

|        |   |        |   |
|--------|---|--------|---|
| 氏名（本籍） | 山 田 一 成（岐阜県）  |        |   |
| 学位の種類  | 博 士（医学）   |        |   |
| 学位授与番号 | 甲第 916 号  |        |   |
| 学位授与日付 | 平成 25 年 3 月 25 日  |        |   |
| 学位授与要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当  |        |   |
| 学位論文題目 | <i>EWS/ATF1</i> expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice |        |   |
| 審査委員   | （主査）教授 中 川 敏 幸  |        |   |
|        | （副査）教授 山 口 瞬  | 教授 小 澤 | 修 |

### 論文内容の要旨

これまで多種類の悪性骨軟部腫瘍において染色体相互転座による融合遺伝子が発見され、その遺伝子産物である融合蛋白質が組織特異的な腫瘍の発生に関与していると考えられている。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し、発がんを誘発していることが予想されている。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。

#### 【方法】

1. 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。
2. *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。
3. 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  $\beta$ -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* 発現誘導マウスに導入し、*EWS/ATF1* により発生した腫瘍の起源となる細胞を検討した。
4. *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。
5. G1297 における *EWS/ATF1* 発現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。
6. *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* の直接的結合を評価した。
7. *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。

## 【結果】

1. *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。
2. *EWS/ATF1* 発現マウスの全例で全身の皮下組織に多発性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。
3. 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。
4. 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。
5. G1297 のマイクロアレイ解析では、*EWS/ATF1* の発現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。
6. *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。
7. *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・結論】

*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、さらにその増殖と維持に必須であることが明らかとなった。①*EWS/ATF1* により発生した腫瘍の起源は一様に神経提由来の細胞であったこと、②*EWS/ATF1* を強制発現させた MEF では増殖が抑制されたこと、③ *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により、*EWS/ATF1* による発がん性形質転換が神経提由来細胞に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。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 山田一成は、明細胞肉腫の発癌機構の解明を目的に *EWS/ATF1* 融合遺伝子の発現を制御可能なトランスジェニックマウスを樹立した。*EWS/ATF1* の発現を誘導したトランスジェニックマウスから軟部腫瘍を発生させることに成功し、さらに、腫瘍の起源が神経提由来の細胞であることを証明した。また、*EWS/ATF1* 発現誘導による軟部腫瘍では、*EWS/ATF1* 融合蛋白質が *Fos* の転写因子として作用し、細胞増殖促進分子として機能することを明らかにした。本研究の成果は明細胞肉腫の発生機構の解明につながり、整形外科の発展に少なからず寄与するものと認められる。

---

### [主論文公表誌]

Kazunari Yamada, Takatoshi Ohno, Hitomi Aoki, Katsunori Semi, Akira Watanabe, Hiroshi Moritake, Shunichi Shiozawa, Takahiro Kunisada, Yukiko Kobayashi, Junya Toguchida, Katsuji Shimizu, Akira Hara, and Yasuhiro Yamada: *EWS/ATF1* expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice  
J Clin Invest. 123, 600-610 (2013)