

TABLE 2. Immunophenotypic characterization of UET-13 transfectants and EFT cells

MPC status ^a	CD marker	UET-13	Result for ^b :								EFT status ^c
			UET-13TR		UET-13TR-EWS/FLI1		UET-13TR-EWS/ERG		RD-ES	SK-ES1	
			Tet ⁻	Tet ⁺	Tet ⁻	Tet ⁺	Tet ⁻	Tet ⁺			
M+	CD29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M+	CD59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M+	CD90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E+
M+	CD105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M+	CD166	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M+	CD44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M+	CD73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M+	CD10	+	+	+	+	Down	+	Down	-	-	
M+	CD13	+	+	+	+	Down	+	Down	-	-	
M+	CD49e	+	+	+	+	Down	+	Down	+	-	
M+	CD61	+	+	+	+	Down	+	Down	-	-	
M+	CD55	+	+	+	+	Down	+	+	+	-	
M+	CD54	-	-	-	-	Up	-	Up	+	+	E+
M(-)	CD117	-	-	-	-	Up	-	Up	+	+	E+
M+/-	CD271	-	-	-	-	Up	-	Up	+	+	E+
	CD40	-	-	-	-	-	-	-	+	+	E+
	CD56	-	-	-	-	-	-	-	+	+	E+
M(-)	CD133	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
M(-)	CD14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M(-)	CD34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M(-)	CD45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

^a M(-), negative for MPCs; M+/-, positive for BM-derived MPCs but negative after in vitro culture; M+, positive for MPCs.
^b +, most cells positive; -, negative; Up, up-regulated by tetracycline treatment; Down, down-regulated by tetracycline treatment. Boldface indicates the antigens the immunophenotypes of which were changed in favor of EFT. Tet⁻, tetracycline negative; Tet⁺, tetracycline positive.
^c E+, positive for EFTs.

presented in Fig. 4C and D, the results clearly showed that the majority of CD99⁺ cells were significantly smaller in both whole-cell size and nuclear size than the CD99⁻ cells. Moreover, CD99⁺ cells also had a substantially increased N/C ratio (Fig. 4E). These results indicated that EWS/ETS expression promoted CD99 expression in UET-13 cells, and CD99 expression status is correlated with the degree of morphological change.

EWS/ETS expression altered the immunophenotype of UET-13 cells. Human MPCs reveal a characteristic expression of several surface antigens and can be identified on the basis of the reactivity with a set of monoclonal antibodies against CD antigens (25, 42). On the other hand, some CD antigens are characteristically expressed on EFT cells (17, 28, 33). Using the combinations of these antibodies listed in Table 2, which are useful for the immunodetection of either MPCs or EFT cells, we further examined whether EWS/ETS expression affects the immunophenotype of UET-13 cells and compared its effect with that on the immunophenotype of EFT cell lines (Table 2 and Fig. 5). As shown in Table 2, UET-13 cells express most of the human primary MPCs markers. Some of the antigens expressed in MPCs, namely, CD29, CD59, CD90, CD105, and CD166, were also found to be expressed in EFT cell lines, but others, namely, CD10, CD13, CD44, CD61, and CD73, were not. In contrast, antigens recognized to be present in EFT cells, including CD40, CD56, and CD133, were absent from UET-13 cells. Interestingly, when the effect of tetracycline-mediated EWS/ETS expression on the immunophenotype of UET-13 cells was tested, levels of some of the antigens present in UET-13 cells, such as CD10, CD13, and CD61, were found to be decreased (Fig. 5). In contrast, some of the markers found

in EFT cells, i.e., CD54, CD117, and CD271, became positive in UET-13TR-EWS/ETS cells after tetracycline treatment. Because UET-13TR cells did not show such immunophenotypic change upon treatment with tetracycline, these results indicated that, at least in part, the immunophenotype of UET-13 cells was changed in favor of EFT in the presence of EWS/ETS.

EWS/ETS in UET-13 cells modulates EFT-like gene expression. To further examine the molecular mechanism of EWS/ETS-dependent cellular modulation in human mesenchymal progenitor background, we performed DNA microarray-based expression profiling using the Affymetrix human genome U133 Plus 2.0 array. As a first step to this approach, we validated our experimental systems by analyzing the sequential changes of known EWS/ETS target genes, i.e., inhibitor of differentiation 2 (ID2) (14, 39), NK2 transcription factor related, locus 2 (NKX2.2) (9, 48), and insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) (41). Consistent with previous reports, levels of ID2 and NKX2.2 increased with the expression of EWS/ETS in a time-dependent manner, whereas the expression level of IGFBP3 decreased (Fig. 6A). Employing the same procedure, we also examined whether the change of surface antigen expression was regulated at the transcriptional level and determined the mRNA expression levels of some surface antigens in UET-13 transfectants with or without tetracycline treatment. In accordance with the results of immunocytometric and immunohistological experiments, the mRNA expression levels of CD10, CD13, CD49e, and CD61 were decreased, while those of CD54, CD99, CD117, and CD271 were markedly increased in tetracycline-treated UET-13TR-EWS/ETS cells (Fig. 6B and C), indicating that the expression of these antigens is

T2/AQ-J

F5

F6

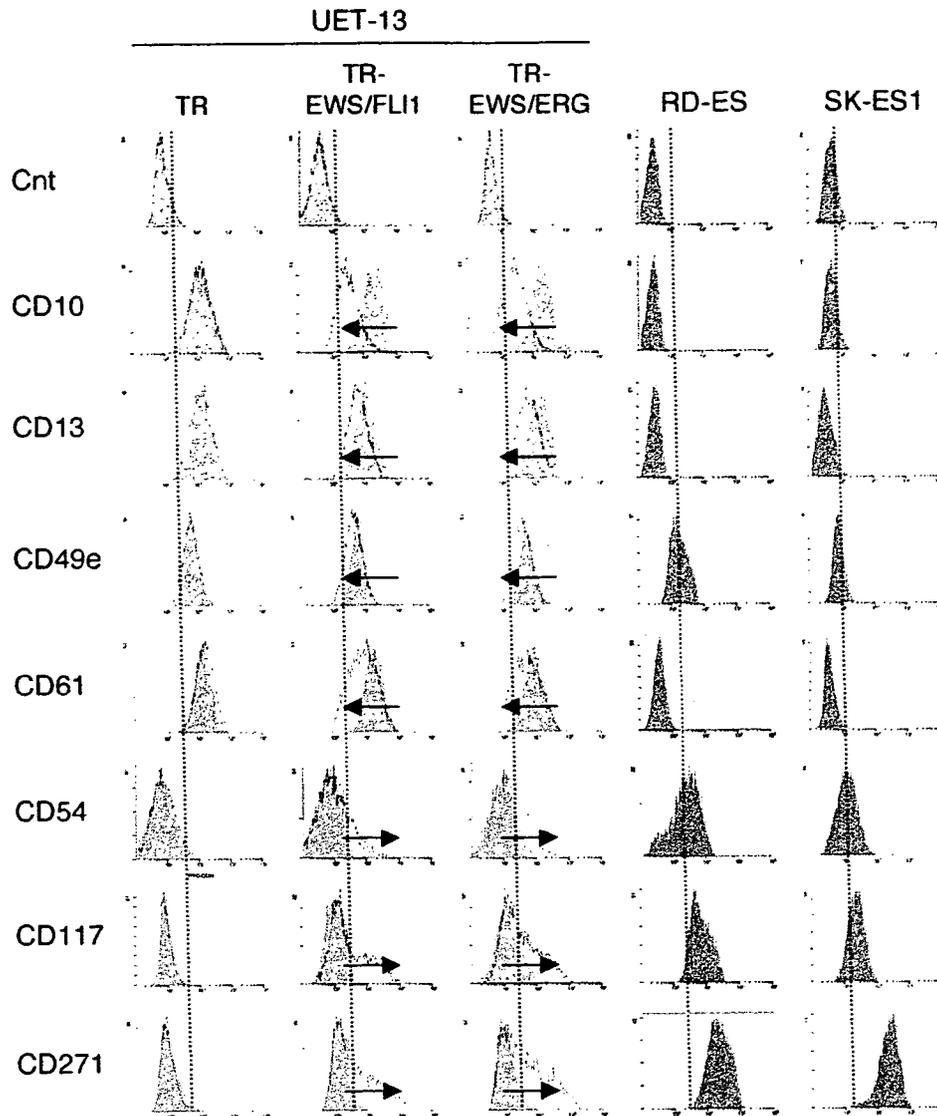


FIG. 5. Immunophenotypic change on induction of EWS/ETS expression in UET-13 cells. UET-13 transfectants were cultured with or without 3 μ g/ml of tetracycline for 1 week and flow cytometric analyses were performed by using a set of antibodies as indicated. The histograms of UET-13 transfectants with (empty) and without (gray) tetracycline treatment were overlaid. Dotted lines indicate fluorescence intensities in negative control panels (Cnt). Arrows indicate the immunophenotypic change caused by tetracycline. The immunophenotypes of the EFT cell lines RD-ES and SK-ES1 were also examined.

controlled at the transcriptional level in the presence of EWS/ETS.

