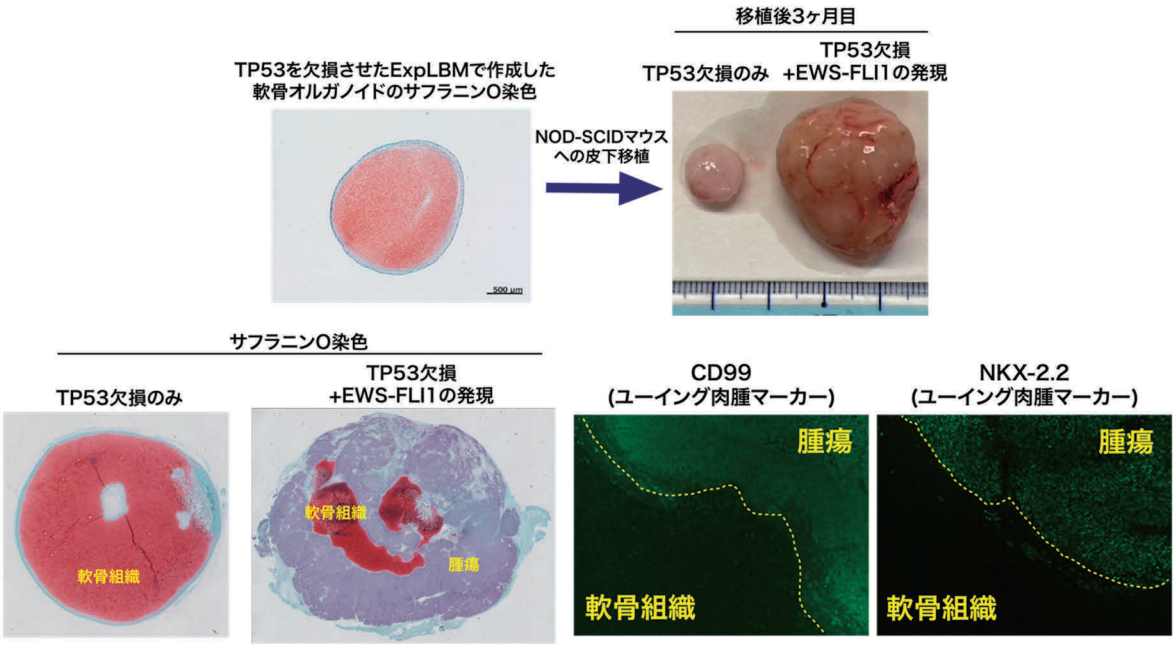
48　ヒト肢芽間葉系細胞を用いた腫瘍モデルの構築	山田　大祐

【目的】マウス肉腫モデルを用いた先行研究により、肢芽間葉系細胞系譜の細胞が肉腫の起源となることが示されているが、ヒト肢芽間葉系細胞を用いた肉腫モデルに関してはこれまで樹立されていなかった。そこで本研究では、ヒト肉腫の発症ならびに悪性化機構の解明を行うために、ヒト多能性幹細胞から誘導した拡大培養が可能な肢芽間葉系細胞（Expandable limb bud-like mesenchymal cells：ExpLBM）を用いた肉腫モデルの構築を行った。

【方法】CRISPR-Cas9 の系を用いることで、*TP53* の機能欠損を有するヒト iPS 細胞株 414C2（414C2 *TP53* 欠損株）を樹立した。次に、ドキシサイクリン誘導的に 3×FLAG-EWS-FLI1 の発現を可能にする piggyBAC ベクターを作製し、エレクトロポレーションにて 414C2（野生型）及び 414C2 *TP53* 欠損株に導入した。これらの細胞株から ExpLBM を誘導した後、浮遊培養条件下にて軟骨分化誘導を行うことでヒト肢芽間葉系細胞由来軟骨オルガノイドを作製し、NOD-SCID マウスの皮下への移植を行った。ドキシサイクリン投与を開始してから 3 ヶ月後に移植組織を回収し、組織学的解析を行った。

