

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07192

研究課題名(和文) ヒト肉腫自然発症モデルを利用した血中悪性化指標マーカーの探索

研究課題名(英文) Study on novel biomarkers using human pluripotent stem cell derived sarcoma model

研究代表者

山田 大祐 (Yamada, Dasiuke)

岡山大学・医歯薬学域・研究准教授

研究者番号：50733680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肉腫モデルを用いた先行研究により、肢芽間葉系細胞系譜の細胞がユーイング肉腫(EwS)の起源となることが示されているが、ヒト肢芽間葉系細胞を用いたEwSモデルに関してはこれまで樹立されていなかった。本研究では、EwSの発症/悪性化機構の解明を行うために、ヒト多能性幹細胞から誘導した拡大培養が可能な肢芽間葉系細胞(Expandable limb bud-like mesenchymal cells, ExpLBM)を用いた肉腫モデルの構築を検討した。ExpLBM由来骨原基において、EWS/FLI1の発現誘導によりユーイング肉腫マーカー陽性な新たなEwSモデルの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EwSは小児や若年者といったAYA世代での発症例が多く、骨原発が約8割を占める少円形細胞腫瘍である。集学的治療により遠隔転移がない症例の5年生存率は約7割に向上しているが、再発頻度も高く、遠隔転移を有する症例では生存率は2割以下である。しかし、年間症例数が非常に少ない希少がんという性質上、多数の良質な臨床検体を収集し解析を行うのも困難であることから、安定供給が可能かつ肉腫組織で確認されている表現型(組織像、遺伝子発現プロファイルなど)及び遺伝子変異を模倣している腫瘍モデルの開発が求められている。したがって、我々が開発した肉腫モデルは極めて有用な研究ツールになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although previous studies using mouse sarcoma models have shown that limb bud mesenchymal cell lineage cells are the origin of Ewing's sarcoma (EwS), no EwS models using human limb bud mesenchymal cells has been established. In this study, to elucidate the pathogenesis and malignant transformation mechanism of EwS, we established a novel sarcoma model using human pluripotent stem cell (hPSC) derived expandable limb bud-like mesenchymal cells (ExpLBM). When the expression of EWS/FLI1 was induced in ExpLBM-derived bone primordia, tumor that could be stained with EwS markers developed, indicating that a novel hPSC-derived EwS model has been established.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ヒト多能性幹細胞 希少がん ユーイング肉腫 病態モデリング がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ユーイング肉腫は小児や若年者といった AYA 世代での発症例が多い希少がんの一種である。遺伝学的に約 85% 弱の患者が融合遺伝子 EWS/FLI1 を有しており、約 10% では EWS/FLI1 と TP53 の遺伝子変異の両方が観察されている (JCO Precis Oncol. 2022)。限局例の 5 年全生存率 (OS) は約 75% と改善されてはいるが、再発・転移を伴う患者の予後に関してはここ数十年改善されていない点は解決すべき課題の一つである (J Clin Med 2021)。ユーイング肉腫は骨盤、大腿骨、脛骨、肋骨、胸壁、臀筋、胸膜腔、頸筋などの骨および軟部組織での発症が認められている (Nat Rev Dis Primers. 2018)、約 35% は肢芽間葉系細胞系譜に由来する遠位骨格で発生し (Radiographics. 2013)、同系譜の細胞がユーイング肉腫の起源である可能性が報告されている (Cancer Res. 2008 / J Clin Invest. 2014 / Oncogene. 2015)。しかし、トランスジェニックマウスやヒト多能性幹細胞を用いた同腫瘍のモデル化は再現性の点を含めて未だに困難であり (Plos one. 2011, Oncogene. 2016, Am J Transl Res. 2021)、さらに希少がんという性質上、多数の臨床検体を用いた詳細な解析も困難であることから、新規治療薬を開発する上で必須となる起原細胞並びに発症/増悪化機構に関する学術的知見が不足している。

## 2. 研究の目的

これまでに、我々はヒト多能性幹細胞から拡大培養が可能な肢芽間葉系細胞 (Explantable limb bud mesenchymal cells, ExpLBM) を誘導する技術を開発することに成功しており (Nat Biomed Eng. 2021)、同細胞はヒトの四肢発生を模倣して作成されていることから、骨肉腫やユーイング肉腫の様に肢芽間葉系細胞系譜の細胞に由来する肉腫の病態モデルを樹立するには適した細胞源であると考えられる。そこで本研究では、ExpLBM 由来軟骨オルガノイドを用いた肉腫モデルの構築を目指した。

