

News Release



京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
京都大学 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS)
日本医療研究開発機構(AMED)

iPS 細胞を用いた新たな腫瘍モデルにより、 肉腫形成メカニズムの一端を解明

ポイント

- がん遺伝子 *EWS-FLI1* の発現により増殖する細胞を用いて肉腫モデルマウスを作製した
- 肉腫モデルマウスの腫瘍細胞から iPS 細胞を作製した
- 肉腫形成には、*EWS-FLI1* の発現に加え、骨分化の阻害が重要な役割を果たしていることが分かった

1. 要旨

河村 真吾 大学院生(京都大学 CiRA/岐阜大学 大学院医学系研究科)、山田 泰広 教授(京都大学 CiRA/iCeMS)らの研究グループは、ドキシサイクリン(Dox)^{注1}誘導型 *EWS-FLI1*^{注2}発現システムを用いて、*EWS-FLI1* の遺伝子発現が調節可能な肉腫モデルマウスを作製しました。さらにマウスの肉腫から作製した iPS 細胞を用いることにより、*EWS-FLI1* 遺伝子の発現に加え、成熟した骨への分化の阻害が肉腫形成に重要な役割を果たしていることを見出しました。今後、このようながん化モデルを用いて、抗がん剤の開発に貢献することが期待されます。

この研究成果は 2016 年 3 月 17 日正午(米国東部時間)に米国科学誌「Stem Cell Reports」で公開されました。

2. 研究の背景

肉腫は骨や筋肉に発生するがんで、患者さんが少ないために発生メカニズムの研究や治療法の開発が遅れています。中でも、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍(ESFT)^{注3}は、小児～青年期に発症し、難治性の症例が多く見られます。ESFT の原因は *EWS-FLI1* 融合遺伝子であることが知られていますが、この遺伝子をマウスやヒトの細胞に導入しても、肉腫は再現できないことから、腫瘍形成には他の要素が必要であることが示唆されていました。これまでに、*EWS-FLI1* の他、いくつかの遺伝子変異が ESFT に関与していると報告されていますが、これらの変異が腫瘍の直接の原因になるのかを含め、どのように肉腫形成に寄与しているかは分かっていませんでした。

そこで、山田教授らの研究グループは、ドキシサイクリン(Dox)により *EWS-FLI1* 遺伝子の発現を調節できる肉腫モデルをマウス骨髄間質細胞^{注4}から作製し、*EWS-FLI1* の発現と抑制を切り替えることで、*EWS-FLI1* 以外に肉腫形成に必要な異常を見出すことを検討しました。また、通常困難とされる、がん細胞からの iPS 細胞作製を試み、これらの iPS 細胞をがんが生じる細胞(骨)に分化させることで、腫瘍形成のメカニズムを調べました。

3. 研究結果

1. *EWS-FLI1* の発現により増殖する細胞は、生体内で肉腫を形成した

Dox により *EWS-FLI1* 遺伝子の発現を誘導できるモデルマウスを作製したところ、*EWS-FLI1* を全身で発現させても腫瘍は見られませんでした。これは、*EWS-FLI1* の発現のみでは肉腫が形成しないことを示します。

次に、研究グループは *EWS-FLI1* による肉腫の発生には、他の遺伝子変異が必要だと考え、レンチウイルスを用いて、ゲノムにランダムに傷をつけて、*EWS-FLI1* を発現する細胞モデルの作製を試みました。Dox 誘導システムを持つマウスから、肉腫の発生起源細胞と考えられている骨髄間質細胞を取り出し、*EWS-FLI1* 遺伝子を導入し、Dox 条件下で2か月培養したところ、*EWS-FLI1* を持つ細胞株のほとんどは死滅しましたが、生き残る細胞株が得られました(図1、*EWS-FLI1* 依存性細胞)。その細胞では Dox 誘導により *EWS-FLI1* の発現が見られ、細胞は増殖しましたが、Dox を除去すると形が扁平になり、細胞の増殖も阻害されました(図2)。

