

学 位 論 文 題 名

Establishment of a new continuous clear cell sarcoma cell line Morphological and cytogenetic characterization and detection of chimaeric *EWS/ATF-1* transcripts

(明細胞肉腫由来細胞株の樹立とその性状)

学位論文内容の要旨

明細胞肉腫は軟部悪性黒色腫とも呼ばれ、若年成人の四肢に好発する稀な悪性腫瘍である。本腫瘍の特徴は約半数例にメラニンの産生が見られることと、細胞遺伝学的に12番染色体と22番染色体の相互転座が検出されることである。近年その転座の切断点が明かにされ、22番染色体上の *EWS* 遺伝子と12番染色体上の *ATF-1* 遺伝子が融合しキメラ転写産物 *EWS-ATF-1* が生じていることが見出された。*EWS* 遺伝子はEwing肉腫に高率に見られる22番染色体の転座の切断点に存在する遺伝子であり、RNA結合ドメインを有する蛋白をコードする。一方、*ATF-1* (Activating Transcriptional Factor) は *ATF/CREB* 蛋白に属する転写因子であり、多量体を形成しDNAとの結合に寄与すると考えられている *bZIP* ドメインを有する。12番染色体と22番染色体の相互転座により *EWS* はC末端側に位置するRNA結合ドメインを失い、代わりに *ATF-1* のC末端側に位置する *bZIP* ドメインが融合する。本腫瘍に由来する細胞株は融合蛋白 *EWS-ATF-1* の腫瘍発生への関与を明らかにする上で重要であるが、その報告は極めて少ない。われわれは、明細胞肉腫に由来する細胞株 KAO を樹立し、その性状について検討した。

【材料と方法】本細胞株は9才の女子の左大腿深部に発生した軟部腫瘍より樹立された。原発腫瘍の断面の一部には茶褐色の部分が存在し、組織学的には核小体の目立つ類円形の核を有する腫瘍細胞の瀰慢性あるいは巣状の増殖が見られた。また、Fontana-Masson染色で陽性となるメラニン顆粒が認められ、電子顕微鏡でも各成熟段階のメラノソーム及びプレメラノソームが観察された。病理診断は明細胞肉腫であり、広範切除、リンパ節郭清、及びDAV療法(DTIC100mg,VCR0.8mg,ACNV50mg)を5クール施行された。手術材料の一部を1%コラゲナーゼを用いた分散培養法でcollagen-coated dishに初代培養した。培養には10%FBS添加のRPMI-1640を用いた。その後、3分の1から2分の1の希釈で継代を続け、現在80数代にいたっている。この細胞株の位相差顕微鏡による形態、倍加時間、免疫組織化学(ABC法)、電子顕微鏡による観察、ヌードマウスへの移植性につき検索した。また、16,17,18代の細胞についてトリプシン処理によるG-bandingをおこない核型を決定した。キメラ転写産物 *EWS-ATF-1* を検索するために、reverse transcriptase -PCR (RT-PCR)を行った。腫瘍細胞よりISOGENを用いてtotal RNAを抽出し、その1  $\mu$  gより逆転写酵素を用いてcDNAを作製した。これを鋳型とし、*EWS* と *ATF-1* 上の各々のprimerを用いて、キメラ遺伝子の切断点を含む部位をPCRで増幅した。さらに、*ATF-1* の塩基配列に一致する、<sup>32</sup>Pでラベルしたオリゴプローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションを行い、PCR産物を確認した。対照として皮膚原発の悪性黒色腫と滑膜肉腫を用いた。PCR産物は、非対称PCRにより一本鎖DNAを作製し7-DEAZA sequencing kitにより塩基配列を決定した。