We next investigated the candidate genes whose expression is regulated by EWS/ETS in human MPCs. First, we selected the genes with up-regulated or down-regulated expression by EWS/ETS induction using gene cluster analysis (Fig. 7A; UET-13TR-EWS/FLI1 up, 4,294 probes; down, 4,103 probes; UET-13TR-EWS/ERG up, 3,358 probes; down, 3,705 probes). To reduce the number of the candidate genes, we selected up-regulated genes that are expressed in tetracycline-treated cells at least 1.5-fold higher than in untreated cells (UET-13TR-EWS/FLI1, 1,137 probes; UET-13TR-EWS/ERG, 835 probes). Similarly, the down-regulated genes that are expressed in tetracycline-treated cells at least 0.75-fold lower than in untreated cells (UET-

13TR-EWS/FLI1, 1,803 probes; UET-13TR-EWS/ERG, 773 probes). By selecting common probes in both cells, we finally identified a group of candidate genes significantly controlled by EWS/ETS induction in the human mesenchymal progenitor background. Since microarray analysis was performed as a global screening in single experiments, it is likely that there is a fair bit of noise in the derived gene profiles due to the lack of replicate data. This may account in part for the limited overlap between the profiles induced by EWS-FLI1 and EWS-ERG, whereas we still identified 349 probes of common up-regulated genes and 293 probes of common down-regulated genes (see the supplemental material). In addition to the EFT-specific genes mentioned above, these contained those previously described as EFT-specific genes, such as those for OB-cadherin/cadherin-11 (31), Janus

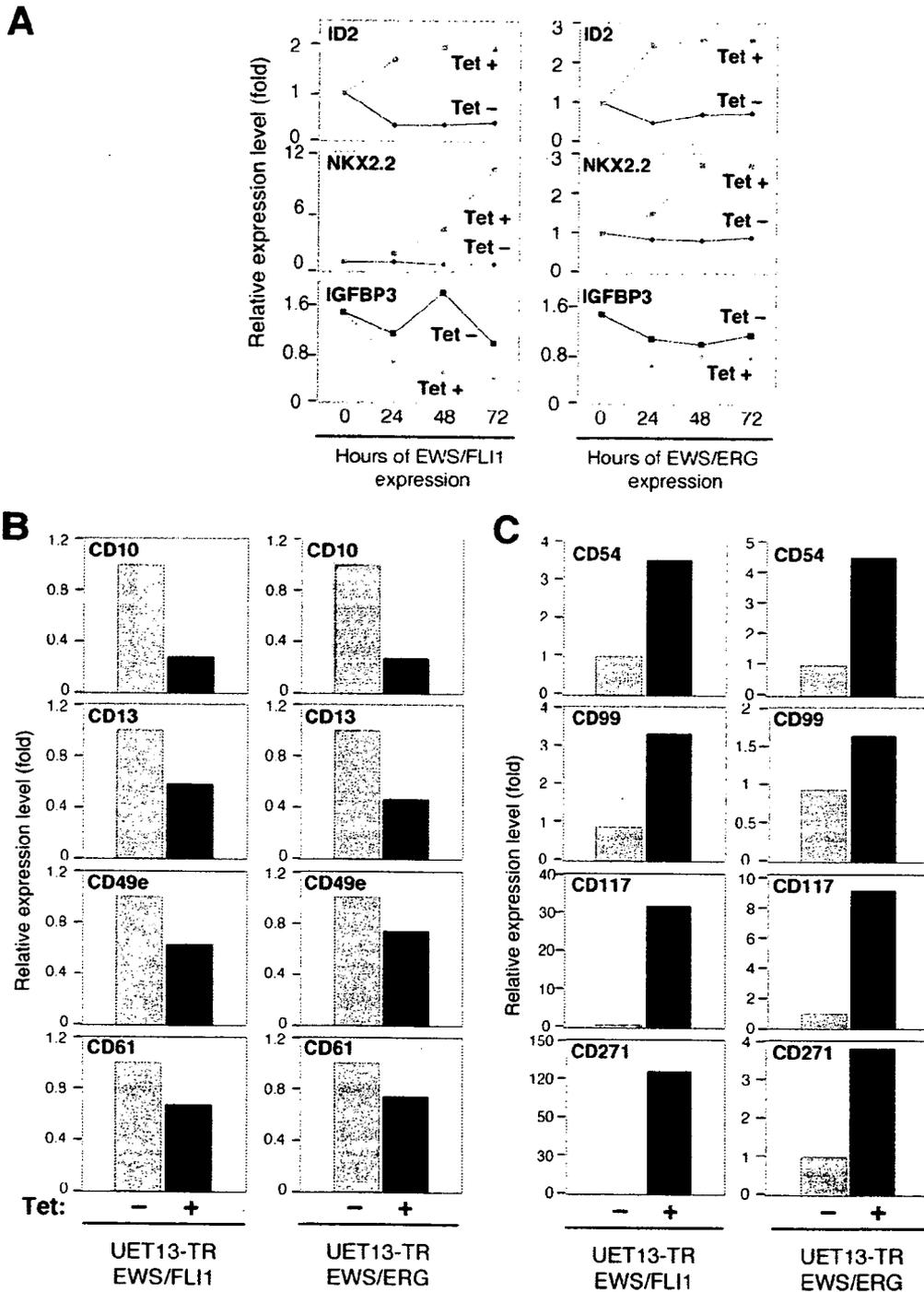
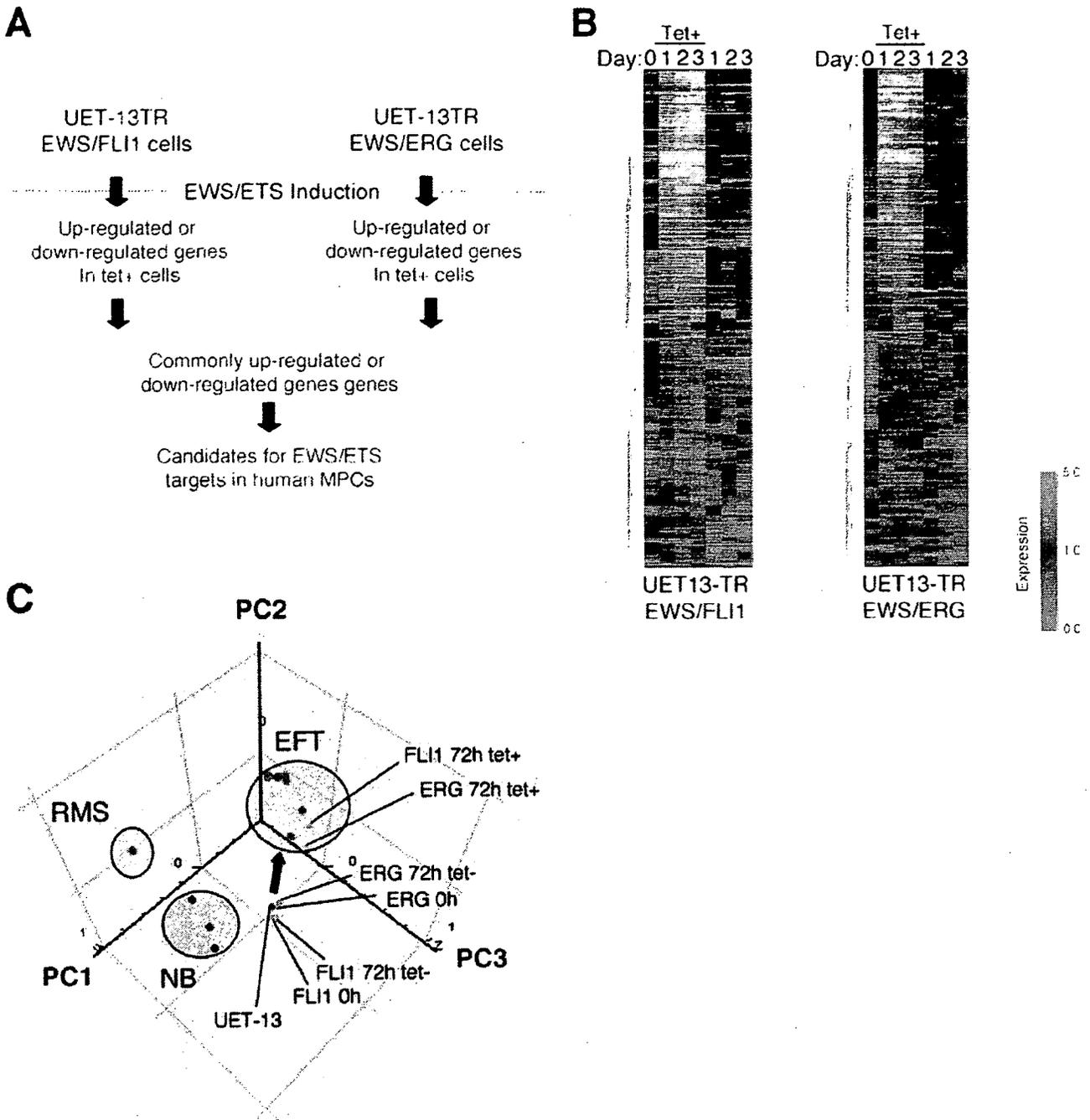


FIG. 6. The change of expression profile on induction of EWS/ETS in UET-13 cells. UET-13TR-EWS/FLI1 and UET-13TR-EWS/ERG cells were cultured in the absence or presence of tetracycline (Tet) for the indicated periods and analyzed using the Affymetrix human genome U133 Plus 2.0 array as described in Materials and Methods. (A) The sequential changes of ID2, NKX2.2, and IGFBP3 mRNA levels in UET-13 transfectants upon treatment with or without tetracycline. Diamond symbols indicate UET-13 transfectants in the absence of tetracycline; box symbols indicate UET-13 transfectants in the presence of tetracycline. (B and C) Microarray studies for the determination of expression profiles of surface antigens in UET-13 transfectants. UET-13 transfectants were treated with or without 3 μ g/ml of tetracycline for 72 h. mRNA levels were determined with the Affymetrix human genome U133 Plus 2.0 array.

kinase 1 (JAK1) (49), keratin 18, and six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (SITEAP) (22). The expression pattern of these genes (642 probes) in UET-13 transfectants in the absence or presence of tetracycline is shown in the gene cluster in

Fig. 7B. The expression of these genes was indeed changed significantly after EWS/ETS expression in both cells. They included genes associated with signal transduction (such as those for epidermal growth factor receptor, FAS [CD95], and fibroblast



AO: 0

FIG. 7. Identification of candidates for the target of EWS/ETS in human MPCs by use of a microarray. UET-13TR-EWS/FLI1 and UET-13TR-EWS/ERG cells were cultured as described for Fig. 6 and analyzed using the Affymetrix human genome U133 Plus 2.0 array as described in Materials and Methods. (A) Scheme for the analysis of microarray data. (B) Gene cluster analysis of UET-13 transfectants in the absence or presence of tetracycline by use of 642 candidate genes for targets of EWS/ETS in human MPCs. (C) Visualization of sequential change by the gene expression profile in UET-13 transfectants following tetracycline-mediated EWS/ETS expression based on a PCA of 642 candidate genes. Deep blue plots indicate UET-13 cells. Light blue plots indicate UET-13 transfectants in the absence of tetracycline for 72 h. Yellow plots indicate UET-13 transfectants in the presence of tetracycline for 72 h. The pink circle indicates EFT cell lines expressing EWS/FLI1 (purple plots), EWS/ERG (red plot), and EWS/E1AF (light green plot). The light blue circle with blue plots indicates NB cell lines. The yellow circle with an orange plot indicates a rhabdomyosarcoma (RMS) cell line. Cut-off induction and repression levels are 1.5-fold and 0.75-fold, respectively. Tet, tetracycline.