【結果】ExpLBM への分化誘導後、細胞をドキソルビシン処理した結果、野生型では TP53 の標的遺伝子である P21 の発現誘導が確認されたが、*TP53* 欠損株では P21 の発現誘導は生じなかった。ドキシサイクリン処理によって、3×FLAG-EWS-FLI1 の発現誘導が確認された ExpLBM を用いて、ドキシサイクリン非存在下で軟骨分化誘導を行ったところ、野生型と *TP53* 欠損の両株で軟骨オルガノイドの形成が確認された。同オルガノイドを皮下移植した NOD-SCID マウスにドキシサイクリンを 3 ヶ月飲水投与した結果、*TP53* 欠損株でユーイング肉腫マーカー（CD99、NKX-2.2）陽性の腫瘍が形成された。

ヒト肢芽間葉系細胞由来ユーイング肉腫モデルの構築



48. ヒト肢芽間葉系細胞を用いた腫瘍モデルの構築

山田　大祐

岡山大学 学術研究院 医歯薬学域（医学系）組織機能修復学分野

Key words：ヒト多能性幹細胞，肢芽間葉系細胞，悪性骨軟部腫瘍，ユーイング肉腫

緒　言

肉腫（悪性骨軟部腫瘍）は、骨、筋肉、脂肪組織などから発生する悪性腫瘍の総称である。四肢に発症することが多く、WHO 分類では 50 種類以上の病理組織分類があり、それぞれ「がん」としての振る舞いが異なる。小児期、AYA 世代に発症する骨肉腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫や、成人以降に多い軟骨肉腫、未分化多形肉腫、脱分化型脂肪肉腫、悪性神経鞘腫は、極めて予後不良な高悪性度腫瘍である。外科的治療に化学療法や放射線照射を併用する集学的治療が行われているが、進行例では治癒に至る症例は限られており、治療成績の向上には新しい予防法・早期診断法・治療法を開発することが必須である。

ヒト iPS 細胞は、皮膚線維芽細胞や末梢血単核細胞といった低侵襲かつ倫理的問題点の少ない方法で採取が可能な細胞をリプログラミングすることで樹立可能な多能性幹細胞の一種であり、ES 細胞同様の自己複製能と多分化能を有していることが最大の特徴である［1，2］現在ヒト iPS 細胞の持つ多分化能を利用して、分化誘導後の細胞やオルガノイドを用いた再生医療ならびに病態モデル関連の研究が盛んに行われている［3，4］。がん研究の場合、臨床検体から樹立したヒト由来腫瘍細胞株の移植実験は転移や再発を模したモデルになってしまうが、ヒト iPS 細胞由来の腫瘍モデルでは発症機構が解明出来るという利点もあり、遺伝的背景を考慮した新規のがん予防療法あるいはがん治療薬の開発への応用が期待されている［5］。ヒト iPS 細胞を用いた肉腫モデルに関しては、これまでにシュワン細胞前駆細胞の誘導系［6］を用いた悪性末梢神経鞘腫瘍モデルが報告されている［7］が、ユーイング肉腫に関してはマウスを用いた腫瘍モデル［8］の報告例しかない。

これまでに、我々はヒト多能性幹細胞から拡大培養が可能な肢芽間葉系細胞（Explandable limb bud mesenchymal cells, ExpLBM）を誘導する技術を開発することに成功しており［9］、同細胞はヒトの四肢発生を模倣して作製されていることから、骨肉腫やユーイング肉腫の様に肢芽間葉系細胞系譜の細胞に由来する肉腫の病態モデルを樹立するには適した細胞源であると考えられる。そこで本研究では、ExpLBM 由来軟骨オルガノイドを用いた肉腫モデルの構築を目指した。

方　法

1. *TP53* 欠損ヒト iPS 細胞株の樹立

Addgene より入手した pX459 ベクターに TP53 に対する gRNA 配列（CGTCCGCGCCATGGCCATCT）を組み込んだ後、NEPA21（ニッパジーン）を用いたエレクトロポレーションにてヒト iPS 細胞株 414C2 に導入した。プラスミド導入後に 1 μg/ml のピューロマイシン処理を 3 日間行うことでプラスミドが導入された細胞を選別し、次に 10 μM Nutlin3a で 3 日間処理を行うことで *TP53* の機能欠損が生じた細胞の選別を行った。その後、シングルコロニーピックアップを行い、0.1 μM のドキソルビシン処理によって *P21* の発現誘導が生じないクローンを選別した。

