

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10847

研究課題名(和文) 骨軟部肉腫の新規起源細胞、ペリサイトの悪性化機構の解明と肉腫治療薬開発への応用

研究課題名(英文) Pericyte as a novel cellular origin of sarcoma: Elucidating the mechanism of malignant transformation of pericyte and developing new therapeutic drugs for sarcoma

研究代表者

佐藤 信吾 (Sato, Shingo)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40462220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多くの肉腫において、その起源細胞および発症のメカニズムは未だ不明であり、治療薬開発に不可欠な動物モデルの確立も不十分である。そこで本研究では、ペリサイトが肉腫の新たな起源細胞である可能性に着目し、*in vitro*におけるペリサイトの悪性化誘導実験や、ペリサイト特異的に発癌変異を誘導した遺伝子改変マウスの解析を通じて、ペリサイトが肉腫の起源であることを明らかにした。また、悪性化したペリサイトの遺伝子発現プロファイル解析の結果、肉腫の発症にWnt経路の不活化が関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、肉腫治療薬の開発は停滞しており、肉腫研究の進展と新規治療薬の開発が喫緊の課題となっている。肉腫研究の進展のためには、ヒトの肉腫を忠実に反映する肉腫動物モデルの開発は極めて重要である。研究代表者らが作出したペリサイト特異的p53欠損マウスは、90%以上の確率で肉腫のみを発症するという肉腫研究に絶好のマウスモデルであり、肉腫研究の更なる発展に繋がることが期待される。また、肉腫の発症にはWnt経路の不活化が関与していることを明らかにしたが、この結果はWnt経路のアゴニストが肉腫の発症や増殖を抑制する可能性を示唆するものであり、新規肉腫治療薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In many sarcomas, the cell of origin and the mechanism of onset are still unclear. In addition, the establishment of animal models, which is indispensable for development of therapeutic drugs, is also not enough. In this study, to verify the possibility that pericyte is a novel cellular origin of sarcoma, we conducted *in vitro* experiments using pericytes which have induced malignant transformation and analyzed genetically modified mice in which oncogenic mutation has been specifically induced in pericyte. Moreover, as a result of gene expression profile analysis of pericyte-derived sarcoma cells, we revealed that Wnt pathway inactivation is involved in the onset of sarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：骨軟部腫瘍 ペリサイト 腫瘍起源細胞 肉腫発症マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

骨や軟骨、筋肉、脂肪などの非上皮性組織から発生する肉腫は、上皮性組織から発生する癌腫に比べて頻度は少ないものの、病理組織学的に多彩な所見を呈する。また、臨床的にも多彩な経過を辿るため、診断や治療に難渋することが少なくない。20世紀後半の手術療法および化学療法の進歩により、肉腫の生存率は飛躍的に改善したものの、この10年の5年生存率は横ばいとなっており、新しい抗がん剤や分子標的治療薬の開発は急務である。しかしながら、希少癌である肉腫は、癌腫に比べて基礎研究は大きく遅れており、肉腫発生のメカニズムは未だ不明である。また、多くの肉腫において起源となる細胞すら同定されていない。

近年、腫瘍の中には、自己複製能や多分化能などの幹細胞特有の性質を持ち、かつ腫瘍形成能を有するごく少数の「がん幹細胞」が存在していることが提唱されている。これまでに申請者らは、独自のハイ・スループット・スクリーニング法を用いて、複数の肉腫幹細胞マーカーの同定に成功した。興味深いことにこれらのマーカーの中には、血管周皮細胞（以下、ペリサイト）の特異的マーカーであるCD146が含まれており、このペリサイトマーカーが陽性の肉腫細胞は、腫瘍増殖能が旺盛で、少数の細胞でも肉腫を形成することを明らかにした。また申請者らは、CD146に加えて、もう1つのペリサイトマーカーであるNG2がヒト肉腫細胞において高頻度に発現していることもすでに見出している。

そこで本研究では、ペリサイトが肉腫の新たな起源細胞である可能性に着目し、ペリサイトが肉腫化するメカニズムの解明と、悪性を抑制する新たな肉腫治療薬の開発を目指して、研究を開始した。