## 3. 研究の方法

### 1. TP53 欠損ヒト iPS 細胞株の樹立

Addgene より入手した pX459 ベクターに TP53 に対する gRNA 配列を組み込んだ後、NEPA21 (ニッパジーン) を用いたエレクトロポレーションにてヒト iPS 細胞株 414C2 に導入した。プラスミド導入後に 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のピューロマイシン処理を 3 日間行うことでプラスミドが導入された細胞を選別し、次に 10  $\mu\text{M}$  Nutlin3a で 3 日間処理を行うことで TP53 の機能欠損が生じた細胞の選別を行った。その後、シングルコロニーピックアップを行い、0.1  $\mu\text{M}$  のドキシソルピシン処理によって P21 の発現誘導が生じないクローンを選別した。

### 2. ドキシサイクリン誘導的 3xFLAG-EWS-FLI1 発現系の構築

Addgene より入手した piggyBAC 発現ベクターである PB-TAC-ERP2 に ThermoFisher にて人工遺伝子合成した pDONR221-3xFLAG-EWS-FLI1 を LR 反応にて導入した。その後、エレクトロポレーションにて 414C2 (野生型) あるいは 414C2 TP53KO 株に PB-TAC-ERP2-3xFLAG-EWS-FLI1 を導入し、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のピューロマイシン処理を 3 日間行うことでドキシサイクリン誘導的 3xFLAG-EWS-FLI1 の発現が可能な細胞株を樹立した。

### 3. ExpLBM の誘導と ExpLBM 由来軟骨オルガノイドの作成

ExpLBM ならびに ExpLBM 由来軟骨オルガノイドに関しては、以前に我々が報告した論文に記載されている手法を用いて誘導を行った (Nat. Biomed. Eng. 2021) 414C2 (野生型) / PB-TAC-ERP2-3xFLAG-EWS-FLI1 ならびに 414C2 TP53KO / PB-TAC-ERP2-3xFLAG-EWS-FLI1 株を原始線条、側板中胚葉、肢芽間葉系細胞へと分化誘導した後、肢芽間葉系細胞の継続継代を行うことで 414C2 (野生型) / PB-TAC-ERP2-3xFLAG-EWS-FLI1 ならびに 414C2 TP53KO / PB-TAC-ERP2-3xFLAG-EWS-FLI1 由来 ExpLBM を樹立した。

### 4. NOD-SCID マウスへの ExpLBM 由来軟骨オルガノイドの皮下移植実験

CharlesRiver より購入した NOD-SCID マウス (4 週齢、雌) にイソフルランの吸入麻酔を行った後、側腹部の切開し ExpLBM 由来軟骨オルガノイドを移植した後に切開部位を縫合した。その後、0.1  $\text{mg}/\text{ml}$  ドキシサイクリンと 1% スクロースの飲水投与を行い、投与開始 3 ヶ月目に頸椎脱臼によって NOD-SCID マウスを安楽死させた。摘出した組織は 4% PFA にて固定し、パラフィン包埋後に組織切片 (厚み 0.4  $\mu\text{m}$ ) を作成し組織学的解析を行った。なお、本研究にて行った動物実験に関しては、岡山大学動物実験委員会の承認を得て行っている。

## 4. 研究成果

### 1. TP53 欠損による ExpLBM への影響

TP53 の機能が消失した ExpLBM を作成するために、ヒト iPS 細胞株である 414C2 に TP53 の各 isoform 共通エクソンを認識するように設計した CRISPR-Cas9 の系を導入した後、MDM2 阻害剤である Nutlin3a で細胞を処理することで TP53 の発現増加で細胞死が生じない細胞、つまり TP53 の機能が欠損した 414C2 株の樹立を行った(図 1)。野生型と TP53 欠損株から ExpLBM を誘導した後、増殖性を WST-8 アッセイにて評価した結果、TP53 欠損によって増殖性が向上することが分かった。また、0.1  $\mu\text{M}$  のドキソルピシンで ExpLBM を 1 日処理したところ、TP53 欠損株では P21 の発現誘導が認められなかっただけでなく、ドキソルピシン誘導的な細胞死に関しても抵抗性が認められた。ウエスタンブロットにて TP53 が両株において検出はされているが、これらの結果からフレームシフト変異による TP53 の機能欠損が生じたことが考えられる。現在、フレームシフト変異を確認するためのゲノム配列解析を行っている。

