し成長したマウスを解析したところ、変異マウスでは成長板軟骨の形態異常を認めた。この表現型は特にIDH2変異を発現するマウスにおいて顕著であった。さらにこの変異マウスにおいてp53-floxマウスとの掛けあわせにより軟骨組織でのp53の欠損も生じさせたが、生後3ヶ月までの経過では骨腫瘍の発生を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Central chondrosarcomas are known to harbor frequent mutation in IDH1 or IDH2 genes. The objective of the current study is to generate genetically-engineered mice expressing mutant IDH1 or IDH2 specifically in cartilage and to elucidate the underlying mechanism of chondrosarcoma occurrence and development. The mutant IDH1 or IDH2 mice exhibited dwarfism as compared to their wild-type littermate, with morphologically abnormal growth plate cartilage. Of note, the IDH2 mutant mice harbored severer phenotype in cartilage than the IDH1 mutant mice. The mutant IDH1 or IDH2 mice with p53 deficiency were generated by crossing with p53-flox mice. No clear evidence of bone tumor development has been observed until the age of three months old.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：軟骨腫瘍 イソクエン酸デヒドロゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

軟骨肉腫は骨原発の悪性腫瘍の中で骨肉腫に次いで2番目に発生頻度の高い悪性腫瘍であり、骨原発悪性腫瘍のおよそ20%を占める。骨肉腫の治療は、1970年代以降の多剤併用による全身化学療法の導入、そしてCT、MRIなどの画像診断技術の発達により、治療成績が飛躍的に向上し、5年生存率は70年代の10%台から現在は約70%にまで高まった。しかし、軟骨肉腫においては、他の腫瘍領域と同様に様々な基礎研究、臨床研究が行われているにもかかわらず、治療成績の向上に繋がる革新的な治療法の進歩はなく、組織学的悪性度が低いGrade1の場合5年生存率は90%程度であるが、悪性度の高いGrade2、Grade3では50%程度と低い。軟骨肉腫は化学療法、放射線療法は一般的には無効であり、治療としては未だに外科的切除のみに頼らざるを得ないのが現状である。このため、その予後は局所での再発コントロールや転移の有無等により大きく左右される。そのため、切除不能な局所再発を生じた症例や多発転移を生じた症例に対しては、緩和医療のみが行われているにすぎない。悪性腫瘍の治療法として期待され、他の癌領域では一定の成果を上げている分子標的薬も、軟骨肉腫では明らかな治療効果は報告されておらず、治療成績の向上のためにはこれまでにない新たな展開が期待されている。

近年軟骨肉腫に関連する遺伝子としてイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) 1、2 の体細胞変異が報告された [J Pathol. 2011; 224: 334-343]。IDH1、IDH2 はそれぞれ主に細胞質内、ミトコンドリア内に存在し、イソクエン酸を α -ケトグルタル酸に変換することでTCAサイクルを促進している分子であり、変異型IDHの存在により腫瘍の代謝経路が変化することが示唆されている。

実際、このIDH1、IDH2変異は急性骨髄球性白血病、グリオーマなど他の悪性腫瘍にも関連性があり、これらの腫瘍においてはIDH1、IDH2変異が新たな代謝物2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)を産生し、この代謝物がDNAのメチル化やHIF1経路の活性化を促進することで腫瘍原性を有していることが知られている。しかし、軟骨腫瘍においてはIDH1、IDH2変異によりDNAメチル化の状態が変化すると報告はあるが、その詳細なメカニズムは未だに解明されていない。内軟骨腫においてもIDH1、2の体細胞変異が存在すること、内軟骨腫の多発する内軟骨腫症においてはその頻度はおよそ80%から90%と高率であることを考慮すると、IDH1、IDH2変異は軟骨腫瘍形成において早い段階で生じており、軟骨腫瘍発生に関与している可能性が高いことが考えられている。

2. 研究の目的

本研究では組織特異的IDH1、IDH2変異発現マウスを作製し、IDH変異による軟骨腫瘍発生メカニズムを解明すること、さらには変

異型IDH1、IDH2の軟骨肉腫における治療標的としての可能性について変異型IDH阻害剤を用いた検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的は、変異型IDHによる軟骨腫瘍発生・進展メカニズムを検討すること、軟骨肉腫における変異型IDHの治療標的としての可能性を検討することである。これを達成するため、組織特異的に変異型IDH1、IDH2を発現するマウス、p53遺伝子組織特異的欠損マウス、変異型IDH特異的阻害剤を用いて以下の計画を進めていく。

(1) 軟骨組織特異的IDH1、IDH2変異発現マウスの作製とその解析

組織特異的IDH1、IDH2変異発現マウス [ROSA26-IDH1(R132C, GFP), ROSA26-IDH2(R172S, GFP)]を用いてCol2a1-Creトランスジェニックマウスとの掛け合わせを行い、軟骨組織特異的にIDH1、IDH2を発現するマウスを作製する。

(2) p53遺伝子欠損マウスとの掛け合わせによるマウス軟骨腫瘍形成モデルへの影響の検討

p53遺伝子欠損マウスとの掛け合わせを行い、セカンドヒットとしてp53遺伝子機能欠損が加わることにより軟骨腫瘍形成にどのような影響が生ずるか、良性の内軟骨腫を発生母地とした二次性軟骨肉腫が発生するか否かを検討する。

(3) 変異型IDH阻害剤による軟骨腫瘍抑制効果の検討

これまでに変異型IDH1、2各々に対する阻害剤が報告されており、同薬剤はマウス腹腔内への投与が可能である。本薬剤を(1)で作成したマウスに生後4週齢より3-4週間投与する。