AQ: K

growth factor receptor 1) and development (such as *jagged-1* and *frizzled-4*, -7, and -8). Interestingly, in addition to the surface antigens presented in Fig. 6B and C, the expression profiling of EWS/ETS-expressing UET-13 cells displayed the modulation of several genes associated with cell adhesion, cytoskeletal structure, and membrane trafficking, such as those for collagen-11 and -21, ephrin receptor-A2, -B2, and -B3, ephrin-B1, claudin-1, integrin- α 11, - α M, and - β 2, CD66 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1), and CD102 (intercellular cell adhesion molecule-2). They also included genes of chemokines CCL-2 and -3. These data raise the possibility that EWS/ETS can contribute to the membrane condition in human MPCs via the regulation of these cell surface molecules and chemokines.

Using these genes, we performed a PCA to visualize the shift in the gene expression pattern among the 642 probes. As shown in Fig. 7C, the plots of UET-13 transfectants treated with tetracycline became closer to those of EFT cells than to those of UET-13 transfectants without tetracycline treatment. These results indicated that the expression pattern of these genes was altered from that of UET-13 cells to that of EFT cells in an EWS/ETS-dependent manner. Since the gene expression profile of UET-13 cells is similar to those of other cell types of mesenchymal origin (data not shown), our results highlighted that the phenotypic alteration from mesenchyme to EFT-like cells in UET-13 cells induced by tetracycline treatment was accompanied by a change in the global gene expression profile.

EWS/ETS expression enhances the Matrigel invasion of UET-13 cells. To assess the role of EWS/ETS in malignant transformation in human MPCs, UET-13 transfectants were examined by invasion assay. As shown in Fig. 8A, tetracycline treatment did not affect the Matrigel invasion ability of UET-13TR cells. When examined similarly, however, tetracycline treatment resulted in an apparently increased invasion ($P < 0.05$) for both UET-13TR-EWS/FLI1 (Fig. 8B) and UET-13TR-EWS/ERG (Fig. 8C) cells. The results indicated that EWS/ETS expression can induce Matrigel invasion properties in human MPCs.

DISCUSSION

In the present study, using UET-13 cells as a model of human MPCs, we demonstrated that ectopic expression of EWS/ETS promoted the acquisition of an EFT-like phenotype, including cellular morphology, immunophenotype, and gene expression profile. Moreover, EWS/ETS expression enhances the Matrigel invasion ability of UET-13 cells. This assay is thought to mimic the early steps of tumor invasion in vivo (34), and the ability to penetrate the Matrigel has been positively correlated with invasion potential in several studies. Therefore, we concluded that EWS/ETS expression could mediate a part of the feature of tumor transformation in human MPCs. Thus, our culture system would provide a good model for testing the effects of EWS/ETS in human MPCs.

Several lines of evidence have indicated the transforming ability of EWS/FLI1, whereas that of EWS/ERG is not yet to be clarified. Therefore, it is noteworthy that our data demonstrated that EWS/ERG could promote an EFT-like phenotype in UET-13 cells similarly to EWS/FLI1. Thus, EWS/ERG also has the ability to induce an EFT-like phenotype in the human

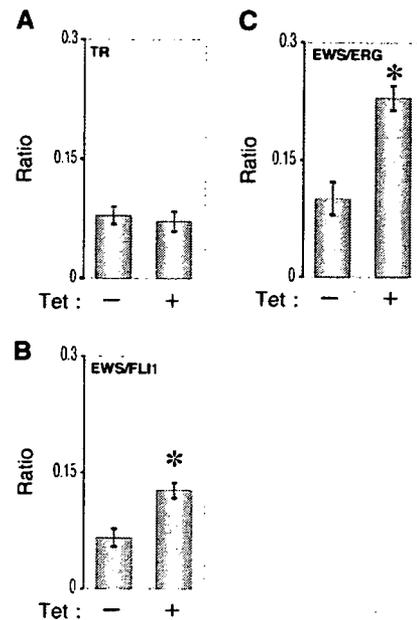


FIG. 8. Effects of EWS/ETS expression on the Matrigel invasion ability of UET-13 cells. UET-13TR (A), UET-13TR-EWS/FLI1 (B), and UET-13TR-EWS/ERG (C) cells were cultured in the absence or presence of tetracycline (Tet) for 72 h and then plated (2.5×10^4) on Matrigel-coated or uncoated filter inserts. After 20 h of culture, invading cells were stained with hematoxylin-eosin and counted in five fields per membrane as described in Materials and Methods. *, $P < 0.05$.

F8

system. The major steps in the development of EFT should be commonly regulated by distinct chimeric EWS/ETS proteins. Indeed, several genes are common transcriptional targets of different chimeric EWS/ETS proteins in the murine system (11, 24, 35). Our data also showed that the 642 probes are coregulated in both EWS/FLI1-expressing cells and EWS/ERG-expressing cells. Further comparative studies of both the EWS/FLI1- and the EWS/ERG-mediated onset of EFT could allow us to understand the common functions of EWS/FLI1 and EWS/ERG in EFT. In addition, our systems are also useful for precisely distinguishing between the functions of these chimeric molecules in the development of EFT.

As mentioned above, the immunophenotypic analysis also revealed that the expression profiles of surface antigens in UET-13 cells were changed in favor of EFT cells in the presence of EWS/ETS (Fig. 4). Notably, the expression of CD54 (intercellular cell adhesion molecule-1 [ICAM1]), CD117 (c-kit), and CD271 (low-affinity nerve growth factor receptor [LNGFR]) increased in EWS/ETS-expressing UET-13 cells. These markers are positive in EFT cell lines (17, 28, 33), and in addition, CD117 is detected in about 40% of patient samples (17) and is negative in human primary MPCs (4, 43). Thus, it is reasonable to consider that a phenotypic marker of EFT was induced in UET-13 cells by EWS/ETS expression. On the other hand, CD54 and CD271 are positive in human primary MPCs (8, 25, 42), whereas these markers are negative in UET-13 cells. However, a previous report showed the disappearance of some positive markers, including CD271, from primary human MPCs during the process of ex vivo expansion

(25), and it has been speculated that the expression of these molecules in MPCs is induced *in vivo* via interaction with the bone marrow microenvironment and that the necessary stimuli are absent from *ex vivo* culture conditions. Therefore, the immunophenotype of UET-13 cells might be rather related to that of *ex vivo*-expanded primary human MPCs. In addition, it may be possible that EWS/ETS expression led to the reexpression of these disappeared markers in UET-13 cells without the necessary stimuli. In this case, the maintenance of CD271 expression outside of the bone marrow microenvironment might be a characteristic of EFT. Thus, our results proved that both EWS/FLI1 and EWS/ERG can be major causes of the expression of these markers and that human MPCs that precisely recapitulate the expression are strong candidates for the cell origins of EFT cells. The findings also imply that these antigens are suitable targets for diagnostic tools and new therapeutic agents. In fact, imatinib mesylate, which demonstrates anticancer activity against malignant cells expressing BCR-ABL as well as CD117 and platelet-derived growth factor receptor, inhibits proliferation and increases sensitivity to vincristine and doxorubicin in EFT cells (17).

Notably, our results also indicate that UET-13 cells, which have the MPC phenotype, possess the potential to acquire an EFT-like phenotype upon the expression of EWS/ETS. Unlike what is seen for human primary fibroblasts (31), ectopic EWS/ETS expression induces an EFT-like morphological change in human MPCs, suggesting that the cell type affects susceptibility to the events following EWS/ETS expression. In murine MPCs, retrovirally transduced EWS/FLI1 has been reported to induce the expression of CD99, a most useful marker for EFT, though the results are controversial (6, 45). However, our direct evidence obtained with UET-13 cells clearly demonstrated that CD99 expression is induced by EWS/ETS proteins in human MPCs. Moreover, we showed that the expression of CD99 might correlate with EWS/ETS-mediated morphological change, whereas the functional role of CD99 and the correlation between CD99 expression status and EWS/ETS-mediated morphological change in the development of EFT remain unclear.

Consistent with the morphological and immunophenotypic changes, the expression pattern of a set of genes in EWS/ETS-expressing UET-13 cells shifted to that in EFT cells (Fig. 7C). Although EWS/ETS expression enhanced Matrigel invasion ability in UET-13 cells, it did not promote migratory ability and surface-independent growth, as assessed by migration assay and soft agar colony formation assay (data not shown). We also failed to develop EFT-like tumors by injecting EWS/ETS-inducing UET-13 cells into irradiated nude mice treated with tetracycline (data not shown). These results imply that EWS/ETS expression is not sufficient to induce the full transformation in UET-13 cells, and other genetic abnormalities not regulated by EWS/ETS could still be required for the full transformation of human MPCs into EFT cells. An identification of these genes will greatly improve our understanding of the additional genetic lesions that occur after EWS/ETS expression. The genes expressed in EFT cell lines but not in EWS/ETS-expressing UET-13 cells would be candidates for such genes. Identification of these genes will greatly improve our understanding of the additional genetic lesions that occur after EWS/ETS expression. The genes expressed in EFT cell

lines but not in EWS/ETS-expressing UET-13 cells would be candidates for such genes.