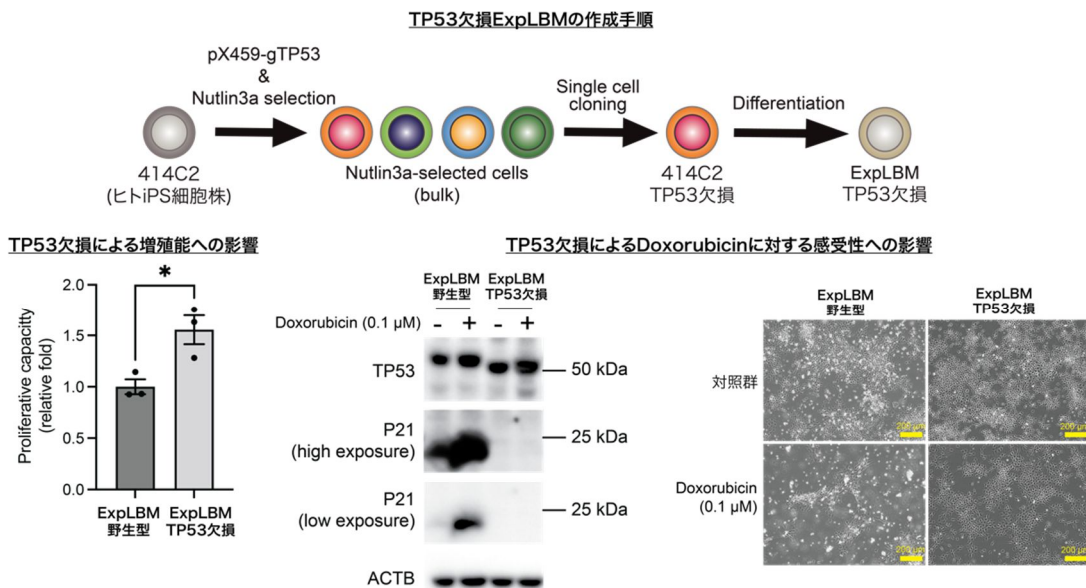


図 1. TP53 欠損 ExpLBM の作成手順

TP53 欠損ヒト iPS 細胞株を樹立した後、ExpLBM への分化誘導を行い、増殖性とドキソルピシンに対する感受性への影響を解析した。TP53 欠損により、ExpLBM の増殖能は向上し、ドキソルピシンに対する感受性も低下することが見出された。

### 2. ヒト iPS 細胞由来ユーイング肉腫モデルを用いた腫瘍起源細胞の同定

ドキシサイクリンによる 3xFLAG-EWS-FLI1 の発現誘導が確認された 414C2(野生型)/PB-TAC-ERP2-3xFLAG-EWS-FLI1 ならびに 414C2 TP53KO/ PB-TAC-ERP2-3xFLAG-EWS-FLI1 由来 ExpLBM から軟骨オルガノイドを作成した後、NOD-SCID マウスに皮下移植を行った結果、ドキシサイクリン投与群でヒトユーイング肉腫と類似した形態を有する細胞が観察される腫瘍の形成が確認された(図 2)。腫瘍に関しては野生型と TP53 欠損株の両株で認められたが、TP53 欠損株の方が腫瘍の形成速度は早かった。また、腫瘍は軟骨組織を覆う表在細胞から形成されている印象があることから、現在、空間トランスクリプトーム解析 VISUM と single RNAseq による解析を行い、腫瘍の起源と悪性化機構の解明を目指して実験を行っている。

