

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「iPS／アニマルモデル」

(先進的マウスモデルによる融合遺伝子関連骨軟部肉腫の創薬評価プラットフォーム開発)

2. 研究開発代表者： 公益財団法人がん研究会がん研究所 中村卓郎

3. 研究開発の成果

融合遺伝子関連骨軟部肉腫の新規治療薬評価系の確立を目的として、以下の成果を得た。

1. 融合遺伝子関連骨軟部肉腫のGDA モデル系の作製

1) Ewing 肉腫のin vivo イメージングモデルを用いて、核酸医薬の治療効果を判定する株化したEwing肉腫細胞4種類についてルシフェラーゼ遺伝子を用いてラベルし、in vivoイメージングで転移を定性的・定量的に評価した。細胞株によって肺転移を主とするものとリンパ節転移を主とするものの異なる転移指向性を示す細胞株の樹立に成功した。次に、このモデルに対して、siEWS-FLI1 をベースとして末端をアミノ酸修飾した核酸医薬を投与した。In vitro では、細胞増殖を30%以下に抑制することが判明した。また、CIC-DUX4 小円形細胞肉腫モデルの作製に成功し、Ewing 肉腫に比べて迅速な増殖能と転移能を有していることがわかった。一方、孤立性線維腫瘍の原因遺伝子NAB2-STAT6 をp53 欠損マウスに導入すると腫瘍発生が促進されたことから、NAB2-STAT6 の腫瘍発生機構の理解が進んだ。

2) 胞巣状軟部肉腫や滑膜肉腫モデルを用いて、組織学的・遺伝子発現・シグナルネットワーク解析の結果に基づいて、肉腫の浸潤転移能の制御をin vitro 及びin vivo の側面から評価する胞巣状軟部肉腫モデルにおいては、腫瘍が高頻度で自発性転移を示すことから、その転移機構を評価した。その結果、原発巣において血管周皮を有する高度な腫瘍血管ネットワークが形成されることが明らかとなり、さらに腫瘍細胞の血管侵襲像が特徴的であった。胞巣状軟部肉腫細胞の培養上清に血管周皮の遊走を促進する因子が含まれることがわかり、その同定を進め候補因子を単離した。また、血管侵襲の責任分子についても遺伝子発現プロファイルから候補分子を同定した。一方、滑膜肉腫の浸潤にはマイクロRNAの関与が示唆され、特に腫瘍細胞から分泌されるマイクロRNAが間質細胞に作用していることも考えられたので、その評価系を立ち上げた。

2. GDA モデル動物の確立

1) 胞巣状軟部肉腫モデルの妥当性の検討

本モデルについて遺伝子発現プロファイルを検討するとともに、ChIP-Seq によりASPL-TFE3 の結合部位を明らかにし、その標的遺伝子の同定を進めた。その中で分子A と分子B は、胞巣状軟部肉腫の血管新生や血行性転移に重要な役割を担っている分子として明らかにされた。これら分子の同定は、胞巣状軟部肉腫モデルを用いた分子標的治療の開発に有用である。

2) CIC-DUX4 小円形細胞肉腫モデルの妥当性の検討

CIC-DUX4 肉腫については、モデルの立ち上げを受けて、その妥当性の検討を行った。遺伝子発現プロファイル解析とRT-PCR 及び免疫組織染色の結果、CIC-DUX4 マウスにおいてヒトCIC-DUX4 腫瘍と同様の標的遺伝子の発現亢進が認められ、本モデルの妥当性が検証された。さらに、新たな標的遺伝子として分子C や分子D が同定され、ヒトCIC-DUX4 肉腫においてもその発現が認められ、Ewing 肉腫と鑑別するバイオマーカー候補と考えられた。

3. 骨軟部肉腫PDX モデルの樹立

がん研有明病院サルコーマセンターにおいて採取された肉腫患者検体を免疫不全マウスに移植してPDXモデルの樹立を行った。融合遺伝子関連骨軟部肉腫を中心に、合計12 症例の検体を移植した。その結果、SYT-SSX1 陽性の滑膜肉腫とPAX3-FOXO1A 陽性の胞巣状軟部肉腫各1 例の樹立に成功した。GDA モデルと併用することによって、今後、新規薬剤のin vivo 薬効評価を初めとする骨軟部肉腫に対する創薬開発に有用なモデル系となることが期待される。