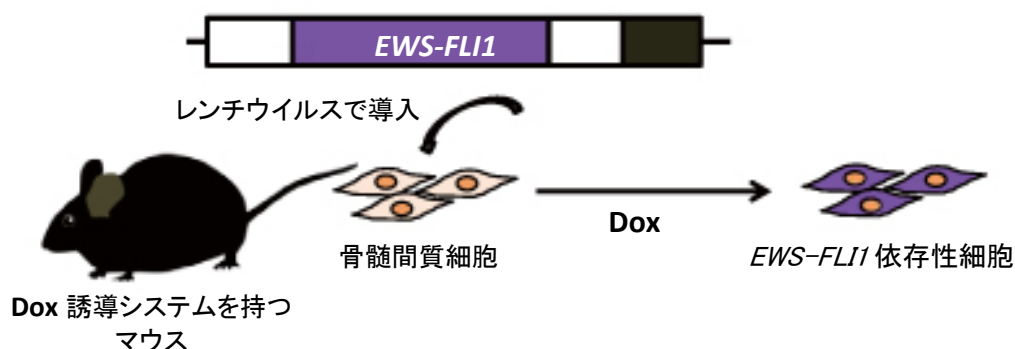


図1. Dox 誘導により *EWS-FLI1* を発現して増殖する細胞の作製

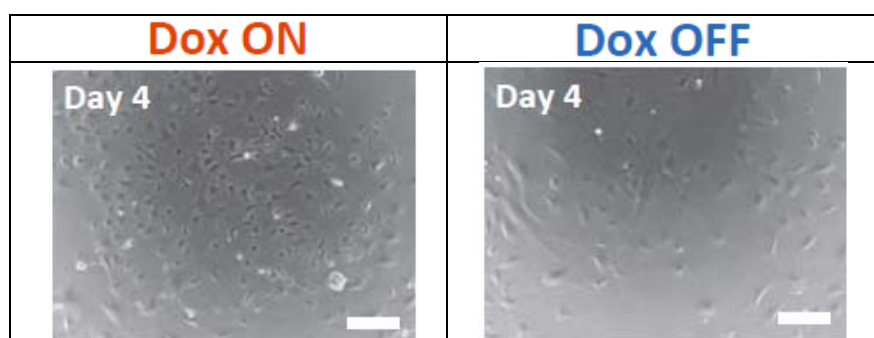


図2. *EWS-FLI1* 依存性細胞の Dox 誘導

Dox ON: Dox により *EWS-FLI1* が発現している細胞

Dox OFF: Dox が無く、*EWS-FLI1* の発現を止めた細胞 (Dox 除去後 4 日目)

(スケールバー: 200 μm)

EWS-FLI1 の発現により増殖する細胞 (*EWS-FLI1* 依存性細胞) が、生体内で腫瘍原性があるのかを確認するため、免疫不全マウスの皮下に移植しました。Dox を投与したマウスでは、腫瘍形成が見られましたが、Dox を投与しないマウスでは腫瘍形成は見られませんでした(図3)。腫瘍は、ユーイング肉腫に似

た小細胞型骨肉腫^{注5}で、骨形成が見られました。腫瘍細胞は *EWS-FLI1* を発現し、増殖マーカーも見られました。



図3. *EWS-FLI1* 依存性細胞の腫瘍原性(移植後 10 週間)

Dox ON: Dox を投与したマウス

Dox OFF: Dox を投与していないマウス

2. *EWS-FLI1* の発現が肉腫細胞の骨分化を阻害した

EWS-FLI1 の発現により発生する肉腫の特性をさらに調べるため、上記のマウスに形成された腫瘍から肉腫細胞を取り出して、*EWS-FLI1* 依存性肉腫細胞株を作製しました。この肉腫細胞株の遺伝子発現パターンを解析すると、ユーイング肉腫、および骨肉腫に部分的に類似しており、どちらの特徴も併せ持つユーイング肉腫ファミリー腫瘍(ESFT)であることが示唆されました。