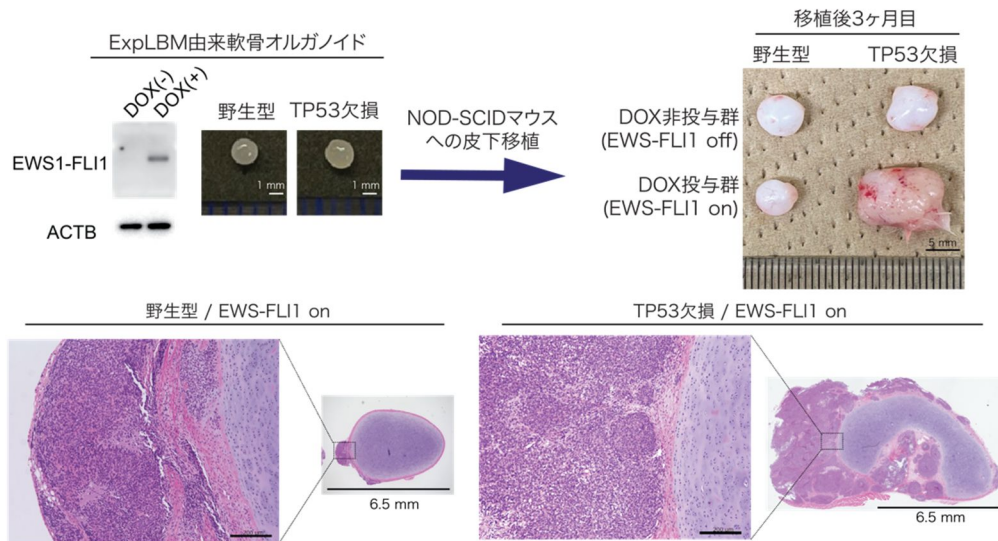


図 2 . ExpLBM 由来軟骨オルガノイドを用いた肉腫モデル

ドキシサイクリン誘導的な 3xFLAG-EWS-FLI1 の発現系を組み込んだ野生型あるいは TP53 欠損型の ExpLBM 由来軟骨オルガノイドを作成し、NOD-SCID マウスへの皮下移植後にドキシサイクリンの投与を行った。野生と TP53 欠損株の両株で腫瘍の形成が認められたが、TP53 欠損株では形成速度が早い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Takao Tomoka, Takihira Shota, Yoshida Aki, Kawai Shunsuke, Miura Akihiro, Ming Lu, Yoshitomi Hiroyuki, Gozu Mai, Okamoto Kumi, Hojo Hironori, Kusaka Naoyuki, Iwai Ryosuke, Nakata Eiji, Ozaki Toshifumi, Toguchida Junya, Takarada Takeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Induction and expansion of human PRRX1+ limb-bud-like mesenchymal cells from pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 926 ~ 940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-021-00778-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Akihiro, Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Tomida Shuta, Shimizu Dai, Jiang Yan, Takao Tomoka, Yamamoto Hiromasa, Suzawa Ken, Shien Kazuhiko, Yamane Masaomi, Sakaguchi Masakiyo, Toyooka Shinichi, Takarada Takeshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Oncogenic potential of human pluripotent stem cell derived lung organoids with overexpression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1593 ~ 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Joko Ryoji, Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Yoshida Aki, Takihira Shota, Takao Tomoka, Lu Ming, Sato Kohei, Ito Tatsuo, Kunisada Toshiyuki, Nakata Eiji, Ozaki Toshifumi, Takarada Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 PRRX1 promotes malignant properties in human osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100960 ~ 100960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahira Shota, Yamada Daisuke, Osone Tatsunori, Takao Tomoka, Sakaguchi Masakiyo, Hakozaiki Michiyuki, Itano Takuto, Nakata Eiji, Fujiwara Tomohiro, Kunisada Toshiyuki, Ozaki Toshifumi, Takarada Takeshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 PRRX1-TOP2A interaction is a malignancy-promoting factor in human malignant peripheral nerve sheath tumours	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-024-02632-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山田大祐、高尾知佳、中村正裕、Ming Lu、戸口田淳也、宝田剛志
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞からの軟骨前駆細胞の誘導と、その拡大培養方法の開発
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田大祐、高尾知佳、中村正裕、Ming Lu、戸口田淳也、宝田剛志
2. 発表標題 骨系統疾患特異的iPS由来ヒト肢芽間葉系細胞を用いたハイスループット薬剤スクリーニングシステムの構築
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田大祐、高尾知佳、中村正裕、Ming Lu、戸口田淳也、宝田剛志
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞からの軟骨前駆細胞の誘導と、その拡大培養方法の開発
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒト多能性幹細胞から手足の元である肢芽間葉系細胞の誘導・拡大培養に成功  
[https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release\\_id866.html](https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id866.html)  
ヒト多能性幹細胞から手足の元である肢芽間葉系細胞の誘導・拡大培養に成功  
[https://www.amed.go.jp/news/release\\_20210810.html](https://www.amed.go.jp/news/release_20210810.html)

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中田 英二  (Nakata Eiji)  (10649304)	岡山大学・医歯薬学域・准教授   (15301)	
研究分担者	宝田 剛志  (Tkarada Takeshi)  (30377428)	岡山大学・医歯薬学域・教授   (15301)	
研究分担者	高尾 知佳  (Takao Tomoka)  (40612429)	岡山大学・医歯薬学域・講師   (15301)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------