2. ドキシサイクリン誘導的 3×FLAG-EWS-FLI1 発現系の構築

Addgene より入手した piggyBAC 発現ベクターである PB-TAC-ERP2 に ThermoFisher にて人工遺伝子合成した pDONR221-3×FLAG-EWS-FLI1 を LR 反応にて導入した。その後、エレクトロポレーションにて 414C2（野生型）あるいは 414C2 *TP53* KO 株に PB-TAC-ERP2-3×FLAG-EWS-FLI1 を導入し、1μg/ml のピューロマイシン処理を 3 日間行うことでドキシサイクリン誘導的に 3×FLAG-EWS-FLI1 の発現が可能な細胞株を樹立した。

3. ExpLBM の誘導と ExpLBM 由来軟骨オルガノイドの作製

ExpLBM ならびに ExpLBM 由来軟骨オルガノイドに関しては、以前に我々が報告した論文に記載されている手法を用いて誘導を行った［9, 10］。414C2（野生型）/ PB-TAC-ERP2-3×FLAG-EWS-FLI1 ならびに 414C2 TP53KO/ PB-TAC-ERP2-3×FLAG-EWS-FLI1 株を原始線条、側板中胚葉、肢芽間葉系細胞へと分化誘導した後、肢芽間葉系細胞の継続継代を行うことで 414C2（野生型）/PB-TAC-ERP2-3×FLAG-EWS-FLI1 ならびに 414C2 TP53KO/PB-TAC-ERP2-3×FLAG-EWS-FLI1 由来 ExpLBM を樹立した。

4. NOD-SCID マウスへの ExpLBM 由来軟骨オルガノイドの皮下移植実験

CharlevsRiver より購入した NOD-SCID マウス（4 週齢、雌）にイソフルランの吸入麻酔を行った後、側腹部の切開し ExpLBM 由来軟骨オルガノイドを移植した後に切開部位を縫合した。その後、0.1 mg/ml ドキシサイクリンと 1%スクロースの飲水投与を行い、投与開始 3 ヶ月目に頸椎脱臼によって NOD-SCID マウスを安楽死させた。摘出した組織は 4%PFA にて固定し、パラフィン包埋後に組織切片（厚み 0.4μm）を作製し組織学的解析を行った。なお、本研究にて行った動物実験に関しては、岡山大学動物実験委員会の承認を得て行っている。

結果および考察

1. *TP53* 欠損による ExpLBM への影響

TP53 の機能が消失した ExpLBM を作製するために、ヒト iPS 細胞株である 414C2 に TP53 の各 isoform 共通エクソンを認識する様に設計した CRISPR-Cas9 の系を導入した後、MDM2 阻害剤である Nutlin3a で細胞を処理することで TP53 の発現増加で細胞死が生じない細胞、つまり *TP53* の機能が欠損した 414C2 株の樹立を行った（図 1）。野生型と *TP53* 欠損株から ExpLBM を誘導した後、増殖性を WST-8 アッセイにて評価した結果、*TP53* 欠損によって増殖性が向上することが分かった（図 2A）。また、0.1μM のドキソルビシンで ExpLBM を 1 日処理したところ、*TP53* 欠損株では P21 の発現誘導が認められなかっただけではなく、ドキソルビシン誘導的な細胞死に関しても抵抗性が認められた（図 2B、C）。ウエスタンブロットにて TP53 が両株において検出はされているが、これらの結果からフレームシフト変異による TP53 の機能欠損が生じたことが考えられる。現在、フレームシフト変異を確認するためのゲノム配列解析を行っている。