In summary, we reported the development of an inducible EWS/ETS expression system in UET-13 cells as a model for the development of EFT in MPCs. In our system, the chimeric genes alone are sufficient to confer EFT-like phenotypes, EFT-specific gene expression pattern, and partial but not full features of malignant transformation. Further analysis using our system should elucidate the pathogenic mechanism by which EFTs develop from MPCs, especially the initiating events mediated by EWS/ETS expression. Our system should also aid in the identification of novel targets of the EWS/ETS-mediated pathway as potential anticancer targets.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by health and labor sciences research grants (the 3rd-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control [H19-010], Research on Children and Families [H18-005 and H19-003], Research on Human Genome Tailor Made, and Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices [H18-005]) and a grant for child health and development from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, JSPS (Kakenhi 18790263). This work was also supported by a CREST, JST grant from the Japan Health Sciences Foundation for Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices and the Budget for Nuclear Research of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, based on screening and counseling by the Atomic Energy Commission. Y. Miyagawa is an awardee of a research resident fellowship from the Foundation for Promotion of Cancer Research (Japan) for the 3rd-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control.

We are grateful to T. Motoyama for the NRS-1 cell line. We respectfully thank S. Yamauchi for her secretarial work and M. Itagaki for many helpful discussions and support.

REFERENCES

- Akagi, T. 2004. Oncogenic transformation of human cells: shortcomings of rodent model systems. *Trends Mol. Med.* 10:542-548.
- Ambros, I. M., P. F. Ambros, S. Strehl, H. Kovar, H. Gardner, and M. Salzer-Kuntschik. 1991. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 67:1886-1895.
- Arvand, A., and C. T. Denny. 2001. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 20:5747-5754.
- Bertani, N., P. Malatesta, G. Volpi, P. Sonogo, and R. Perris. 2005. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J. Cell Sci.* 118:3925-3936.
- Bloom, E. T. 1972. Further definition by cytotoxicity tests of cell surface antigens of human sarcomas in culture. *Cancer Res.* 32:960-967.
- Castillero-Trejo, Y., S. Eliazar, L. Xiang, J. A. Richardson, and R. L. Ilaria, Jr. 2005. Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells results in EWS/FLI-1-dependent, Ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res.* 65:8698-8705.
- Colter, D. C., I. Sekiya, and D. J. Prockop. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:7841-7845.
- Conget, P. A., and J. J. Minguell. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 181:67-73.
- Davis, S., and P. S. Meltzer. 2006. Ewing's sarcoma: general insights from a rare model. *Cancer Cell* 9:331-332.
- Deneen, B., and C. T. Denny. 2001. Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. *Oncogene* 20:6731-6741.
- Deneen, B., S. M. Welford, T. Ho, F. Hernandez, I. Kurland, and C. T. Denny. 2003. PIM3 proto-oncogene kinase is a common transcriptional target of divergent EWS/ETS oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* 23:5897-5908.
- Eliazar, S., J. Spencer, D. Ye, E. Olson, and R. L. Ilaria, Jr. 2003. Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FLI-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma. *Mol. Cell. Biol.* 23:482-492.
- Fujii, Y., Y. Nakagawa, T. Hongo, Y. Igarashi, Y. Naito, and M. Maeda. 1989.

AQ: L

AQ: M

- Cell line of small round cell tumor originating in the chest wall: W-ES. Hum. Cell 2:190-191. (In Japanese.)
14. Fukuma, M., H. Okita, J. Hata, and A. Umezawa. 2003. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene* 22:1-9.
 15. Gilbert, F., G. Balaban, P. Moorhead, D. Bianchi, and H. Schlesinger. 1982. Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* 7:33-42.
 16. Girish, V., and A. Vijayalakshmi. 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J. Cancer* 41:47.
 17. Gonzalez, I., E. J. Andreu, A. Panizo, S. Inoges, A. Fontalba, J. L. Fernandez-Luna, M. Gaboli, L. Sierrasesumaga, S. Martin-Algarra, J. Pardo, F. Prosper, and E. de Alava. 2004. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 10:751-761.
 18. Hansen, M. B., S. E. Nielsen, and K. Berg. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119:203-210.
 19. Hara, S., E. Ishii, S. Tanaka, J. Yokoyama, K. Katsumata, J. Fujimoto, and J. Hata. 1989. A monoclonal antibody specifically reactive with Ewing's sarcoma. *Br. J. Cancer* 60:875-879.
 20. Hatori, M., H. Doi, M. Watanabe, H. Sasano, M. Hosaka, S. Kotajima, F. Urano, J. Hata, and S. Kokubun. 2006. Establishment and characterization of a clonal human extraskeletal Ewing's sarcoma cell line. EES1. *Tohoku J. Exp. Med.* 210:221-230.
 21. Homma, C., Y. Kaneko, K. Sekine, S. Hara, J. Hata, and M. Sakurai. 1989. Establishment and characterization of a small round cell sarcoma cell line, SCC11-196, with t(11;22)(q24;q12). *Jpn. J. Cancer Res.* 80:861-865.
 22. Hubert, R. S., I. Vivanco, E. Chen, S. Rustegar, K. Leong, S. C. Mitchell, R. Madraswala, Y. Zhou, J. Kuo, A. B. Raitano, A. Jakobovits, D. C. Saffran, and D. E. Afar. 1999. STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14523-14528.
 23. Hu-Lieskovan, S., J. Zhang, L. Wu, H. Shimada, D. E. Schofield, and T. J. Triche. 2005. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res.* 65:4633-4644.
 24. Im, Y. H., H. T. Kim, C. Lee, D. Poulin, S. Welford, P. H. Sorensen, C. T. Denny, and S. J. Kim. 2000. EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res.* 60:1536-1540.
 25. Jones, E. A., S. E. Kinsey, A. English, R. A. Jones, L. Straszynski, D. M. Meredith, A. F. Markham, A. Jack, P. Emery, and D. McGonagle. 2002. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 46:3349-3360.
 26. Khoury, J. D. 2005. Ewing sarcoma family of tumors. *Adv. Anat. Pathol.* 12:212-220.
 27. Kiyokawa, N., Y. Kokai, K. Ishimoto, H. Fujita, J. Fujimoto, and J. I. Hata. 1990. Characterization of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CD10) as an activation molecule on mature human B cells. *Clin. Exp. Immunol.* 79:322-327.
 28. Konemann, S., T. Bolling, A. Schuck, J. Malath, A. Kolkmeier, K. Horn, D. Riesenbeck, S. Hesselmann, R. Diallo, J. Vormoor, and N. A. Willich. 2003. Effect of radiation on Ewing tumour subpopulations characterized on a single-cell level: intracellular cytokine, immunophenotypic, DNA and apoptotic profile. *Int. J. Radiat. Biol.* 79:181-192.
 29. Kovar, H., and A. Bernard. 2006. CD99-positive "Ewing's sarcoma" from mouse bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells? *Cancer Res.* 66:9786.
 30. Kovar, H., M. Dworzak, S. Strehl, E. Schnell, I. M. Ambros, P. F. Ambros, and H. Gadner. 1990. Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* 5:1067-1070.
 31. Lessnick, S. L., C. S. Dacwag, and T. R. Golub. 2002. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 1:393-401.
 32. Lin, P. P., R. I. Brody, A. C. Hamelin, J. E. Bradner, J. H. Healey, and M. Ladanyi. 1999. Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 59:1428-1432.
 33. Lipinski, M., K. Braham, I. Philip, J. Wiels, T. Philip, C. Goridis, G. M. Lenoir, and T. Tursz. 1987. Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines. *Cancer Res.* 47:183-187.
 34. Lochter, A., A. Srebrow, C. J. Sympon, N. Terracio, Z. Werb, and M. J. Bissell. 1997. Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. *J. Biol. Chem.* 272:5007-5015.
 35. May, W. A., A. Arvand, A. D. Thompson, B. S. Braun, M. Wright, and C. T. Denny. 1997. EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nat. Genet.* 17:495-497.
 36. May, W. A., S. L. Lessnick, B. S. Braun, M. Klemsz, B. C. Lewis, L. B. Lunsford, R. Hromas, and C. T. Denny. 1993. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol. Cell. Biol.* 13:7393-7398.
 37. Miyagawa, Y., J. M. Lee, T. Maeda, K. Koga, Y. Kawaguchi, and T. Kusakabe. 2005. Differential expression of a Bombyx mori AHA1 homologue during spermatogenesis. *Insect Mol. Biol.* 14:245-255.
 38. Mori, T., T. Kiyono, H. Imabayashi, Y. Takeda, K. Tsuchiya, S. Miyoshi, H. Makino, K. Matsumoto, H. Saito, S. Ogawa, M. Sakamoto, J. Hata, and A. Umezawa. 2005. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol. Cell. Biol.* 25:5183-5195.
 39. Nishimori, H., Y. Sasaki, K. Yoshida, H. Irifune, H. Zembutsu, T. Tanaka, T. Aoyama, T. Hosaka, S. Kawaguchi, T. Wada, J. Hata, J. Toguchida, Y. Nakamura, and T. Tokino. 2002. The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene* 21:8302-8309.
 40. Ogose, A., T. Motoyama, T. Hotta, and H. Watanabe. 1995. In vitro differentiation and proliferation in a newly established human rhabdomyosarcoma cell line. *Virchows Arch.* 426:385-391.
 41. Prieur, A., F. Tirode, P. Cohen, and O. Delattre. 2004. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol. Cell. Biol.* 24:7275-7283.
 42. Quirici, N., D. Soligo, P. Bossolasco, F. Servida, C. Lumini, and G. L. Deliliers. 2002. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 30:783-791.
 43. Reyes, M., T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie, and C. M. Verfaillie. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625.
 44. Reyes, M., and C. M. Verfaillie. 2001. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938:231-235.
 45. Riggi, N., L. Cironi, P. Provero, M. L. Suva, K. Kaloulis, C. Garcia-Echeverria, F. Hoffmann, A. Trumpp, and I. Stamenkovic. 2005. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* 65:11459-11468.
 46. Riggi, N., M. L. Suva, and I. Stamenkovic. 2006. Ewing's sarcoma-like tumors originate from EWS-FLI-1-expressing mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* 66:3333-3341.
 47. Sekiguchi, M., T. Oota, K. Sakakibara, N. Inui, and G. Fujii. 1979. Establishment and characterization of a human neuroblastoma cell line in tissue culture. *Jpn. J. Exp. Med.* 49:67-83.
 48. Smith, R., L. A. Owen, D. J. Trem, J. S. Wong, J. S. Whangbo, T. R. Golub, and S. L. Lessnick. 2006. Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 9:405-416.
 49. Stage, M. S., C. Hutter, I. Neumann, S. Foja, U. E. Hattenhorst, G. Hansen, D. Afar, and S. E. Burdach. 2004. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res.* 64:8213-8221.
 50. Takeda, Y., T. Mori, H. Imabayashi, T. Kiyono, S. Gojo, S. Miyoshi, N. Hida, M. Ito, K. Segawa, S. Ogawa, M. Sakamoto, S. Nakamura, and A. Umezawa. 2004. Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J. Gene Med.* 6:833-845.
 51. Tondreau, T., N. Meuleman, A. Delforge, M. Dejeneffe, R. Leroy, M. Massy, C. Mortier, D. Bron, and L. Lagneaux. 2005. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 23:1105-1112.
 52. Torchia, E. C., S. Jaishankar, and S. J. Baker. 2003. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res.* 63:3464-3468.
 53. Woodbury, D., E. J. Schwarz, D. J. Prockop, and I. B. Black. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61:364-370.

