

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592229

研究課題名(和文) 悪性軟部腫瘍に対する新たな分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) EWS/ATF1 activates Fos and induces soft tissue sarcomas from neural crest-derived cells

研究代表者

大野 貴敏 (Ohno, Takatoshi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60281052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：明細胞肉腫の発生における、EWS/ATF1融合遺伝子の役割を解明する目的で、EWS/ATF1トランスジェニックマウスを用いた腫瘍モデルを作製した。EWS/ATF1発現マウスの全例で、全身の皮下組織に多発軟部腫瘍が発生した。その組織像は明細胞肉腫と類似した特徴を有していた。EWS/ATF1により発生する腫瘍の起源を検討したところ、神経提由来の細胞であることが明らかになった。EWS/ATF1の発現誘導によって、Fosの発現量が著明に増加しており、ヒト明細胞肉腫においてもFOSの発現抑制が抗腫瘍効果を示した事実から、FOSは明細胞肉腫の分子標的治療の重要な標的候補になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Clear cell sarcoma (CCS) is characterized by t(12; 22) translocation, leading to the expression of a chimeric EWS/ATF1 fusion gene. However, little is known about the mechanisms underlying how EWS/ATF1 is involved in the development of CCSs. We generated EWS/ATF1-inducible mice, and examined the effects of EWS/ATF1 expression in adult cells. We show that the forced expression of EWS/ATF1 results in the development of EWS/ATF1-dependent sarcomas in mice. The histology of EWS/ATF1-induced sarcomas resembles that of CCSs and EWS/ATF1-induced tumor cells express CCS-markers, such as Mitf. A lineage tracing experiment revealed that such sarcomas are derived from neural crest-lineage cells. Finally, we found that EWS/ATF1 directly induces Fos in an ERK-independent manner, and demonstrated that the increased Fos expression is important for the active cell proliferations. Our results indicate that FOS could be a promising therapeutic target for the treatment of EWS/ATF1-related sarcomas.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：明細胞肉腫 融合遺伝子 EWS-ATF1 Fos 分子標的治療 トランスジェニックマウス 軟部肉腫

1. 研究開始当初の背景

明細胞肉腫では 12 番染色体と 22 番染色体の転座による融合遺伝子 *EWS/ATF1* が発現しており、融合蛋白質 *EWS/ATF1* が異常な転写活性を引き起こすことで、発がんを誘発していると考えられている。しかしながら明細胞肉腫の発生における、*EWS/ATF1* 融合遺伝子の詳細な役割に関しては未だ解明されていない。そこで本研究では *EWS/ATF1* トランスジェニックマウスを用いた腫瘍モデルの作製を試み、腫瘍発生のメカニズムを検証した。

2. 研究の目的

明細胞肉腫の発生における、*EWS/ATF1* 融合遺伝子の役割を解明する。

3. 研究の方法

ドキシサイクリンにより *EWS/ATF1* 融合遺伝子を発現誘導できるトランスジェニックマウス(以下 *EWS/ATF1* 発現誘導マウス)を作製した。はじめに *EWS/ATF1* 発現誘導マウスから採取したマウス胎児線維芽細胞(MEF)に *EWS/ATF1* を発現させて、*EWS/ATF1* の MEF 増殖能への影響を評価した。

EWS/ATF1 発現誘導マウスにおける腫瘍形成を評価し、発生した腫瘍の組織学的検討を行った。

胎生期において神経提に特異的に発現する遺伝子である *Wnt1*, *Mpz* を用い、神経提に由来する細胞をそれぞれ - ガラクトシダーゼ, EYFP で標識するレポーター遺伝子を *EWS/ATF1* 発現誘導マウスに組み込み、*EWS/ATF1* により発生した腫瘍の由来となる細胞を検討した。*EWS/ATF1* 発現誘導マウスに発生した腫瘍から樹立した肉腫細胞株(以下 G1297, G1169)における *EWS/ATF1* の発現と腫瘍細胞増殖能を評価した。G1297 をヌードマウス皮下に移植し、*EWS/ATF1* の発現と腫瘍形成能の関係を評価した。