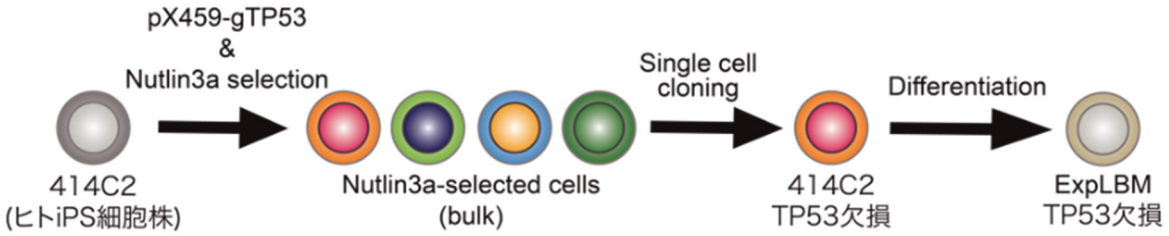


図 1. *TP53* 欠損 ExpLBM の作製手順

TP53 欠損ヒト iPS 細胞株を樹立した後、ExpLBM への分化誘導を行った。

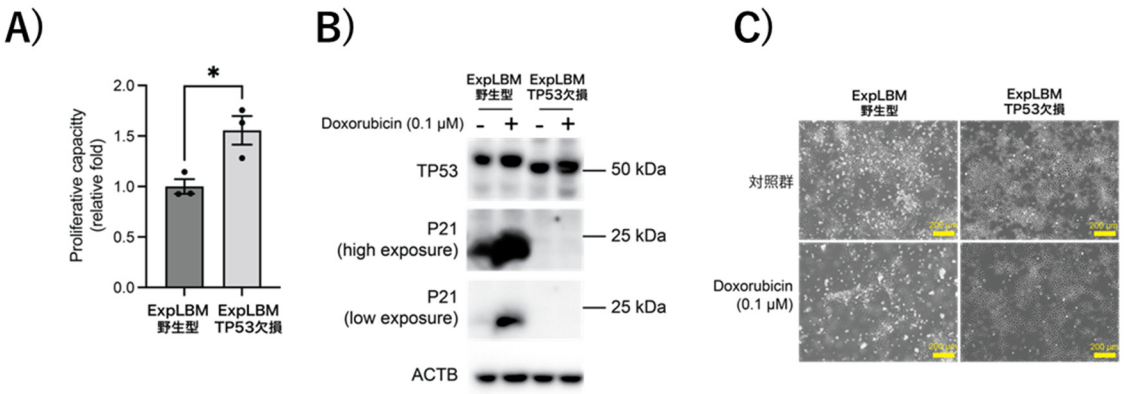


図 2. ExpLBM における TP53 機能欠損の確認

A) WST-8 アッセイによる増殖能の比較。two-tailed unpaired t-test で、p=0.0253。

B) エスタンブロットによるドキソルビシン処理後の TP53 標的遺伝子 P21 の発現誘導の確認。

C) ドキソルビシン処理後の細胞の位相差写真。スケールバー：200 μm。

2. ヒト iPS 細胞由来ユーイング肉腫モデルを用いた腫瘍起源細胞の同定

ドキシサイクリンによる 3×FLAG-EWS-FLI1 の発現誘導が確認された 414C2（野生型）/PB-TAC-ERP2-3×FLAG-EWS-FLI1 ならびに 414C2 TP53KO/PB-TAC-ERP2-3×FLAG-EWS-FLI1 由来 ExpLBM から軟骨オルガノイドを作製した後、NOD-SCID マウスに皮下移植を行った結果、ドキシサイクリン投与群でヒトユーイング肉腫と類似した形態を有する細胞が観察される腫瘍の形成が確認された（図 3）。腫瘍に関しては野生型と *TP53* 欠損株の両株で認められたが、*TP53* 欠損株の方が腫瘍の形成速度は早かった。また、腫瘍は軟骨組織を覆う表在細胞から形成されている印象があることから、現在、空間トランスクリプトーム解析 VISUM と single RNAseq による解析を行い、腫瘍の起源と悪性化機構の解明を目指して実験を行っている。