元の *EWS-FLI1* 依存性細胞と同様に、作製された肉腫細胞株も Dox 濃度依存的に *EWS-FLI1* を発現し、Dox 存在下では増殖しました。Dox を除去し、*EWS-FLI1* の発現を停止させると細胞形態が変わって骨分化が促進され(図4)、細胞増殖は停止しましたが、再び Dox を与えると増殖が戻りました。次に、*EWS-FLI1* を発現している肉腫細胞(Dox ON)と、発現していない肉腫細胞(Dox OFF)の遺伝子発現を比較しました。すると、Dox OFF(*EWS-FLI1* 発現なし)の条件下の肉腫細胞では骨・軟骨形成に関する遺伝子の発現が有意に高いことが分かりました。

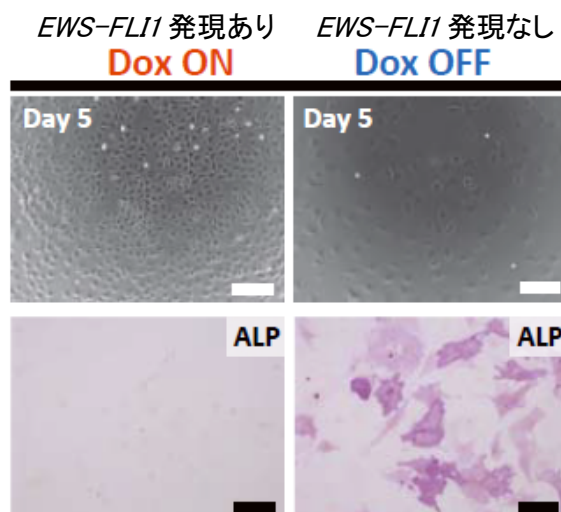


図4. アルカリフォスファターゼ染色による骨形成活性の確認

EWS-FLI1 の発現を抑制すると、肉腫細胞の骨分化が促進された。(Dox 除去後 5 日目)

(スケールバー: 上段 50 μ m, 下段 200 μ m)

次に、*EWS-FLI1* 依存性肉腫細胞を免疫不全マウスに移植すると、Dox 存在下で小細胞型骨肉腫を形成しました。Doxによる*EWS-FLI1*の誘導を止める(Dox OFF)にすると腫瘍の増殖は停止または低下しましたが、腫瘍は骨のように固くなりました(図5)。よって、*EWS-FLI1*の発現が生体外/生体内において肉腫細胞の骨分化を阻害しており、*EWS-FLI1*発現を抑えると、肉腫細胞の骨分化が促進され、成熟した骨が形成されることが分かりました。