小児腫瘍・胚細胞腫瘍における癌幹細胞

大喜多 肇* 秦 順一*
清河信敬*

はじめに

小児腫瘍、なかでも神経芽腫、Wilms腫瘍、肝芽腫に代表される胎児性腫瘍は、乳幼児期に好発する。これらの腫瘍は、胎生期の発生途上の組織が腫瘍化すると想定され、腫瘍細胞が発生母地の有する分化能を保持している。一方、胚細胞腫瘍は、原始生殖細胞から配偶子へ分化する過程の生殖細胞に由来する腫瘍であり、他の腫瘍と比較して広範な分化能を有しており、胚体外組織を含むさまざまな組織へ分化する。そのなかに多分化能を有する幹細胞が存在することが古くより示唆されてきた。近年、癌幹細胞の概念が脚光を浴びているが、胎児性腫瘍と胚細胞腫瘍は、その原型といえることができるであろう。ここでは、胎児性腫瘍の幹細胞的性格と近年における癌幹細胞研究の現状、胚細胞腫瘍の幹細胞としての特性について概説する。

I. 小児腫瘍

1. 胎児性腫瘍

胎児性腫瘍は、胎児組織に由来する腫瘍であり、主に新生児期から乳幼児期にかけて発生する。発生途上の器官、組織の原基が発生母地と考えられており、腫瘍細胞が発生母地の有する分化能・成熟能を形態学的、機能的に保持している。代表的な胎児性腫瘍としては、神経芽腫、腎芽腫、肝芽腫、網膜芽腫、髄芽腫などが挙げられる。成人の癌の場合は、組織の幹細胞、前駆細胞あるいは分化・成熟した細胞から腫瘍が発生すると考えられており、癌幹細胞の存在が想定されている。しかし、この幹細胞が発生母地であるのか、癌化の過程で幹細胞的性質を得るのかは解明されていない。これに対して、胎児性腫瘍の場合は、発生母地が、

元々自己複製能と多分化能を有する組織形成の原基(芽組織)であることが特徴であり、幹細胞の性質を有する組織から腫瘍が発生している可能性が極めて高い。そこでまず、胎児性腫瘍のなかでも腎芽腫を例に挙げ、腫瘍細胞の有する幹細胞的性質に関して概説し、次に胎児性腫瘍における癌細胞研究の現状について、研究が先行している神経芽腫、網膜芽腫での知見を解説したい。

2. 腎芽腫(Wilms腫瘍)

腎芽腫(Wilms腫瘍)は、代表的な胎児性腫瘍であり、小児腎腫瘍では最も頻度が高い。本腫瘍は、胎生期腎組織(後腎組織)と類似した組織像を示すことが特徴である。ヒトでは、胎生5週頃に中間中胚葉の尾側に造後腎間葉が形成され、中腎管から尿管芽と呼ばれる上皮の管を誘導する。造後腎間葉には、後腎芽細胞と呼ばれる未熟な間葉系細胞が存在する。尿管芽は造後腎間葉の凝集と分化を誘導し、分岐を繰り返す。最終的には造後腎間葉より、糸球体や近位尿細管、遠位尿細管や間質が、尿管芽からは集合管や尿管が、それぞれ形成され、腎が形作られる。これに対してWilms腫瘍は、胎児期の後腎芽細胞に類似する腫瘍細胞(blastemal cell)と共に上皮成分、間葉成分から構成される(図1)。上皮成分には尿細管や糸球体に類似した上皮、稀に異所性上皮(扁平上皮、粘液上皮など)がみられる。間葉成分としては、未分化な線維芽細胞様細胞から成る間葉組織、通常、腎には存在しない横紋筋がみられる。まれに平滑筋、軟骨、脂肪組織などがみられることがある。後腎組織成分が優位な腫瘍、上皮成分が優位な腫瘍、間葉成分が優位な腫瘍など、さまざまである。Wilms腫瘍は、胎児性腫瘍のなかでも最も器官発生を模倣する腫瘍であり、1つのWilms腫瘍内に腎発生過程が再現されるということもできる。また、Wilms腫瘍の前駆病変として造腎組織遺残 nephrogenic rest(腎芽腫症 nephroblastomatosis)が知られている。造腎組織遺残は、生後の腎実質内に後

*国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部

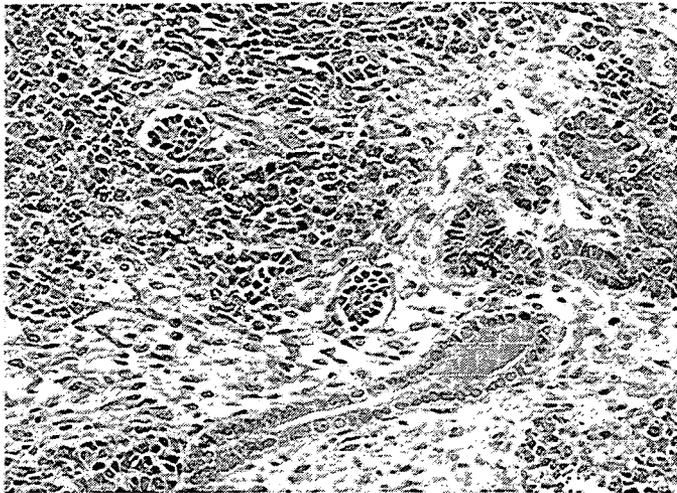


図1 Wilms腫瘍の組織像 後腎芽細胞類似細胞と共に、未熟な尿管、糸球体様構造を認める。

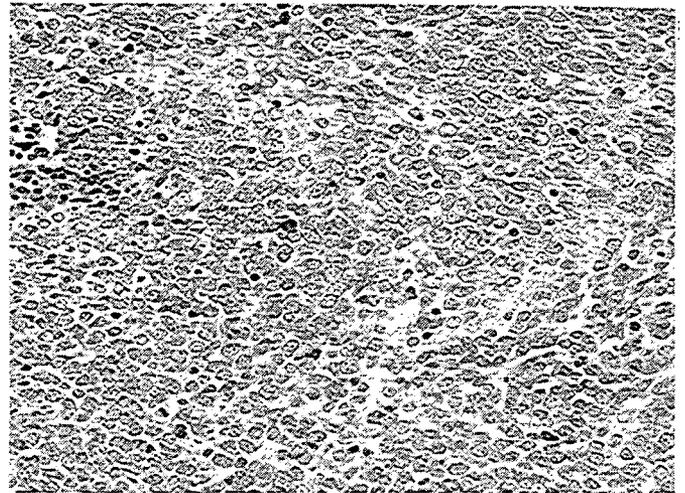


図2 神経芽腫の組織像 未熟な神経芽細胞が神経細線維を伴って増殖している。

腎組織類似組織が巣状に遺残する病変であり、多巢性ないしびまん性に認められる場合は、腎芽腫症と呼ばれる。Wilms腫瘍では、15～30%程度に造腎組織遺残あるいは腎芽腫症を合併すると考えられる。このこともWilms腫瘍が胎児期の後腎組織を発生母地とし、胎児期の未熟な腎組織（後腎組織）の異常な増殖により発生することの一つの根拠となっている。

Wilms腫瘍のblastemal cellが発生途上の後腎芽細胞に形態学的に類似すること、1つの腫瘍内にblastemal cell、上皮、間葉成分が混在する場合でも、共通の遺伝子異常が認められ、共通の腫瘍性幹細胞から上皮、間葉成分が生じていると考えられること、blastemal cellが幹細胞に特有に発現する遺伝子群を発現することなどから、Wilms腫瘍内に存在するblastemal cellが多分化能と自己複製能を含む幹細胞的性質を有すると想定される。また、本腫瘍のなかには化学療法によってblastemal cellが消失して間葉成分（特に横紋筋成分）のみが残存する症例が存在するが、このような症例はviableな腫瘍成分が残存するにもかかわらず予後良好であること、一方、化学療法によってもblastemal cellがびまん性に残存する腫瘍では予後が悪いことなども、blastemal cell中に癌幹細胞が含まれているとの仮説を支持する所見である。以上のように、Wilms腫瘍のblastemal cellが発生途上の後腎芽組織と同様の幹細胞的性格を有する組織であること、Wilms腫瘍のblastemal cellのなかには癌幹細胞が含まれている可能性が高いことが想定されるが、Wilms腫瘍は培養実験系が難しいこともあり、腫瘍内に存在