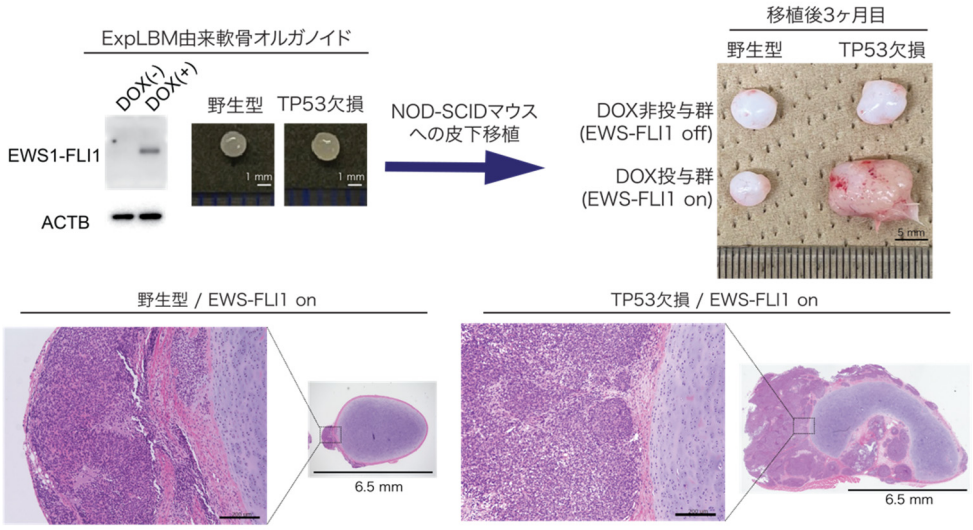


図 3. ExpLBM 由来軟骨オルガノイドを用いた肉腫モデルの作製

ドキシサイクリン誘導的な 3×FLAG-EWS-FLI1 の発現系を組み込んだ野生型あるいは *TP53* 欠損型の ExpLBM 由来軟骨オルガノイドを作製し、NOD-SCID マウスへの皮下移植後にドキシサイクリンの投与を行った。野生と *TP53* 欠損株の両株で腫瘍の形成が認められたが、*TP53* 欠損株では形成速度が早い。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岡山大学学術研究院医歯薬学域（医学系）の宝田剛志教授である。

文　献

1） Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007;131(5):861-72. Epub 2007/11/24. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019. PubMed PMID: 18035408.

2） Mack AA, Kroboth S, Rajesh D, Wang WB. Generation of induced pluripotent stem cells from CD34+ cells across blood drawn from multiple donors with non-integrating episomal vectors. PloS one. 2011;6(11):e27956. Epub 20111122. doi: 10.1371/journal.pone.0027956. PubMed PMID: 22132178; PubMed Central PMCID: PMCPMC3222670.

3） Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. Nat Rev Mol Cell Biol. 2016;17(3):170-82. Epub 20160128. doi: 10.1038/nrm.2015.27. PubMed PMID: 26818440.

4） Lancaster MA, Huch M. Disease modelling in human organoids. Dis Model Mech. 2019;12(7). Epub 20190729. doi: 10.1242/dmm.039347. PubMed PMID: 31383635; PubMed Central PMCID: PMCPMC6679380.

5） Zhang M, Vandana JJ, Lacko L, Chen S. Modeling cancer progression using human pluripotent stem cell-derived cells and organoids. Stem Cell Res. 2020;49:102063. Epub 20201027. doi: 10.1016/j.scr.2020.102063. PubMed PMID: 33137568; PubMed Central PMCID: PMCPMC7849931.

6） Kim HS, Lee J, Lee DY, Kim YD, Kim JY, Lim HJ, et al. Schwann Cell Precursors from Human Pluripotent Stem Cells as a Potential Therapeutic Target for Myelin Repair. Stem Cell Reports. 2017;8(6):1714-26. Epub 20170511. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.011. PubMed PMID: 28506533; PubMed Central PMCID: PMCPMC5469943.

7） Mo J, Anastasaki C, Chen Z, Shipman T, Papke J, Yin K, et al. Humanized neurofibroma model from induced pluripotent stem cells delineates tumor pathogenesis and developmental origins. J Clin Invest. 2021;131(1). doi: 10.1172/JCI139807. PubMed PMID: 33108355; PubMed Central PMCID: PMCPMC7773354.

8） Quist T, Jin H, Zhu JF, Smith-Fry K, Capecchi MR, Jones KB. The impact of osteoblastic differentiation on osteosarcomagenesis in the mouse. Oncogene. 2015;34(32):4278-84. Epub 2014/10/28. doi: 10.1038/onc.2014.354. PubMed PMID: 25347737; PubMed Central PMCID: PMCPMC4411188.

9） Yamada D, Nakamura M, Takao T, Takihira S, Yoshida A, Kawai S, et al. Induction and expansion of human PRRX1(+) limb-bud-like mesenchymal cells from pluripotent stem cells. Nat Biomed Eng. 2021;5(8):926-40. Epub 20210809. doi: 10.1038/s41551-021-00778-x. PubMed PMID: 34373601.

10） Takao T, Yamada D, Takarada T. A protocol to induce expandable limb-bud mesenchymal cells from human pluripotent stem cells. STAR Protoc. 2022;3(4):101786. Epub 20221026. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101786. PubMed PMID: 36317170; PubMed Central PMCID: PMCPMC9617203.