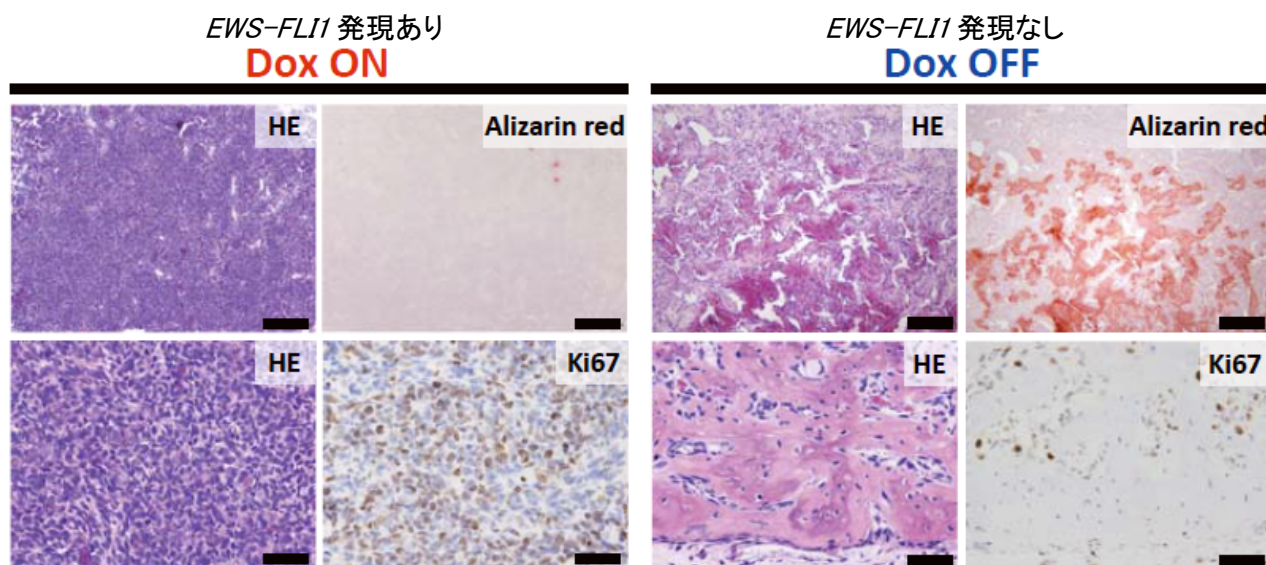


図5. *EWS-FLI1* 依存性肉腫細胞の骨分化

HE: 腫瘍細胞が青色に染まる。Alizarin red: 骨形成を赤色で示す。Ki67: 増殖細胞が赤色に染まる。

Doxの誘導を止めると、青色の腫瘍細胞が減り、骨の形成が見られた。腫瘍細胞に見られていた増殖マーカーも減少した。(スケールバー: 上段 50 μ m, 下段 200 μ m)

3. *EWS-FLI1* 誘導型肉腫細胞から iPS 細胞を作製し、腫瘍の発生を再現できた

iPS細胞はゲノムの変異を保ったまま、細胞の変化を観察できることから、*EWS-FLI1*発現以外の遺伝子異常が腫瘍形成に及ぼす影響を調べるため、肉腫細胞からiPS細胞の作製を試みました。*EWS-FLI1*依存性肉腫細胞に*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC*遺伝子を導入し、*EWS-FLI1*発現が無い条件下(Dox OFF)で、iPS細胞の作製に成功しました。

次に、肉腫の起源細胞と推定される骨前駆細胞を、*EWS-FLI1*発現なし(Dox OFF)でiPS細胞から誘導したところ、コントロールiPS細胞/ES細胞は、*Runx2*, *Sp7*, *Colla1*, *Pth1r*, *Dmpl*など初期から後期に渡る骨分化関連遺伝子の発現が誘導17日目で見られました。一方、*EWS-FLI1*依存性肉腫iPS細胞でも、初期の骨分化関連遺伝子である*Runx2*の発現が誘導されましたが、後期の骨分化に関連する遺伝子の発現は阻害されていました。さらに、骨分化を28日目まで延長すると、骨の成熟を示す石灰化した領域が全てのサンプルで見られましたが、その面積は肉腫iPS細胞に対してコントロールES細胞/iPS細胞で大きいことが分かりました(図6)。この結果から、肉腫iPS細胞では、*EWS-FLI1*発現とは関係なく、骨分化が阻害されており、*EWS-FLI1*とは別の変異が骨分化を阻害し、増殖する前駆細胞の状態を維持していることが分かりました。

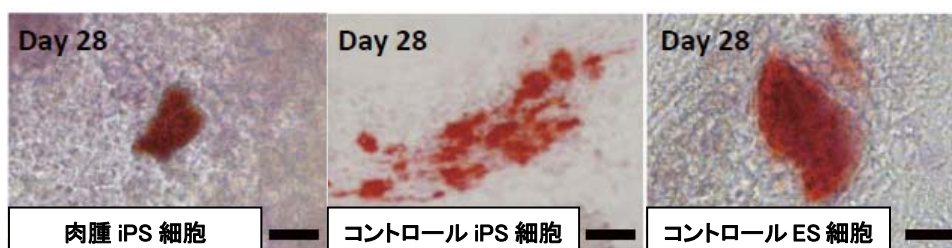


図6. *EWS-FLI1* 発現がない条件下での肉腫 iPS 細胞からの骨誘導(骨誘導 28 日後)
アリザリン・レッド染色(赤色)により骨の石灰化を示す。肉腫 iPS 細胞では骨分化が阻害された。
(スケールバー: 20 μm)