G1297 における *EWS/ATF1* の発現量を変化させ、前後の遺伝子発現パターンの違いをマイクロアレイで比較すること

で、*EWS/ATF1* の標的遺伝子について検討した。

EWS/ATF1 の標的遺伝子として *Fos* に着目し、*EWS/ATF1* 発現誘導マウスに発生した腫瘍における *EWS/ATF1* と *Fos* の発現量を評価した。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて *EWS/ATF1* による *Fos* のプロモーター活性を評価した。さらにクロマチン免疫沈降法にて *Fos* のプロモーター領域への *EWS/ATF1* の直接的結合の有無を評価した。

EWS/ATF1 発現腫瘍の増殖における *Fos* の機能を検証するため、G1297 に *Fos* を標的とした siRNA を投与し細胞増殖能を評価した。また G1297 に *Fos* 発現ベクターを形質導入した *Fos* 過剰発現細胞株を樹立して、細胞増殖能を評価した。さらに *EWS/ATF1* を発現しているヒト明細胞肉腫細胞株 (MP-CCS-SY, KAS) に *FOS* に対する siRNA を投与し、細胞増殖能を評価した。

4. 研究成果

EWS/ATF1 発現誘導 MEF は、*EWS/ATF1* の発現により細胞増殖が抑制された。

EWS/ATF1 発現マウスの全例で、全身の皮下組織に多発軟部腫瘍が発生した。

一方 *EWS/ATF1* 非発現群では腫瘍形成は認めなかった。組織学的には、明瞭な核小体と淡明な細胞質からなる腫瘍細胞が筋肉に接して増殖し明細胞肉腫と類似した特徴を有していた。免疫組織染色では神経提由来細胞で発現が認められる S100, Sox10, Mitf が腫瘍細胞で陽性であった。

レポーター遺伝子を組み込んだマウスに発生した腫瘍は全例で X-gal 染色陽性、または EYFP 陽性であったことから、*EWS/ATF1* により発生する腫瘍の起源は神経提由来の細胞であることが明らかになった。

G1297 および G1169 の細胞増殖能は *EWS/ATF1* の発現量依存的に増加した。

また G1297 細胞を皮下に移植したヌードマウスにおいて、ドキシサイクリンの投与により *EWS/ATF1* を発現誘導した群では全例に腫瘍が発生したが、ドキシサイクリン非投与群では腫瘍形成はみられなかった。

G1297 のマイクロアレイ解析では、*EWS/ATF1* の発現誘導によって、細胞増殖の制御遺伝子である *Fos* の発現量が著明に増加していた。

Fos のプロモーター解析にて、*EWS/ATF1* が *Fos* プロモーター上の cAMP-responsive element (CRE) に直接結合して *Fos* の転写を活性化していた。*Fos* を siRNA により抑制すると G1297 の細胞増殖能は抑制された。一方 G1297 に *Fos* を恒常的に発現させた細胞株では、*EWS/ATF1* の発現を停止させても細胞増殖能は維持された。また、ヒト明細胞肉腫細胞株 (MP-CCS-SY, KAS) の増殖能も *FOS* の siRNA により抑制された。

【 考察 】

今回、*EWS/ATF1* 発現誘導マウスの解析から、*EWS/ATF1* はマウスに軟部腫瘍を発生させ、かつ、その増殖と維持に必須であることが明らかとなった。*EWS/ATF1* により発生した腫瘍の起源は一樣に神経提由来の細胞であったこと、*EWS/ATF1* を強制発現させた MEF では増殖が抑制されたこと、*EWS/ATF1* 発現誘導マウスの皮下組織以外では腫瘍が発生しなかったことより、*EWS/ATF1* による発がん性形質転換は神経提由来細胞特異的に生じることが示唆された。さらに *EWS/ATF1* 発現腫瘍の増殖には、*EWS/ATF1* による *Fos* の転写の活性化が関与しており、ヒト明細胞肉腫においても *FOS* の発現抑制が抗腫瘍効果を示した事実から、*FOS* は明細胞肉腫の分子標的治療の重要な標的候補になり得ることが示唆された。

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 3 件)