2. 研究の目的

ペリサイトに発癌変異を誘導した種々の遺伝子改変マウスを独自に作成し、ペリサイトが肉腫の起源であることを明らかにする。また、ペリサイトの悪性化に伴う遺伝子発現プロファイルの変化を検討し、肉腫化の過程で活性化されるシグナル経路を同定するとともに、そのシグナル経路に作用する新たな肉腫治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 生体におけるペリサイトおよびペリサイト由来細胞の可視化

NG2 (Neuron-glia antigen 2) はペリサイトマーカーの1つである。NG2発現細胞でCreリコンビナーゼ遺伝子を発現するNG2-Creマウスを用いて、ペリサイトもしくはペリサイト由来細胞特異的にtdTomatoもしくはLacZを発現するマウスを作成する。そして、このマウス（以下、ペリサイト可視化マウス）を解析することで、生体内におけるペリサイトの分布およびペリサイトの系譜を明らかにする。

(2) マウス肉腫におけるペリサイト由来肉腫細胞の検証

p53欠損マウスは様々な肉腫を形成することが知られている。そこで、1)で作成したペリサイト可視化マウスとp53欠損マウスを交配させることで、ペリサイト可視化マウスに肉腫形成を誘導する。形成された肉腫におけるtdTomatoもしくはLacZの発現を組織学的に検討し、マウス肉腫細胞がペリサイト由来する可能性を検証する。また、肉腫細胞におけるペリサイトマーカーの発現を、抗NG2抗体や抗CD146抗体を用いた免疫染色にて検討する。

(3) ペリサイト特異的発癌変異誘導マウスの作成と肉腫形成の検証

NG2-Creマウスを用いて、ペリサイト特異的に癌抑制遺伝子(p53、Rb1)を欠損させたマウス、およびペリサイト特異的に癌原遺伝子Krasを発現するマウスを独自に作成し、ペリサイトにおける発癌変異が肉腫形成を誘導する可能性を検証する。形成された肉腫の病理組織診断は、HE染色や種々の免疫染色にて確定する。

(4) ペリサイトの単離・培養法の確立とin vitroでのペリサイト悪性化機構の解明

マウス組織からフローサイトメトリーを用いてペリサイトを単離する方法を確立する。また、単離したペリサイトの培養法を確立し、ペリサイトの不死化（細胞株化）も目指す。また、不死化したペリサイト細胞株への癌原遺伝子の導入、もしくは癌抑制遺伝子の不活化により、発癌変異を誘導し、ペリサイトの形態、分化能、増殖能、肉腫形成能に与える影響を検討する。

(5) ペリサイトの悪性化に伴う遺伝子発現プロファイルの変化の検討

細胞の悪性化が単一遺伝子変異で起きることは稀であり、付加的な遺伝子変異およびそれに伴うシグナル伝達経路の異常が悪性化に重要であると考えられている。そこで、悪性化前後のペリサイトの遺伝子発現プロファイルを、網羅的トランスクリプトーム解析にて比較検討する。この解析から得られたデータに基づいて、付加的な遺伝子変異を予測するとともに、悪性化に重要なシグナル伝達経路を同定する。

4. 研究成果

(1) 生体におけるペリサイトおよびペリサイト由来細胞の可視化

ペリサイト可視化マウス (NG2-Cre; Rosa-tdTomato マウス) から筋骨格系組織を採取し、凍結切片を作成して tdTomato 陽性細胞の分布を観察した。血管系の細胞が tdTomato を発現しており、免疫染色も行った結果、血管内皮細胞ではなく、ペリサイトが tdTomato を発現していることを確認した。また、一部の骨芽細胞、骨細胞、筋細胞も tdTomato を発現しており、これらの tdTomato 陽性細胞はペリサイト由来であることが示唆された。

(2) マウス肉腫におけるペリサイト由来肉腫細胞の検証

ペリサイト可視化マウスと p53 欠損マウスを交配させることで、ペリサイト可視化マウスに肉腫形成を誘導した。形成された肉腫におけるレポータータンパク質の発現を組織学的に検討したところ、肉腫細胞の大半がレポータータンパク質を発現しており、ペリサイトが肉腫細胞の起源である可能性が示唆された。また、免疫染色の結果、肉腫細胞がペリサイトマーカーである NG2 や CD146 を発現していることも明らかとなった。