する癌幹細胞の同定はなされていない。

3. 神経芽腫

神経芽腫は、最も代表的な小児期の固形腫瘍で、神経堤を発生母地とする。神経堤は、神経板の側方から発生する胎児期に一過性に存在する組織で、神経堤細胞は、遊走して、末梢神経細胞（交感神経節細胞、副腎髄質細胞）、Schwann細胞、メラノサイト、腸管内分泌細胞などに分化する。神経芽腫は、そのうち交感神経節細胞あるいは副腎髄質細胞に分化する途上で腫瘍化したものと考えられる。一般的には神経芽腫と呼ばれることが多いが、実際は一連の成熟段階を示す腫瘍より成り、神経芽腫、神経節芽腫、神経節腫と分類され、神経芽腫群腫瘍とも総称される。このうち最も未熟な腫瘍が神経芽腫であり、小型で未熟な神経芽細胞が神経細線維を伴って増殖する（図2）。神経芽細胞と神経節様細胞に分化した細胞が混在するものが神経節芽腫で、成熟した神経節細胞のみから構成される腫瘍は、神経節腫と呼ばれる。また、神経芽腫で特筆すべきことは、1歳6ヵ月未満に発見される腫瘍では、自然に退縮するか分化する腫瘍が多いことである。また、成熟傾向にある神経芽腫では、間質にSchwann（様）細胞が比較的豊富にみられる。

神経芽腫における癌幹細胞の存在は、細胞株を用いた研究により示唆されている。本腫瘍は、さまざまな分化・成熟度の神経芽細胞より構成されるが、神経芽腫から樹立された細胞株は、交感神経系の細胞のみならず、Schwann細胞やメラノサイトなどの神経堤由来組織の形質を示す細胞も出現しうる。Rossらは、

1. 胚細胞腫瘍の組織発生

胚細胞腫瘍は、原始生殖細胞が成熟した胚細胞になる過程に発生した腫瘍と考えられている。多くは、性腺(精巣、卵巣)に発生するが、仙尾部、縦隔、後腹膜、松果体などの性腺外組織からも発生する。性腺外組織からの発生例は、迷入遺残した原始生殖細胞由来と考えられている。組織型としては、胚細胞腫(セミノーマ)、胎児性癌、卵黄嚢腫瘍、絨毛癌、奇形腫(成熟型、未熟型)などが含まれる。精巣胚細胞腫瘍の場合、半数以上は単一組織型であるが、30~40%は1つの腫瘍内に複数の組織型が存在する複合組織型である。胚細胞性腫瘍の組織発生は未だ明らかではないが、精巣の場合、大部分の胚細胞腫瘍は精細管内胚細胞腫瘍 intratubular germ cell neoplasia (ITGCN) を経て発生するとの考え方が最も有力である(図3)⁴⁾。精母細胞性セミノーマや乳児の卵黄嚢腫瘍と奇形腫は、ITGCNを伴うことがなく、別の発生経路が存在すると考えられている。浸潤性の腫瘍では、ITGCNとの類似点や未熟な形質よりセミノーマが最も上流の病変と考えられている。未分化な胎児性癌やセミノーマと共に分化した腫瘍である奇形腫が混在すること、時に原発巣が胎児性癌で転移巣が奇形腫という症例が存在することなどから、腫瘍内に多分化能を有する腫瘍性の幹細胞が存在することが古くより想定されてきた。

2. マウスとヒトの胎児性癌細胞

胚細胞腫瘍内に存在する幹細胞の研究は、ヒトよりもマウスにおいて先行して研究されてきた。ヒトでは、胚細胞性腫瘍が初期胚のモデル系として考えられるが、マウスでは、ヒトよりも古くからテラトーマ(奇形腫)、テラトカルシノーマ(奇形癌)が胚細胞由来腫瘍の実験系として用いられてきた。マウスでは、テラトーマを高率で自然発症する近交系が確立され、また系統によらず、初期胚を精巣や腎被膜に移植することによりテラトカルシノーマを誘発することができる。マウスのテラトカルシノーマには3胚葉性の組織と共に、幹細胞が存在すると考えられており胎児性癌細胞 embryonic carcinoma cell (EC細胞)と呼ばれ、同細胞がヒトの胎児性癌細胞に相当すると考えられている。実際にマウスのEC細胞は、1個の細胞でテラトカルシノーマを形成することができること⁵⁾、また、EC細胞を胚盤胞に注入することによりキメラマウスを作製可能で、EC細胞由来の細胞が体細胞に寄与し

神経芽腫の培養細胞を形態と形質によって3種類に分類する試みを行っている¹⁾。すなわち、神経芽細胞様の形質を有するN-type細胞、大型扁平で基質への接着性が強いS-type細胞、形態学的に両者の中間のI-type細胞である。N-typeは、交感神経の神経芽細胞に類似した細胞で、小型で神経突起様の突起を有する。基質に弱く接着するが、細胞同士はよく接着する。一方、S-typeは、神経細胞ではなく、メラノサイトやSchwann細胞、平滑筋のマーカーを示すことがある。I-typeは、当初はN-typeとS-typeの中間intermediateの形態を示す細胞として同定された。すなわち、短い神経突起様の突起と基質への強い接着性と遊走性を示す細胞である。しかしながら、I-type細胞は、N-typeあるいはS-type様の細胞に分化できることから、現在では神経芽腫の癌幹細胞の候補と考えられている。N-typeと比較して、soft agar上でのコロニー形成能や免疫不全マウスでの腫瘍形成能が高いことも、この細胞が神経芽腫の癌幹細胞に近いことを示唆している。ただし、I-typeの細胞が全て神経芽腫の癌幹細胞と証明されたわけではなく、I-typeの細胞のなかに幹細胞が含まれているものと思われる。

近年、さらに詳細な神経芽腫の癌幹細胞の研究が行われている。神経芽腫の中にHoechst色素を排出できるSP(side population)細胞が存在し非対称性分裂によりSP細胞と非SP細胞になることが示され、同細胞が、ATP-binding cassette transporter G2(ABCG2)やABCA3といったABCトランスポーターを発現すること、高い薬剤排出能を有することから化学療法抵抗性の癌幹細胞である可能性が示唆されている²⁾。神経芽腫は、小児固形腫瘍で最も頻度が高く、未だに治療抵抗性の症例が存在することから、癌幹細胞の研究がこれからも盛んに行われるものと考えられる。

4. 網膜芽腫

網膜芽腫は、乳幼児に好発する眼球内の悪性腫瘍で、網膜構成細胞由来の腫瘍と考えられる。網膜芽腫では、少数の網膜芽腫細胞がABCG2やaldehyde dehydrogenase 1, minichromosome maintenance 2 (MCM2), stem cell antigen-1(Sca-1), p63などの幹細胞マーカーを発現することが示されている³⁾。また網膜芽腫の細胞株にはHoechst色素を排出できるside population細胞が極少数ながら存在することが示されている。以上の知見は網膜芽腫における癌幹細胞の存在を示唆している。しかし、これらの細胞が自己複製能や分化能を有しているかなどの検討は未だなされていない。

図3 精巣胚細胞腫瘍の組織発生の概念と初期発生 精巣胚細胞腫瘍の組織発生の概念を簡略化して示した。胚細胞からITGCNを経てセミノーマが発生すると想定されている。胎児性癌は初期胚の胚盤胞に近い形質を示すと考えられる。乳児奇形腫、乳児卵黄嚢腫瘍、精母細胞性セミノーマの前駆病変は明らかではない。

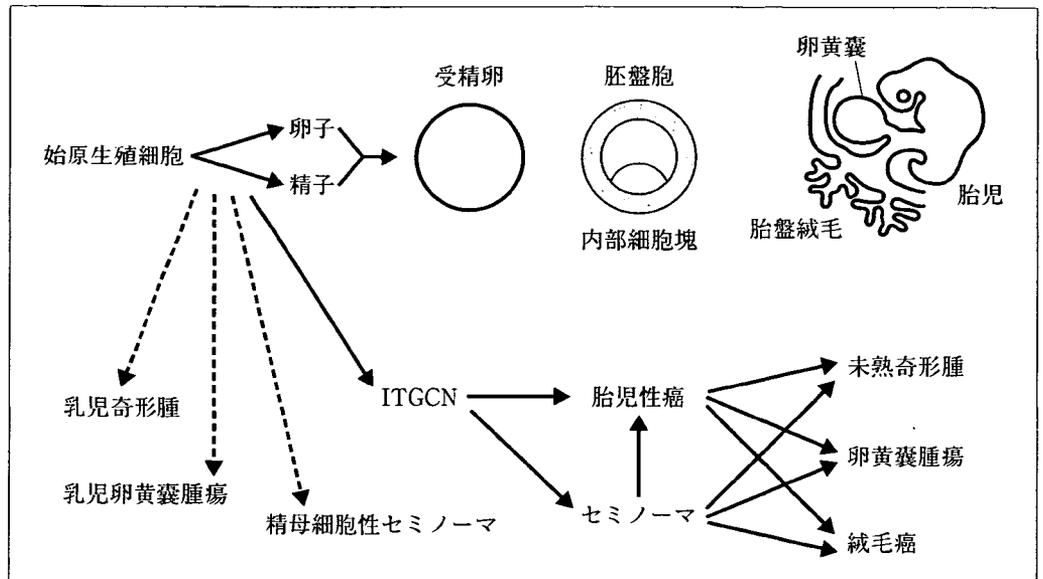


表1 胎児性癌 (EC) 細胞と胚性幹 (ES) 細胞, 胚性生殖 (EG) 細胞の比較

	ヒト			マウス		
	EC 細胞	ES 細胞	EG 細胞	EC 細胞	ES 細胞	EG 細胞
主な起源	精巣, 卵巣, その他の生殖細胞	胚盤胞の内部細胞塊	始原生殖細胞	精巣, 卵巣あるいは初期胚の異所移植	胚盤胞の内部細胞塊	始原生殖細胞
Oct-3/4	+	+	+	+	+	+
SSEA-1	-	-	+	-	-	-
SSEA-3	+	+	+	-	-	-
SSEA-4	+	+	+	-	-	/
TRA-1-60	+	+	+	-	-	-
TRA-1-81	+	+	+	-	-	-