【結果】樹立した細胞株は長紡錘型ないしはこん棒様の細胞が主体を占め、多角形の細胞も交えて、交錯しつつ増殖していた。倍加時間は約34時間であった。免疫組織化学的には抗vimentin、抗メラノーマ特異抗体HMB45抗体を用いた免疫染色では陽性、抗EMA、抗サイトケラチン、抗S-100蛋白抗体では陰性であった。電子顕微鏡では腫瘍細胞内に豊富な細胞小器官がみられ、皮膚原発悪性黒色腫で見られるものと同様の異常なメラノソームが観察された。腫瘍細胞はヌードマウスの皮下に容易に腫瘍を形成し、その組織像は原発腫瘍のそれと同様でメラニンの産生が見られた。細胞遺伝学的に腫瘍細胞の染色体数は31から103のあいだに分布し、モードは58であった。12番と22番染色体の相互転座t(12;22)(q13;q12)、4番から9番、1番から13番染色体への転座t(4;9)(q11;p11)、t(1;13)(q11;p11)、および7番染色体のpolysomyは、モードである58の染色体数を持つ18個の分裂像すべてに存在した。RT-PCRでは、KAOのみに約950塩基対のPCR産物を生じ、他の腫瘍ではDNAの増幅は見られなかった。サザンブロットハイブリダイゼーションにより、増幅されたPCR産物のバンドに一致するシグナルが得られた。PCR産物の塩基配列は、EWS遺伝子の全exon 17個中、exon 8までの5'側とATF-1遺伝子の3'側が融合したものであり、Zucmanらにより報告されたものと一致した。

【考察】本細胞株は、ヌードマウスの皮下に腫瘍を形成し、その組織像が原発腫瘍のそれと類似すること、また原発腫瘍、細胞株、移植腫瘍ともにメラニンの形成が見られることなどより、原発の明細胞肉腫の性格を維持していると考えられる。細胞遺伝学的には、現在までに報告されている18例の明細胞肉腫の核型のうち11例が12番と22番染色体の相互転座を有しており、本細胞株の核型もこの結果を支持する結果となった。さらに本細胞株でも、この相互転座によって22番染色体上のEWS遺伝子と12番染色体上のATF-1遺伝子が融合しておりキメラ転写産物が転写されていることを明らかにした。EWS蛋白はN末端側にグルタミン、チロシン、セリンに富む変則的な繰り返し配列を持ち、C末端側にRNA結合ドメインを有する。一方、相互転座で再構成された融合蛋白ではC末端側のRNA結合ドメインがATF-1の多量体形成に必要なbZIPドメインに置き換えられる。ATF-1は多量体を形成しDNAに結合すると考えられている。また、ATF-1の転写活性はcAMPによって調整されているが、その調整に関与するprotein kinase Aのリン酸化部位をEWS-ATF-1では欠損している。EWSはEwing肉腫でFLI-1などの転写因子と融合蛋白を形成するが、その際EWSは転写因子の活性を上昇させる可能性が報告されている。融合蛋白EWS-ATF-1でもATF-1の転写活性がcAMPには依存せずEWSによって上昇させられている可能性が考えられる。t(12;22)は明細胞肉腫に特異的でしかも腫瘍発生の初期から存在する染色体異常であり、それによって生じる融合蛋白EWS-ATF-1が明細胞肉腫発生に関わっていることは十分考えられる。本細胞株を用いることによってこの融合蛋白の機能、特に腫瘍原性に関する役割をさらに解明することが期待される。また、キメラ転写産物を検索するために用いたRT-PCR法は核型を検索することが困難な固形腫瘍の相互転座を検出するために有用な方法であり、今後、骨軟部腫瘍の鑑別診断に大きな役割を果たすと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 金 田 清 志

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

## 学 位 論 文 題 名

### Establishment of a new continuous clear cell sarcoma cell line Morphological and cytogenetic characterization and detection of chimaeric *EWS/ATF-1* transcripts

(明細胞肉腫由来細胞株の樹立とその性状)

明細胞肉腫は軟部悪性黒色腫とも呼ばれ、若年成人の四肢に好発する稀な悪性腫瘍である。本腫瘍の特徴は、12番染色体と22番染色体の相互転座が検出されることである。転座により22番染色体上の *EWS* 遺伝子と12番染色体上の *ATF-1* 遺伝子が各々切断され、*EWS* の5'側と *ATF-1* の3'側が融合しキメラ転写産物 *EWS-ATF-1* が生じる。*EWS* 遺伝子はEwing肉腫に見られる22番染色体の転座の切断点に存在する遺伝子であり、N末端ドメインはC末端側に融合する転写因子の活性を促進することが知られている。*ATF-1* はcAMP依存性の転写因子であるが、*EWS* との融合蛋白では転写活性に必要なN末端側ドメインを失っている。融合蛋白は腫瘍発生に関与していると考えられるが、その機能を解析するための明細胞肉腫由来細胞株は極めて少なく、新しい細胞株が必要とされている。われわれは、明細胞肉腫に由来する細胞株 KAO を樹立し、その性状について検討した。