(3) ペリサイト特異的発癌変異誘導マウスの作成と肉腫形成の検証

ペリサイト特異的に p53 を欠損させたマウス (NG2-Cre; p53 flox/flox マウス) を作出したところ、生後 14 か月までに 90%以上のマウスが骨肉腫もしくは軟部肉腫を発症した。形成された骨肉腫のほぼ全てが骨芽細胞型骨肉腫であり、軟部肉腫は平滑筋肉腫様の腫瘍であった。肉腫の発症部位や病理組織像はヒト肉腫と類似しており、約 30%のマウスでは肺転移も認められた。一方、ペリサイト特異的に pRb を欠損させたマウス (NG2-Cre; pRb flox/flox マウス) の解析も行ったが、この遺伝子改変マウスでは肉腫の形成は認められなかった。

また、タモキシフェンの投与によりペリサイト特異的に K-ras 発現亢進と p53 発現低下を誘導できる NG2-CreER; K-ras flox/+; p53 flox/flox マウスも作出した。このマウスの筋肉内にタモキシフェンを投与したところ、投与部に未分化多型肉腫様の軟部肉腫の形成が誘導された。

(4) ペリサイトの単離・培養法の確立と in vitro でのペリサイト悪性化機構の解明

マウス胎児からフローサイトメトリーを用いてペリサイト (NG2+, CD146+, CD31-, CD45-, Ter119- 細胞) を単離し、培養する方法を確立した。また、初代培養ペリサイトに SV40 large T antigen を導入し、不死化ペリサイト株の樹立にも成功した。樹立した不死化ペリサイト株を各分化誘導培地にて培養したところ、骨分化能、脂肪分化能および軟骨分化能を有していることも明らかとなった。さらに、p53 を欠損させたペリサイト株も作成し、この細胞株の分化能、増殖能、腫瘍形成能を検討した。

(5) ペリサイトの悪性化に伴う遺伝子発現プロファイルの変化の検討

p53 欠損に伴う悪性化の前後でペリサイトに起こる遺伝子プロファイルの変化を RNA-seq 解析にて検討した。悪性化した細胞では -catenin シグナル経路が抑制されており、肉腫の発症に Wnt 経路の不活化が関与していることが明らかとなった。また、この結果に基づき、肉腫発症 xenograft モデルに Wnt のアゴニストを投与したところ、肉腫の形成は抑制された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Supakul S, Yao K, Ochi H, Shimada T, Hashimoto K, Sunamura S, Mabuchi Y, Tanaka M, Akazawa C, Nakamura T, Okawa A, Takeda S, Sato S. Pericytes as a source of osteogenic cells in bone fracture healing. Int J Mol Sci. 査読有. 20(5), pii: E1079, 2019. DOI:

10.3390/ijms20051079.

Hashimoto K, Sato S, Ochi H, Takeda S, Futakuchi M. Calvarial Bone Implantation and in vivo Imaging of Tumor Cells in Mice. *Bio Protoc.* 査読有. 9(3), e3151, 2019. <https://bio-protocol.org/e3151>

Takahashi A, Mulati M, Saito M, Numata H, Kobayashi Y, Ochi H, Sato S, Kaldis P, Okawa A, Inose H. Loss of cyclin-dependent kinase 1 impairs bone formation, but does not affect the bone-anabolic effects of parathyroid hormone. *J Biol Chem.* 査読有. 293(50), 19387-19399, 2018. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004834.

Jin G, Aobulikasimu A, Piao J, Aibibula Z, Koga D, Sato S, Ochi H, Tsuji K, Nakabayashi T, Miyata T, Okawa A, Asou Y. A small molecule PAI-1 inhibitor prevents bone loss by stimulating bone formation in a murine estrogen deficiency-induced osteoporosis model. *FEBS Open Bio.* 査読有. 8(4), 523-532, 2018. DOI: 10.1002/2211-5463.12390.

佐藤信吾 .がん細胞由来分泌型マイクロ RNA が造骨型骨転移を惹起する. *臨床雑誌整形外科.* 査読無. 69(11), 1124, 2018. https://webview.isho.jp/journal/detail/abs/10.15106/j_seikei69_1124

佐藤信吾 . がん骨転移のメカニズムの新知見と創薬への可能性. *PHARM STAGE.* 査読無. 18(3), 54-58, 2018

Hashimoto K, Ochi H, Sunamura S, Kosaka N, Mabuchi Y, Fukuda T, Yao K, Kanda H, Ae K, Okawa A, Akazawa C, Ochiya T, Futakuchi M, Takeda S, Sato S. Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有. 115(9), 2204-2209, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1717363115.