4. 研究成果

(1) 軟骨組織特異的IDH1、IDH2変異発現マウスの作製とその解析

組織特異的にIDH1もしくはIDH2変異を発現するマウス [ROSA26-IDH1(R132C, GFP) および ROSA26-IDH2(R172S, GFP)] を作製し、このマウスを用いてCol2a1-Creトランスジェニックマウスとの掛け合わせを行い、軟骨組織特異的に変異型のIDH1、IDH2を発現するマウス(以下、IDH1、IDH2変異マウス)を作製した。IDH1、IDH2変異マウスにおいて、胎児期に軟骨組織を抽出し2HGの濃度を測定したところ、いずれにおいても変異型においてコントロール群と比べて有意に2HGレベルが上昇していることを確認した(図1)。

さらに各成長段階でのマウス四肢成長板を組織学的に評価したところ、IDH1、IDH2変異マウスいずれにおいても対象と比べ、成長

板軟骨周囲に複数の内軟骨腫様の軟骨塊を認め、成長板の軟骨細胞もカラム構造の破綻、分化異常を生じていることが明らかとなった。また、その表現型は IDH2 変異マウスにおいてより顕著であった。

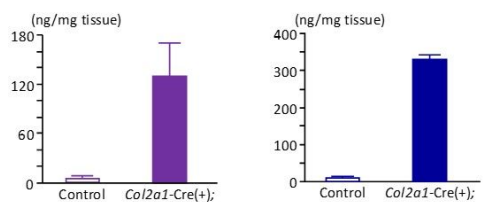


図1. IDH1、IDH2変異マウス軟骨組織におけるD-2HGレベル

(2) p53 遺伝子欠損マウスとの掛け合わせによるマウス軟骨腫瘍形成モデルへの影響の検討

IDH1、IDH2 変異マウスにさらに p53-flox マウスを掛け合わせ、軟骨組織特異的に変異型 IDH1、IDH2 を発現し p53 遺伝子の欠損したマウスを作製した。IDH2 変異 p53 遺伝子欠損マウスでは、一部のマウスは離乳前に死亡した。成体に至ったマウスにおいては約 3 ヶ月齢までフォローしたが、成長障害を認めるものの明らかな骨腫瘍の形成を認めなかった。

(3) 変異型 IDH 阻害剤による軟骨腫瘍抑制効果の検討

商業的に入手可能な変異型 IDH1 に対する阻害剤を IDH1 変異マウスに腹腔内投与しその腫瘍抑制効果を確認した。(1)の解析で確認した内軟骨腫様腫瘍塊の明らかな縮小は認めなかった。

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 4 件)

1. Kobayashi H, Chang SH, Mori D, Itoh S, Hirata M, Hosaka Y, Taniguchi Y, Okada K, Mori Y, Yano F, Chung UI, Akiyama H, Kawaguchi H, Tanaka S, Saito T. Biphasic regulation of chondrocytes by Relα through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. Nat Commun. 2016;7:13336. doi: 10.1038/ncomms13336.
2. Sato S, Tang YJ, Wei Q, Hirata M, Weng A, Han I, Okawa A, Takeda S, Whetstone H, Nadesan P, Kirsch DG, Wunder JS, Alman BA. Mesenchymal Tumors Can Derive from Ng2/Cspg4-Expressing Pericytes with β -Catenin Modulating the Neoplastic Phenotype. Cell Rep. 2016;16:917-27. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.058.

3. 平田 真、松田 浩一. 骨軟部腫瘍のゲノム解析 整形・災害外科 2016; 59(10): 1345-52
4. Wei Q, Tang Y, Voisin V, Sato S, Hirata M, Whetstone H, Ailles L, Han I, Bader GD, Wunder J, Alman BA. Identification of CD146 as a marker enriched for tumor-propagating capacity reveals targetable pathways in primary human sarcoma. Oncotarget. 2015;6:40283-94 doi: 10.18632/oncotarget.5375.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Hirata M, Gokgoz N, Wei Q, Sato S, Tang YJ, Andrulis IL, Alman BA, Wunder JS. D-2HG levels and IDH mutation type correlate with disease free survival in chondrosarcoma. CTOS2016 Annual Meeting Nov9-12, 2016, Lisbon
2. Sato S, Tang YJ, Wei Q, Hirata M, Han I, Takeda S, Kirsch D, Wunder JS, Alman BA. Mesenchymal tumors can derive from Ng2-expressing pericytes with β -catenin modulating the neoplastic phenotype. CTOS2016 Annual Meeting Nov9-12, 2016, Lisbon
3. Hirata M, Matsuda K. Establishment of Japanese Sarcoma Genome Consortium (JSGS) for genomic analysis. CTOS2016 Annual Meeting Nov9-12, 2016, Lisbon
4. 平田 真、浅野 尚文、片山 琴絵、津田 祐輔、元井 亨、五嶋 孝博、岩本 幸英、小田 義直、岩田 慎太郎、西田 佳弘、平賀 博明、比留間 徹、小林 寛、荒木 信人、河野 博隆、中川 英刀、井元 清哉、宮野 悟、山口 類、市川 仁、松田 浩一、Japan Sarcoma Genome Consortium. 骨軟部腫瘍のゲノム解析 ~ 脱分化型脂肪肉腫の全エクソシーケンシング解析 ~. 第 13 回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会 春のセミナー 2016.4.9. 伊豆の国
5. 平田 真, 松田 浩一, Benjamin A. Alman, Jay S. Wunder. 軟骨肉腫における IDH1/2 変異による層別化臨床情報解析. 第 14 回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会 2016.10.29. 東京

〔図書〕(計 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 真 (Hirata, Makoto)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：50401071

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

Alman, Benjamin A.