さらに、*EWS-FLI1* の発現と、他の遺伝子異常に帰する骨分化の異常がどのように影響しあっているのかを解析しました。肉腫 iPS 細胞は、未分化な状態では、*EWS-FLI1* を発現させても増殖がより活性化されることはありませんでしたが、骨前駆細胞に分化してから Dox 添加により *EWS-FLI1* 発現をさせた(図7)ところ、増殖活性を示しました。この増殖が活性化された細胞をマウスに移植し、マウスに Dox を投与して *EWS-FLI1* を誘導すると、腫瘍が発生しました(図8)。これらの結果により、遺伝子変異により骨分化に異常が見られる状態で、*EWS-FLI1* が発現すると腫瘍が形成されることが示唆されました。

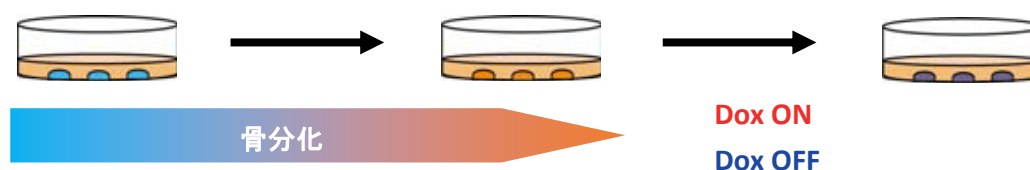


図7. 骨分化と *EWS-FLI1* の誘導

骨分化 17 日後に Dox による *EWS-FLI1* 発現のあり/無しで、2 週間培養した。



図8. *EWS-FLI1* 依存性肉腫 iPS 細胞由来増殖細胞の腫瘍原性(移植後 3~7 週間)
肉腫 iPS 細胞由来増殖細胞を免疫不全マウスに移植すると、Dox 投与したときのみ腫瘍を形成した。

4. まとめ

本研究では、肉腫モデルマウスのがん細胞から iPS 細胞を作製し、起始細胞(骨)に分化させることで、がん化を再現することに成功しました。また、がん化の過程を調べることで、成熟した骨への分化の阻害ががん化に重要な役割を果たしていることを見出しました。今後、このような iPS 細胞を用いたがん化モデルは、細胞分化の異常を標的とした抗がん剤の開発に貢献することが期待されます。