Tsugita M, Yamada N, Noguch S, Yamada K, Moritake H, Shimizu K, Akao Y, Ohno T: Ewing Sarcoma Cells Secrete

EWS/Fli-1 Fusion mRNA via Microvesicles. PLoS ONE Oct 4;8 (10):e77416.doi:10.1371/journal.pone.0077416, 2013. 査読有

Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe, A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida J, Shimizu K, Hara A, Yamada Y : *EWS/ATF1 activates Fos and induces soft tissue sarcomas from neural crest-derived cells*. J Clinical Investigation 123(2):600-10, 2013. 査読有

Matsushashi A, Ohno T, Kimura M, Hara A, Saio M, Nagano A, Kawai G, Saitou M, Takigami I, Yamada K, Okano Y, Shimizu K : *Growth Suppression and Mitotic Defect Induced by JNJ-7706621, an Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases and Aurora Kinases*. Curr Cancer Drug Targets. 12, 625-639, 2012. 査読有

〔 学会発表 〕 (計 9 件)

大野貴敏: 小児の骨軟部腫瘍 第 12 回東海小児整形外科研修会 2014 年 12 月 21 日 大正富山製薬会議室 (愛知県・名古屋市)

Takatoshi Ohno: Minimized surgery for patients with malignant bone tumor treated by continuous intra-arterial infusion chemotherapy. Symposium: Advances in tumor surgery. The 24th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium. 2014.6.5-6 Hakone Prince Hotel (Hakone, Kanagawa, Japan)

次田雅典、山田名美、野口俊助、山田一成、盛武 浩、清水克時、赤尾幸博、大野貴敏、秋山治彦: Ewing 肉腫細胞は、融合遺伝子 *EWS/Fli-1* の mRNA を microvesicle 中に分泌している 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9-10 日、城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市)

河村真吾、大野貴敏、秋山治彦、山田一成、戸口田淳也、山田泰広: *EWS/ATF1* 誘導性肉腫細胞株由来 iPS 細胞を用いたがん

研究 .

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
2014 年 10 月 9-10 日, 城山観光ホテル(鹿
児島県・鹿児島市)

河村真吾、大野貴敏、秋山治彦、山田泰
広、戸口田淳也、山田一成: EWS/ATF1 誘
導性肉腫細胞株由来 iPS 細胞作成の試み
シンポジウム 第 47 回日本整形外科学会
骨・軟部腫瘍学術集会 2014 年 7 月. 17-18
日、大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

山田一成、大野貴敏、山田泰広、原 明、
清水克時: EWS/ATF1 は Fos の転写を活性し
て細胞増殖に関与する. 第 46 回日本整形
外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2013 年 7 月
11 日、東京ドームホテル(東京都・文京区)

山田一成、大野貴敏、永野昭仁、川井 豪、
瀧上伊織、松橋 彩、齋藤 満、次田雅典、
原 明、山田泰広、清水克時: EWS/ATF1
の発現は軟部肉腫の発生を誘導する、第 45
回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
2012 年 7 月 14 日、東京国際フォーラム(東
京都・千代田区)

Yamada K, Ohno T, Nagano A, Takigami I,
Matsuhashi A, Saitou M, Tsugita M, Akira
H, Yamada Y, Shimizu K : Forced
expression of EWS-ATF1 induces soft
tissue sarcomas. Orthopaedic Research
Society 2012 Annual Meeting. 2012.2.4-7,
San Francisco, California, USA.

Ohno T, Oshima K, Nagano A,
Nishimoto Y, Shimizu K: Minimized
surgery for patients with malignant
bone tumor treated by preoperative
continuous intra-arterial infusion
chemotherapy. 15th Meeting of
Japanese-French Orthopaedic Society.
2012.9.22 東京ドームホテル (東京
都・文京区)

{ 図書 } (計 1 件)

大野貴敏: 運動器診療 最新ガイドラ
イン、II .病態・疾患別のガイドライン、
骨腫瘍 Ewing 肉腫の診断・治療指針。中
村耕三 編集、p286-288, 2012 年、総合医
学社、東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大野 貴敏 (OHNO Takatoshi)

岐阜大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 60281052