本細胞株は9才の女子の左大腿に発生した軟部腫瘍より樹立された。原発腫瘍にはメラニン顆粒が認められ、電子顕微鏡でもメラノソームが観察された。手術材料の一部を1% コラゲナーゼを用いた分散培養法で collagen-coated dish に初代培養し継代を続け、現在80数代にいたっている。樹立した細胞株は長紡錘型ないしはこん棒様の細胞が主体を占め、多角形の細胞も交えて、交錯しつつ増殖していた。倍加時間は約34時間であった。抗 vimentin、抗メラノーマ特異抗体 HMB45 抗体を用いた免疫染色で陽性であった。電子顕微鏡では異常なメラノソームが観察された。腫瘍細胞はヌードマウスの皮下に容易に腫瘍を形成し、その組織像は原発腫瘍のそれと同様であった。腫瘍細胞の染色体標本では多数のマーカー染色体がみられたが、12番と22番染色体の相互転座は、検索したすべての分裂像に存在した。*EWS*、*ATF-1* の塩基配列に一致する primer を用いた RT-PCR では、約950塩基対の PCR 産物を生じ、塩基配列は *EWS* 遺伝子の exon 8 と *ATF-1* 遺伝子のコドン 65 が融合したものであった。本細胞株を用いることによって融合蛋白 *EWS-ATF-1* の機能、特に腫瘍原性に関する役割をさらに解明することが期待される。

また、キメラ転写産物を検索するために用いた RT-PCR 法は核型を検索することが困難な固形腫瘍の相互転座を検出するために有用な方法である。現在までに92例の骨軟部腫瘍を検索し、明細胞肉腫3例、Ewing肉腫を含めた peripheral primitive neuroectodermal tumor (pPNET) 14例、滑膜肉腫14例、蜂巣状横紋筋肉腫2例、計33例の遺伝子診断が可能であった。明細胞肉腫では上記のキメラ転写産物に加え、*EWS* exon 7 と *ATF-1* コドン 110

が融合した新しい転写産物が確認された。また、原発巣が自然消退した皮膚原発悪性黒色腫の転移巣ではキメラ転写産物が生じておらず、明細胞肉腫との鑑別が可能であった。リンパ腫などとの鑑別を要した large cell type の Ewing 肉腫にもキメラ転写産物 *EWS-FLI1* が確認され、確定診断が可能であった。骨原発の滑膜肉腫の存在がキメラ転写産物 *SYT-SSX* の存在により明かとなった。

学位申請者平賀博明の学位論文公開発表は、平成 10 年 2 月 4 日午前 10 時 50 分より医学部臨床大講堂において行われた。

主査吉木敬教授から紹介があった後、申請者はスライドを用い約 15 分にわたって学位論文内容の発表を行った。その後、長嶋和郎教授より明細胞肉腫におけるメラニン産生の機序、腫瘍組織あるいは患者の血清における融合蛋白同定の可能性、腫瘍のキメラ遺伝子 knock out による revert の可能性、金田清志教授からは腫瘍の遺伝子診断の普遍性、融合遺伝子の導入による組織型に一致した表現型の発現について、吉木敬教授からは、明細胞肉腫由来細胞株が希有である理由、当該腫瘍を発生した患者の遺伝子異常の背景、明細胞肉腫の発生母地、細胞株の長期継代による表現型の変化の有無、明細胞肉腫における他の癌遺伝子、癌抑制遺伝子の変異の有無について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切な回答を行った。質疑応答の時間は約 15 分であった。なお、出席者はおよそ 15 名であった。

以上、本研究は樹立した細胞株 KAO が原発の明細胞肉腫の性格を有し、キメラ転写産物 *EWS-ATF-1* が発現されていることを明らかにしたものである。さらに対象を発展させ、数種類の肉腫に関しても、RT-PCR を用いた遺伝子診断の実例とその有用性を示し、骨軟部腫瘍診断に非常に貢献した。よって、審査員一同は申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。