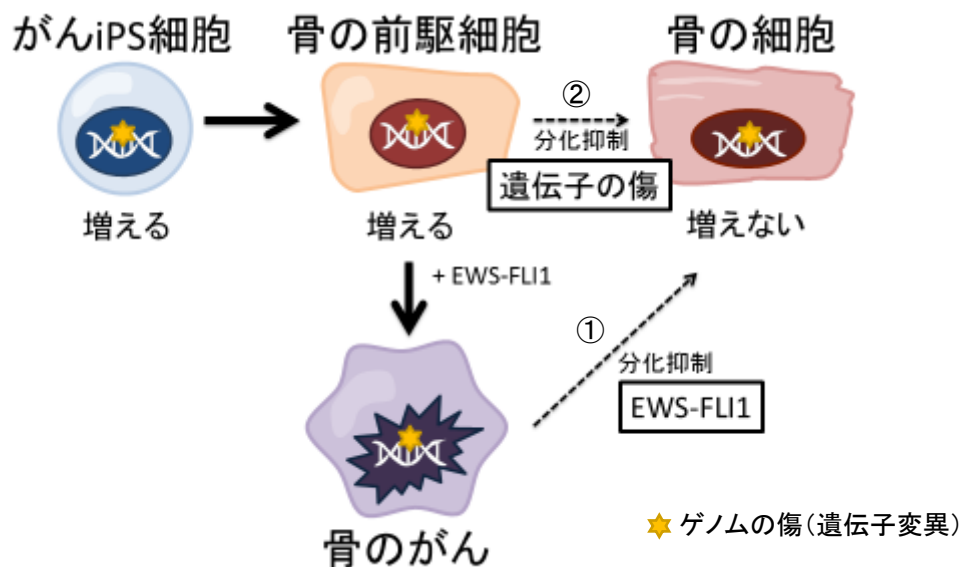


図9. 本研究のまとめ

通常のゲノム(正常な遺伝子背景)をもつ骨前駆細胞に *EWS-FLI1* を発現させても、肉腫(骨のがん)にはならない。ゲノムに傷がついた状態で *EWS-FLI1* を発現させると肉腫になる。肉腫の出現には、*EWS-FLI1* の発現に加えて、ゲノムの傷が影響していることを示している。

ガンのゲノムでは、①*EWS-FLI1*により骨分化が阻害される、②ゲノムの異常により骨に分化し難い、の2つの異常により、未分化状態が維持され、腫瘍が形成される。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“*EWS-FLI1*-induced osteosarcoma model unveiled a crucial role of impaired osteogenic differentiation on osteosarcoma development”

○ ジャーナル名

Stem Cell Reports

○ 著者

Shingo Komura^{1,2}, Katsunori Semi^{1,3}, Fumiaki Itakura¹, Hirofumi Shibata¹, Takatoshi Ohno², Akitsu Hotta^{1,3}, Knut Woltjen^{1,4}, Takuya Yamamoto^{1,3,5}, Haruhiko Akiyama², Yasuhiro Yamada^{1,3*}

(*責任著者)

著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
2. 岐阜大学 大学院医学系研究科
3. 京都大学 物質-細胞統合システム拠点(iCeMS)
4. 京都大学 白眉センター
5. AMED-CREST

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

AMED 次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム(P-DIRECT)

厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金

武田科学振興財団

内藤記念科学振興財団

7. 用語説明

注1) ドキシサイクリン(Doxycycline: Dox)

抗生物質の一種。遺伝子工学ではこの物質に反応して遺伝子のオン/オフを制御する仕組みがよく用いられている。本研究では、ドキシサイクリンが取り込まれると、がん遺伝子 *EWS-FLI1* が作られるように遺伝子进行操作した細胞を作製し利用している。

注2) *EWS-FLI1* 融合遺伝子

EWS 遺伝子の N 末端トランスアクチベータードメインと *FLI1* 遺伝子の C 末端 ETS DNA 結合領域からなる。この融合遺伝子からできる *EWS-FLI1* 融合タンパク質は、転写因子として働き、翻訳の活性/抑制、クロマチン調節、スプライシング調節など、様々な機能をもつ。

注3) ユーイング肉腫ファミリー腫瘍(Ewing's sarcoma of family tumors: ESFT)

小児に発症する骨の腫瘍の中で 2 番目に多いユーイング肉腫を含む類似の腫瘍。*EWS* と *FLI1* という2つのタンパクの一部が結合した、融合タンパク質である *EWS-FLI1* が、ユーイング肉腫の 80~90%で見つかっており、*EWS-FLI1* が原因遺伝子と考えられている。

注4) 骨髄間質細胞

骨髄は、赤血球や白血球などになる造血系の細胞と、それを取り囲む骨髄間質細胞から成っている。骨髄間質細胞には、間葉系組織(血管, 筋肉, 脂肪, 骨, 軟骨など)に分化する細胞が含まれる。

注5) 小細胞型骨肉腫

骨肉腫は骨の悪性腫瘍のなかでも最も多く見られるが、小細胞型骨肉腫は、まれな骨肉腫のタイプでる。小細胞型骨肉腫の一部には *EWS* 融合遺伝子が検出される。