

|         |  |
|---------|--|
| 氏名 (本籍) | 河村真吾 (岐阜県)   |
| 学位の種類   | 博士 (医学)  |
| 学位授与番号  | 甲第 1024 号  |
| 学位授与日付  | 平成 28 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-FLI1</i> -induced osteosarcoma model unveiled a crucial role of impaired osteogenic differentiation on osteosarcoma development |
| 審査委員    | (主査) 教授 國貞隆宏<br>(副査) 教授 清水雅仁 教授 鈴木康之   |

### 論文内容の要旨

ユーイング肉腫は染色体相互転座から生じる *EWS-ETS* 融合遺伝子 (*EWS-FLI1*, *EWS-ERG* 等) を有し、その起始細胞は間葉系幹細胞と推測されている。*EWS-ETS* 融合遺伝子は本肉腫に特異的な発がん原因遺伝子であるが、融合遺伝子単独では間葉系幹細胞を肉腫へ誘導できないとされている。ユーイング肉腫発生における付加的異常 (2<sup>nd</sup> hit) の必要性が示唆されているものの、その詳細は未解明である。予後不良であるユーイング肉腫の治療法改善のため、肉腫発生機序の解明および融合遺伝子の詳細な機能解析が望まれている。本研究では、ドキシサイクリン (Dox) 投与により遺伝子発現が誘導できる Tet-On システムを用いて、*EWS-FLI1* 発現が調節可能な肉腫モデルを作製し、細胞初期化技術を応用することで上記の解明を試みた。

#### 【方法・結果】

*Rosa26-M2rtTA* マウスから採取した骨髄間質細胞に *Tet0-EWS-FLI1-FLAG-HA-ires-NeoR* 配列をレンチウイルスベクターにて導入した。これらを Dox+G418 存在下で培養し、*EWS-FLI1* 依存性不死化細胞株 (EFN#2, EFN#12) を得た。EFN#2 および EFN#12 を免疫不全マウスの皮下へ接種したところ、*EWS-FLI1* 発現時のみ腫瘍形成を認めた。組織学的に腫瘍はユーイング肉腫に類似した小円形細胞肉腫であったが、骨肉腫の特徴的所見である類骨形成を認めた。免疫不全マウスに形成された肉腫から *EWS-FLI1* 誘導性肉腫細胞株 (SCOS#2, SCOS#12) を樹立した。SCOS#2 および SCOS#12 は *EWS-FLI1* に強く依存しており、*EWS-FLI1* 発現停止によって肉腫細胞は増殖を停止した。さらに、*EWS-FLI1* 発現を長期間停止することで、肉腫細胞は *in vitro* で骨・軟骨・脂肪への分化傾向を示し、*in vivo* で成熟骨へと分化した。SCOS#2 のマイクロアレイおよび ChIP シークエンス解析の結果、*EWS-FLI1* 発現により骨・軟骨分化関連遺伝子の発現が抑制されること、また *EWS-FLI1* は標的遺伝子のプロモーター領域ではなく、むしろ遺伝子間領域およびイントロンに結合する傾向が強いことが明らかとなった。最後に、SCOS#2 および SCOS#12 から遺伝子変異および染色体異常を持つ人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作製した。*EWS-FLI1* 発現停止状態で肉腫由来 iPS 細胞を骨分化誘導すると、正常な遺伝子背景の ES/iPS 細胞と比較して、成熟骨への分化障害が認められた。さらに、肉腫由来 iPS 細胞から *in vitro* で分化誘導した骨前駆細胞に *EWS-FLI1* を再発現させたところ、ユーイング肉腫様の小円形細胞肉腫が誘導された。一方、正常な遺伝子背景の ES/iPS 細胞から誘導した骨前駆細胞に *EWS-FLI1* を発現させたが肉腫は誘導されなかった。

## 【考察】

骨肉腫の亜型である小細胞型骨肉腫はユーイング肉腫に類似した小円形細胞肉腫であり、その一部には *EWS-ETS* 融合遺伝子が検出されている。本研究で作成した肉腫モデルは、*EWS-FLI1* 誘導性小細胞型骨肉腫に相当すると考えられた。*EWS-FLI1* 発現を調節可能な肉腫モデルと細胞初期化技術を利用することで、*EWS-FLI1* による骨・脂肪・軟骨細胞系譜への分化抑制とがんゲノム異常を背景とした細胞分化異常の双方が、肉腫発生および維持に重要であることが明らかとなった。ユーイング肉腫および *EWS-FLI1* 誘導性小細胞型骨肉腫において、細胞分化異常を標的とした新規治療法の可能性が示唆された(特願 2016-010122)。

## 【結論】

マウス骨髄間質細胞から *EWS-FLI1* 誘導性骨肉腫モデルを作成した。肉腫細胞において、*EWS-FLI1* は骨・脂肪・軟骨細胞系譜への分化を強く抑制した。*EWS-FLI1* とがんゲノム異常の双方によりもたらされる細胞分化異常が *EWS-FLI1* 誘導性肉腫の発生および維持に重要である。本モデルはユーイング肉腫および *EWS-FLI1* 誘導性小細胞型骨肉腫に対する新規治療薬のスクリーニングに有用なツールになりうる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 河村 真吾は、マウス骨髄間質細胞から *EWS-FLI1* 発現を自在にコントロールできる小細胞型骨肉腫モデルを作製し、*EWS-FLI1* が骨・脂肪・軟骨分化を抑制することで、腫瘍の未分化性を維持していることを明らかにした。また、iPS 細胞作製技術をがん研究に応用することで、ユーイング肉腫発生には *EWS-FLI1* 以外の付加的遺伝子異常が必要であり、それらの遺伝子異常は *EWS-FLI1* と独立して腫瘍細胞の分化を障害し、未分化性を与えていることを明らかにした。本研究結果は、ユーイング肉腫発生メカニズムの一端を明らかにしただけでなく、ゲノム異常が広くがんの“未分化性”および“分化異常”に関与していることを改めて証明するものである。また、本肉腫モデルはユーイング肉腫および *EWS-FLI1* 誘導性小細胞型骨肉腫に対する治療薬、即ち終末骨分化を指標とした *EWS-FLI1* 直接阻害剤のスクリーニングアッセイ系に利用できる可能性を有するものと考えられる。本研究の成果はユーイング肉腫および *EWS-FLI1* 誘導性小細胞型骨肉腫発生メカニズムの理解および治療薬開発に結びつくものであり、整形外科学および腫瘍学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

Shingo Komura, Katsunori Semi, Fumiaki Itakura, Hirofumi Shibata, Takatoshi Ohno, Akitsu Hotta, Knut Woltjen, Takuya Yamamoto, Haruhiko Akiyama, Yasuhiro Yamada: *EWS-FLI1*-induced osteosarcoma model unveiled a crucial role of impaired osteogenic differentiation on osteosarcoma development

Stem Cell Reports (in press).