うることから、同細胞の幹細胞としての性質が証明されている。

ヒトにおいては、胚細胞腫瘍のなかで、胎児性癌やセミノーマ内に多分化能を有する幹細胞が存在すると考えられる。セミノーマの培養細胞はほとんど樹立されておらず、胎児性癌を用いた実験系が用いられている。Andrewsらは、精巣原発胎児性癌の肺転移からTera-2という培養細胞株を樹立した。その細胞株をヌードマウスに移植した後、移植腫瘍から培養系に戻し、胎児性癌幹細胞を含むと思われるいくつかのsubcloneを樹立した⁶⁾。これらのEC細胞をヌードマウスへ移植すると神経を含むいくつかの組織へ分化した。また、我々は、精巣由来混合型胎児性癌より細胞株NCR-G3を樹立した⁷⁾。同細胞は、浮遊細胞と付着細胞から成るが、浮遊細胞では、胎児性癌や初期胚に特異的なマーカーであるstage specific embryonal

antigen-3 (SSEA-3) やSSEA-4が発現しているのに対し、付着細胞には、SSEA-1, carcinoembryonic antigen (CEA), human chorionic gonadotropin (hCG), desminなど種々の分化形質が出現する。さらにレチノイン酸処理により分化が促進される。G3細胞はクローニングによっても同一の形質を示すのでヒト胚細胞性腫瘍の幹細胞を含んでいると考えられる。

これらのEC細胞の形質は、胚性幹細胞embryonic stem cell (ES細胞)や初期胚と比較のもとに解析されている。マウスEC細胞はSSEA-1⁺, SSEA-3⁻, SSEA-4⁻, TRA-1-60⁻, TRA-1-81⁻であり、ES細胞、胚盤胞の内部細胞塊と同じ発現パターンを示す(表1)。一方、ヒトEC細胞は、SSEA-1⁻, SSEA-3⁺, SSEA-4⁺, TRA-1-60⁺, TRA-1-81⁺であり、マウスEC細胞とは異なる発現パターンを示すが、ヒトES細胞と同じパターンである。このように、マウスとヒ

トのEC細胞は胚盤胞の内部細胞塊あるいはそれに由来するES細胞に類似したマーカーを発現している。興味深いことに胎児の始原胚細胞由来である胚性生殖細胞embryonic germ cell(EG細胞)とEC細胞は異なったマーカーを発現している。また、遺伝子プロファイリングの結果からも、ヒト胚細胞性腫瘍のなかで、胎児性癌が、ヒトES細胞と最も類似した遺伝子発現プロファイルを示しており、セミノーマがそれに次いでいる⁸⁾。特に、転写因子であるoctamer-binding transcription factor 3/4(Oct3/4), sex determining region Y-box 2(Sox2), forkhead box protein D3(FOXD3)やDNAメチル基転移酵素であるDNA methyltransferase 3B(DNMT3B)など、初期胚で機能する分子が胎児性癌、ES細胞で共通して発現している。これらのことから、EC細胞が、三胚葉系の細胞へ分化しうる全能性をもった細胞である胚盤胞の内部細胞塊に相当する形質を有することが示唆される。さらにこれらの発現解析からOct3/4のような幹細胞マーカーが胎児性癌の診断に有用であることが示されるなど診断病理へ応用されつつある。今後は、ヒト胚細胞腫瘍組織内に潜む幹細胞の同定が課題であると共に、それらの幹細胞と成人癌の癌幹細胞の特性の異同等の検討が重要と考えられる。

おわりに

胎児性腫瘍や胚細胞性腫瘍は、古くから現在の癌幹細胞仮説に相当する概念でとらえられてきた。癌幹細胞研究は、実験系の容易さなどから血液系腫瘍が先行している。しかし、最近、神経芽腫などの難治性胎児性腫瘍の癌幹細胞研究が注目されており、今後、その

知見が蓄積されていくと期待される。一方、ヒト胎児性癌は、これまでもヒト初期胚のモデルとして研究されてきたが、近年のヒトES細胞、EG細胞の出現により、それらの細胞と共に初期胚発生のモデル系として、今まで以上に研究されていくものと考えられる。

文 献

- 1) Cheung, N.K.V., Cohn, S.L. eds. : Neuroblastoma, Springer, New York, 2005, 55-61
- 2) Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G. et al. : A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. Proc Nat Acad Sci 2004, **101** : 14228-14233
- 3) Seigel, G.M., Campbell, L.M., Narayan, M. et al. : Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. Mol Vis 2005, **11** : 729-737
- 4) Ulbright, T.M., Amin, M.B., Young, R.H. : Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord, and scrotum. Atlas of Tumor Pathology 3rd Series, AFIP, Washington, DC, 1999, 41-58
- 5) Kleinsmith, L.J., Pierce, B. : Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. Cancer Res 1964, **24** : 1544-1551
- 6) Andrews, P., Damjanov, I., Simon, D. et al. : Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. Lab Invest 1984, **50** : 147-162
- 7) Hata, J., Fujimoto, J., Ishii, E. et al. : Differentiation of human germ cell tumor cells in vivo and in vitro. Acta Histochem Cytochem 1992, **25** : 563-576
- 8) Sperger, J.M., Chen, X., draper, J.S. et al. : Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. Proc Natl Acad Sci 2003, **100** : 13350-13355

■ 特集 小児固形腫瘍の分子生物学 (その3) : 最新の知見

Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の分子生物学

大喜多 肇*

はじめに

Ewing 肉腫ファミリー腫瘍 (Ewing's sarcoma family tumor : ESFT) は、小児や若年成人の骨軟部に好発する腫瘍であり、原発性悪性骨腫瘍のなかでは骨肉腫に次ぐ頻度とされている。本腫瘍群には Ewing 肉腫, peripheral primitive neuroectodermal tumor (PNET) が含まれる。両腫瘍は、元来、異なる腫瘍として報告されてきたが、共通する染色体転座と病理組織学的特徴により、現在では、同一の範疇に入る腫瘍と考えられている。本稿では、ESFT における融合遺伝子の病理学的あるいは臨床的な意義と腫瘍発生における生物学的な意義について概説したい。

I. 病理組織学的特徴

Ewing 肉腫と PNET では、小型類円形でクロマチンの増量した核と明るい細胞質を有する腫瘍細胞が、繊細な血管性間質を伴ってびまん性に増殖する。Ewing 肉腫はほとんど分化形質を示さない。一方、PNET では Homer-Wright 型の偽ロゼットがしばしば認められ、免疫組織化学的に neuron specific enolase や neurofilament などの神経系のマーカーの発現が認められる。しかしながら、同一の腫瘍内にほとんど分化形質を示さない Ewing 肉腫の組織像を示す部と、神経系の形質を示す PNET の組織像を示す部が混在することもあり、Ewing 肉腫, PNET を明確に区別することは困難なこともある。これらの腫瘍は、免疫組織学的には CD99 (MIC2) が、びまん性に膜上に陽性となるのが特徴的である。CD99 は ESFT

表 ESFT に認められる染色体転座と融合遺伝子

転座の核型	融合遺伝子	頻度
t(11;22)	<i>EWS-FLI1</i>	80%
t(21;22)	<i>EWS-ERG</i>	15%
t(7;22)	<i>EWS-ETV1</i>	まれ
t(17;22)	<i>EWS-E1AF</i>	まれ
t(2;22)	<i>EWS-FEV</i>	まれ
t(16;21)	<i>FUS-ERG</i>	まれ
t(2;16)	<i>FUS-FEV</i>	まれ

の感度の高いマーカーであるが、リンパ芽球性リンパ腫をはじめとする他の小円形細胞腫瘍においても陽性となることがあり、鑑別診断上、留意する必要がある。

II. 分子遺伝学的特徴

ESFT の約 80% に特徴的な染色体転座 t(11;22) が存在し、転座による融合遺伝子 *EWS/FLI1* が単離された (表)^{1,2)}。さらに約 15% には t(21;22) に由来する *EWS/ERG* 遺伝子が存在する。この 2 つの融合遺伝子に加え、頻度は非常に低いが、*EWS/ETV1*, *EWS/E1AF*, *EWS/FEV* といった融合遺伝子が報告されている³⁾。これらの融合遺伝子はいずれも 5' 側が *EWS* 遺伝子 (*EWSR1*, Ewing sarcoma breakpoint region 1) で、3' 側が *ETS* family に属する転写因子であり、*EWS/ETS* 融合遺伝子とも呼ばれている。*EWS* 遺伝子の産物は、RNA 結合蛋白質と考えられ、類似した構造を有する *FUS* (fusion in malignant liposarcoma), *TAF II 68* (*TAF15*, *TAF15* RNA polymerase II, *TATA* box binding protein (*TBP*)-associated factor, 68kDa) とともに *TET* family と呼ばれている。それぞれの融合遺伝子の産物には N 末端側

* 国立成育医療センター研究所発生・分化研究部
(〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1)

の transactivation domain が含まれている。一方、3'側の転写因子には ETS DNA binding domain が in frame で含まれるというのが共通した特徴であり、融合遺伝子は異常な転写因子として作用すると考えられている。さらに、近年、EWS/ETS 融合遺伝子に加え、TET ファミリーのメンバーである FUS 遺伝子と ETS ファミリーの転写因子による融合遺伝子 (FUS/ERG, FUS/FEV) が報告されている。