Mukaihara K, Tanabe Y, Kubota D, Akaike K, Hayashi T, Mogushi K, Hosoya M, Sato S, Kobayashi E, Okubo T, Kohsaka S, Saito T, Kaneko K, Suehara Y. Cabozantinib and dastinib exert anti-tumor activity in alveolar soft part sarcoma. *PLoS One.* 査読有. 12(9), e0185321, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0185321.

佐藤信吾. 骨軟部肉腫のマウスモデル. *Bone Joint Nerve.* 査読無. 7(3), 375-383, 2017. <https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ao1bjnee&ye=2017&vo=7&issue=3>

Hirakawa H, Gatanaga H, Ochi H, Fukuda T, Sunamura S, Oka S, Takeda S, Sato S. Antiretroviral therapy containing HIV protease inhibitors enhances fracture risk by impairing osteoblast differentiation and bone quality. *J Infect Dis.* 査読有. 215(12), 1893-1897, 2017. DOI: 10.1093/infdis/jix246.

Sato S, Tang YJ, Wei Q, Hirata M, Weng A, Han I, Okawa A, Takeda S, Whetstone H, Nadesan P, Kirsch DG, Wunder JS, Alman BA. Mesenchymal Tumors Can Derive from Ng2/Cspg4-Expressing Pericytes with β -Catenin Modulating the Neoplastic Phenotype. *Cell Rep.* 査読有. 16(4), 917-927, 2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.06.058.

Xu C, Ochi H, Fukuda T, Sato S, Sunamura S, Takarada T, Hinoi E, Okawa A, Takeda S. Circadian Clock Regulates Bone Resorption in Mice. *J Bone Miner Res.* 査読有. 31(7), 1344-1355, 2016. DOI: 10.1002/jbmr.2803.

〔学会発表〕(計 54 件)

佐藤信吾, Supaku I Sopak, 島田智仁, 越智広樹, 馬淵洋, 八尾健太, 砂村聡子, 赤澤智宏, 中村卓郎, 竹田秀, 大川淳. ペリサイト(血管周皮細胞)は多分化能を有し骨折治癒に貢献する. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2018.10.12. 奈良春日野国際フォーラム. 口演(シンポジウム)

佐藤信吾, 小柳広高, 平井高志, 湯浅将人, 関田俊明, 阿江啓介, 水口俊介, 大川淳. 医歯学融合集学的骨転移診療システムによる顎骨壊死予防の取り組みと効果. 第 51 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会. 2018.7.13. 静岡県コンベンションアーツセンター. 口演

佐藤信吾, 小柳広高, 平井高志, 湯浅将人, 阿江啓介, 大川淳. 整形外科主導の集学的骨転移診療システムの構築と早期治療介入. 第 51 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会. 2018.7.13. 静岡県コンベンションアーツセンター. 口演

Shingo Sato. Tumor-stromal interaction during bone metastasis. 8th Seoul Breast Cancer 2018. 2018.6.16. Seoul National University Hospital, Korea. 招待講演

佐藤信吾, 小柳広高, 平井高志, 湯浅将人, 阿江啓介, 大川淳. メタ脊損(脊椎転移による脊髄麻痺)は集学的院内診療体制構築で撲滅できる - 東京医科歯科大学の取り組み -. 第 91 回日本整形外科学会学術総会. 2018.5.24-27. 神戸コンベンションセンター. ポスター

Shingo Sato, Kyoko Hashimoto, Hiroki Ochi, Satoko Sunamura, Atsushi Okawa, Mitsuru Futakuchi, Shu Takeda. Cancer-secreted Hsa-miR-940 Induces Osteoblastic Phenotype in the Bone Metastatic Microenvironment. Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2018. 2018.3.10-11. New Orleans, USA. ポスター