III. 遺伝子診断

ESFT の病理学的診断は、特徴的な病理組織学的形態と免疫染色 (CD99 陽性、他の分化マーカー desmin, TdT などが陰性) によってなされるのが一般的であろう。しかしながら、ごく少量しか腫瘍成分が得られない場合や、免疫染色の染色性が不良の場合など診断に苦慮することが少なくない。このような場合、融合遺伝子の同定が確定診断を下すために重要となる。筋と神経への分化を示す biphenotypic sarcoma で EWS/FLI1 が、desmoplastic round cell tumor で EWS/ERG が検出されたとの報告があること、FUS/ERG が急性骨髄性白血病の一部で同定されるなど、EWS (あるいは FUS) /ETS 融合遺伝子は、ESFT に 100%特異的とはいえないものの、非常に特異性が高いと考えられており、病理組織学的な形態所見と組み合わせで診断を行うことにより、より正確な診断が可能と思われる。一方、頻度は低いものの、融合遺伝子が検出されないが病理学的には ESFT と考えざるを得ない症例も存在する。このような場合は、病理組織学的鑑別診断 (リンパ芽球性リンパ腫や低分化型の滑膜肉腫など) を十分考慮したうえで、ESFT の診断を下すべきであろう。

ESFT の場合、EWS と ETS family の転写因子が、さまざまな exon の組み合わせで融合するサブタイプが存在する。このことから、RT-PCR 法で遺伝子診断する場合、融合遺伝子に由来する PCR 産物の長さが症例により一定ではなく、シーケンスによる塩基配列の確認が必要な場合もある。さらに、パラフィン包埋ブロックを用いた RT-PCR の場合、標的とする配列を 100 塩基程度

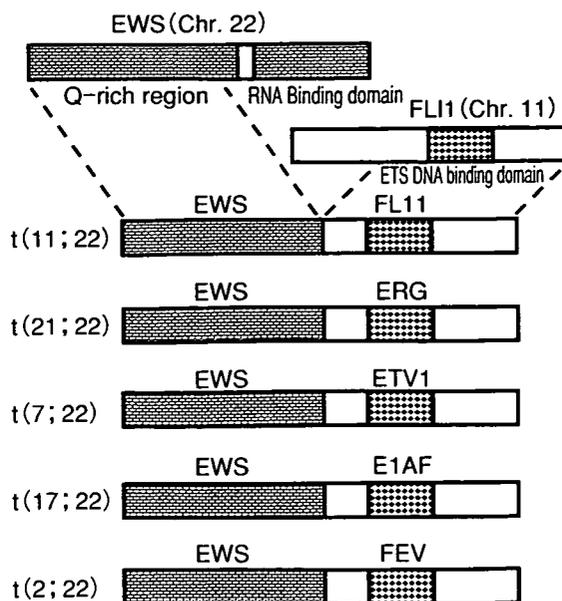


図 ESFT にみられる EWS 関連融合遺伝子の模式図

EWS の N 末端側には Q (glutamine)-rich region があり、FLI1 の C 末端側には ETS DNA binding domain がある。

に短くする必要があるため、それぞれのサブタイプに応じた PCR プライマーの設計が必要であり、まれなサブタイプの検出は現実的には困難である。

各融合遺伝子のサブタイプと予後との関連については、差がないという報告もあるが、EWS/FLI1 の type 1 とそれ以外の融合遺伝子を有する腫瘍では、前者のほうが予後が良いという報告もなされており、今後、さらに検討されるべき課題である⁴⁾。また、骨髄や末梢血における融合遺伝子の検索によって微小残存病変を感度良く検出できると報告されているが、これらの臨床的意義の評価は現時点では定まっていない。

IV. 融合遺伝子による腫瘍発生機序

EWS/ETS 融合遺伝子は ESFT のほぼすべてに存在すること、EWS/FLI1 は NIH3T3 をトランスフォームする能力を有することから、EWS/ETS は ESFT の腫瘍発生に非常に重要な役割を演じていると考えられている。EWS/ETS は、ETS DNA binding domain を有することから異常な転写因子として機能すると考えられており、その標的遺伝子が探索されてきた。これまで同定

された遺伝子のなかには、*c-Myc* (細胞周期やアポトーシスに参与するがん遺伝子) や *CCND1* (cyclin D1, 細胞周期関連分子), *PDGFC* (platelet derived growth factor C, 間葉系細胞に作用する増殖因子), *Nkx2.2* (NK2 homeobox 2, 神経細胞の分化にかかわるホメオボックスを有する分子), *NR0B1* (オーファン核内受容体), *Id2* (inhibitor of DNA binding 2, bHLH 転写因子に対して抑制的に作用する分子) などが報告されている^{5,6)}。

また、融合遺伝子は転写を上昇させるばかりでなく、*TGFBR2* (TGF- β type 2 receptor) や *IGFBP-3* (insulin-like growth factor-binding protein 3) のように融合遺伝子によって発現が抑制される分子も報告されている⁷⁾。前述した分子に加えて、さまざまな培養細胞への融合遺伝子導入実験により、*EWS/ETS* 融合遺伝子の産物はかなり多数の遺伝子の転写を直接的あるいは間接的に制御していると考えられつつあり、ひとつの遺伝子の制御のみで腫瘍発生を説明することはできないようである。今後は、各標的分子が腫瘍発生に果たす役割を明確にするとともに、どの分子が腫瘍の発症、維持に重要であるか解明する必要があるであろう。

さまざまな培養細胞に融合遺伝子を発現させることによって、その腫瘍発生における役割が解析されてきた。マウスの線維芽細胞である NIH3T3 細胞が、*EWS/FLI1* の強制発現によりトランスフォームされ、ESFT の形質の一部が出現することが報告されている。また、*EWS/FLI1* の強制発現により神経芽腫や横紋筋肉腫に ESFT のマーカーが発現するなど、融合遺伝子はトランスフォーム能があるのみならず、細胞の分化形質も制御するものと考えられる。一方、ヒトの線維芽細胞に融合遺伝子を強制発現させてもトランスフォームされず、ESFT 様の形態変化も生じないようである。これらのことからヒトの細胞では融合遺伝子のみではトランスフォームに不十分で他の遺伝子異常なども必要と推測されるとともに、細胞の環境により融合遺伝子が発揮する効果が異なる可能性も考えられる。

一方、RNAi を用いて ESFT 細胞において

EWS/FLI1 をノックダウンすると、ソフトアガー上でのコロニー形成能が失われること、ヌードマウスでの腫瘍形成能が抑制されることが示された⁵⁾。このことは、前述した強制発現の結果とあわせ、*EWS/FLI1* が ESFT にとって必須であることを示している。さらに、*EWS/FLI1* をノックダウンした ESFT 細胞の遺伝子発現プロファイルは、間葉系幹細胞に近づくこと、*EWS/FLI1* をノックダウンした ESFT 細胞は、脂肪や骨への分化能を示し、間葉系幹細胞様の性質が出現することが示された⁸⁾。さらに、マウスの骨髄由来間葉系前駆細胞に *EWS/FLI1* を強制発現させると、ESFT 類似の腫瘍を形成しうることも報告された⁹⁾。ESFT の発生母地は、未熟な間葉系細胞、神経堤細胞などの説が唱えられているが、これらの結果からは、間葉系幹細胞あるいはそれに近い細胞が ESFT の起始細胞であることが示唆される。今後、ヒト間葉系幹細胞/前駆細胞における *EWS/ETS* の機能が解明されることが期待される。

おわりに

融合遺伝子の発見以来、ESFT の疾患概念が整理されるとともに、その腫瘍発生における機能が盛んに研究されてきた。*EWS/FLI1* がある種の細胞に対してトランスフォーム能を有すること、ESFT 様の形質を与えることから、ESFT 発症において融合遺伝子が重要な役割を演じていると信じられているが、その作用機構にはいまだに解明すべき点が残されている。今後は融合遺伝子による ESFT 発症モデルの作製や、ESFT の起始細胞の同定、その起始細胞における *EWS/ETS* の機能解析が期待される。

文 献

- 1) Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al : Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*. 359 (6391) : 162-165, 1992
- 2) May WA, Gishizky ML, Lessnick SL : Ewing sarcoma 11; 22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-bind-

- ing domain encoded by FLI1 for transformation. Proc Natl Acad Sci 90 : 5752-5756, 1993
- 3) Kovar H : Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. Cur Opin in Oncol 10 : 334-342, 1998
 - 4) de Alava E, Kawai A, Healey JH, et al : EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. J Clin Oncol 16 (4) : 1248-1255, 1998
 - 5) Smith R, Owen LA, Trem DJ, et al : Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. Cancer Cell 9 : 405-416, 2006
 - 6) Fukuma M, Okita H, J Hata, et al : Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. Oncogene 22 (1) : 1-9, 2003
 - 7) Hahm KB, Cho K, Lee C, et al : Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. Nat Genet 23 (2) : 222-227, 1999
 - 8) Triode F, Laud-Duval K, Prieur A, et al : Mesenchymal Stem Cell Features of Ewing Tumors. Cancer Cell 11 : 421-429, 2007
 - 9) Riggi N, Cironi L, Provero P, et al : Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. Cancer Res 65 11459-11468, 2005

Molecular Biology of the Ewing's Sarcoma Family of Tumors

HAJIME OKITA

Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development

Key words : Fusion gene, Ewing's sarcoma, Transcription factor, Molecular biology.
Jpn. J. Pediatr. Surg., 39(11) ; 1344~1347, 2007.

The Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT) are bone and soft tissue sarcomas that occur in children and young adults. Specific chromosomal translocations found in ESFT cause EWS to fuse to a subset of ets transcription factor genes (ETS), generating chimeric EWS/ETS proteins. These proteins are believed to act as an aberrant transcriptional regulator and play a crucial role in the development of ESFT. The mechanisms responsible for the EWS/ETS-mediated tumorigenesis are well studied but remain uncertain. This review highlights recent advances in the molecular biology of ESFT.

* * *

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

神経芽腫におけるリスク分類にもとづく標準的治療の
確立と均てん化および新規診断・治療法の開発研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 均

印刷：(株)松井ピ・テ・オ・印刷