佐藤信吾, 橋本恭子, 越智広樹, 砂村聡子, 小坂展慶, 馬淵洋, 神田浩明, 阿江啓介, 小柳広高, 赤澤智宏, 落谷孝広, 二口充, 竹田秀, 大川淳. ガン細胞由来分泌型マイクロ RNA による骨転移微小環境制御機構. 第 1 回日本サルコーマ治療研究学会 (JSTAR) 学術集会. 2018.2.23-24. JA 共済ビルカンファレンスホール. 抄録掲載

佐藤信吾. ガン細胞由来分泌型マイクロ RNA による骨転移微小環境制御機構. 平成 29 年度新学術領域研究学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会. 2018.1.25. 琵琶湖ホテル. 招待講演

佐藤信吾, 橋本恭子, 砂村聡子, 越智広樹, 小柳広高, 二口充, 大川淳. ガン細胞が分泌するマイクロ RNA が骨転移のタイプを規定する ~ 造骨型骨転移を惹起する分泌型マイクロ RNA の同定 ~. 第 50 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会. 2017.7.14. 京王プラザホテル. 口演

佐藤信吾, 小柳広高, 平井高志, 三浪友輔, 阿江啓介, 大川淳. 医歯学融合集学的診療システムによる骨転移早期治療介入の取り組みと効果. 第 50 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会. 2017.7.14. 京王プラザホテル. 口演

佐藤信吾. 病的骨折の撲滅に向けた医歯学融合集学的骨転移診療システムの構築. 第 43 回日本骨折治療学会. 2017.7.8. ビッグパレットふくしま. 口演 (シンポジウム)

佐藤信吾. 骨転移患者の骨折や麻痺を防ぐために整形外科医ができること. 第 45 回 Kyoto Orthopaedic Seminar. 2017.3.7. 京都大学芝蘭会館. 招待講演

佐藤信吾, 越智広樹, 竹田秀. 骨を基軸とする臓器間ネットワーク機構. 第 20 回日本心血管内分泌代謝学会 (CVMM 2016). 2016.12.16. 東京コンベンションホール. 口演 (シンポジウム)

佐藤信吾, 越智広樹, 竹田秀. 臓器連関の視点から俯瞰した骨の老化の新たなメカニズム. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016.12.2. パシフィコ横浜. 口演 (シンポジウム)

Shingo Sato, Yuning J. Tang, Qingxia Wei, Makoto Hirata, Ilkyu Han, Shu Takeda, David G. Kirsch, Jay S. Wunder, Benjamin A. Alman. Mesenchymal tumors can derive from NG2-expressing pericytes with beta-catenin modulating the neoplastic phenotype. Connective Tissue Oncology Society Meeting 2016. 2016.11.9-12. Lisbon, Portugal. ポスター

佐藤信吾, Benjamin Alman, 竹田秀, 大川淳. 骨軟部肉腫の起源と下垂体腫瘍の起源は同一か? 第31回日本整形外科学会基礎学術集会. 2016.10.13. 福岡国際会議場. 口演

佐藤信吾, 平井高志, 請川大, 松本誠一, 竹田秀, 大川淳. 医歯学融合集学的骨転移診療体制構築による緊急手術削減効果. 第49回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会. 2016.7.14. 東京ドームホテル. 口演

佐藤信吾. 血管周皮細胞(ペリサイト)の生物学的特性と肉腫起源細胞の可能性. 第13回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会. 2016.4.9. ホテルサンバレー富士見. 特別講演

〔図書〕(計 2 件)

佐藤信吾 他. 日本整形外科学会. 日本整形外科学会広報室ニュース「動物モデルを用いた肉腫研究」. 第112号. 2018

佐藤信吾 他. メディカルレビュー社. ファーマナビゲーター 抗 RANKL 抗体編「RANKL/RANK/OPG の遺伝子改変マウス」. 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

2017年1月15日. 第3回「がんを考える」市民公開講座. 招待講演. 東京医科歯科大学
<http://www.tmd.ac.jp/artis-cms/cms-files/20161110-134540-8276.pdf>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 越智 広樹

ローマ字氏名: (OCHI, hiroki)

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 大学院医歯学総合研究科 細胞生理学分野

職名: 助教

研究者番号(8桁): 30582283

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 砂村 聡子

ローマ字氏名: (SUNAMURA, satoko)

研究協力者氏名: Sopak Supakul

ローマ字氏名: (SOPAK, Supakul)

研究協力者氏名: 八尾 健太

ローマ字氏名: (YAO, kenta)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。