

平成 23 年 5 月 25 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591765

研究課題名 (和文) 骨軟部腫瘍における腫瘍幹細胞の単離と新たな分子標的療法の試み

研究課題名 (英文) Isolation of cancer stem cells in bone and soft tissue tumors and novel molecular and cellular targeting therapy

研究代表者

朴木寛弥 (HONOKI KANYA)

奈良県立医科大学 医学部・医学科・講師

研究者番号：40336863

研究成果の概要 (和文)：ラットおよびヒト肉腫細胞を用いて、無血清・非足場依存培養により単離された肉腫 spheroid 細胞 (‘sarcosphere’) が、自己複製能・幹細胞関連遺伝子の強発現・細胞の老化に関与する遺伝子発現の低下など幹細胞様性格を持ち、化学療法剤に対し強い抵抗性を有する事を示した。これには DNA 修復酵素の関与が示唆され、幹細胞様細胞の存在が肉腫の薬剤耐性に深く関与する事を示した。肉腫幹細胞を標的とする治療が、肉腫の予後の改善に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The current study indicates that rat and human sarcoma cells contain subpopulation of stem like cells with the formation of ‘sarcosphere’ in anchorage-independent, serum starved culture condition, showing higher expression of stemness genes with the ability of self-renewal. Sarcosphere cells show the capacity of resistance to chemo-agents due to the up-regulation of DNA repair enzymes. These results suggest that the chemo-resistance in sarcomas might be caused in part by the presence of stem-like cell populations. These results suggest that targeting sarcoma stem cells could improve the prognosis of sarcoma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：sarcoma, cancer stem cell, gene expression, drug resistance

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の特徴である ‘cellular heterogeneity’ (細胞不均一性)や転移過程における ‘tumor dormancy’ あるいは ‘seed and soil’ mechanism といった事象を説明する上で、cancer stem cell の存在が提唱されている。腫瘍幹細胞 (cancer stem cell) という概念の定義は未だ確立されたものとは言い難いが、いわゆる正常幹細胞と同様、その特徴として ‘self-renewal’ (自己複製能)、幹細胞関連遺伝子の発現や apoptotic stress に対する耐性能などが挙げられており、腫瘍細胞のうちの small subpopulation である cancer stem cell が腫瘍増殖や転移、薬剤への耐性などに根源的に関与すると考えられている。Cancer stem cell の存在は、まず血液系悪性腫瘍である骨髄性白血病において提唱され、続いて乳癌や脳腫瘍などの固形腫瘍でもその存在が示唆された。さらに固形腫瘍の転移過程においては、primary tumor より播種された細胞のうちそのほとんどが apoptosis に陥り、転移巣の形成を完遂できる細胞は極めて少数に限られているという、いわゆる ‘metastatic inefficiency’ という概念が存在し、この事象にも cancer stem cell の関与が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 上記の背景をふまえ、まず自家樹立 4-HAQO 誘発ラット骨肉腫および悪性線維性組織球腫細胞株を用いて、間葉系悪性腫瘍における cancer stem cell の単離を試み、その細胞特性を明らかにする。

(2) さらに、対象をヒト骨肉腫、ユーイング肉腫および線維肉腫細胞株にまで拡張、stemness の指標としての幹細胞関連遺伝子の発現、さらに ‘self-renewal’ を示す secondary sphere 形成能を検討し、さらに単離した幹細胞様細胞について、薬剤耐性能や増殖活性に関わる遺伝子の変化を検索し、肉腫における腫瘍幹細胞を標的とした治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 自家樹立ラット骨肉腫、悪性線維性組織球腫細胞株およびヒト骨肉腫、線維肉腫を用いた ‘sarcosphere’ 作成を行う。方法は、low attachment plate 上で N2 medium/1% methylcellulose 培地を用いた serum depleted - anchorage dependent 環境下の培養法である。作成された ‘sarcosphere’ について、経時的な sphere 生成比率、また secondary sarcosphere の作成を試み、自己複製能の検討を行う。つぎに、RT-PCR 法により幹細胞関連遺伝子発現を検索するとともに、幹細胞の aging にも関与するとされる p16INK4a-p19 (p14) ARF などの癌抑制遺伝子の発現に関しても、original 細胞と比較することにより、‘sarcosphere 細胞’ の stemness について検討を加える。

(2) ヒト骨肉腫、ユーイング肉腫および線維肉腫細胞株についても同様の方法で幹細胞様細胞の単離を行い、stemness の指標としての幹細胞関連遺伝子の発現、さらに ‘自己複製能’ についても上記と同様の方法で

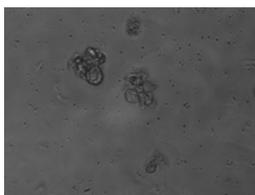
検討する。単離した幹細胞様細胞について、シスプラチン、アドリアマイシンに対する薬剤耐性能を MTT assay により検索し、それに関わる遺伝子の変化についても検討を加える。

(3) 幹細胞様細胞のマーカーの一つとされる aldehyde dehydrogenase1 (ALDH1) について、上記ヒト肉腫細胞に対し Aldefluor assay を用いて FACSscan 解析を行い、その population の同定を行う。また ALDH1-positive population の特性について、上記と同様の方法で幹細胞様細胞としての特性を有するか検討する。

(4) ラット骨肉腫モデルを用い、間葉系幹細胞の肉腫進展過程における影響を検索すると共に、Agilent gene expression array により肉腫の細胞起源とされる間葉系幹細胞と骨肉腫、MFH の遺伝子発現プロファイルについて上記ラットモデルを用いて比較検討する。

4. 研究成果

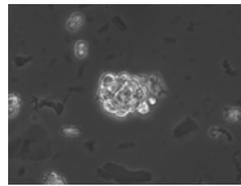
(1) ラット骨肉腫および悪性線維性組織球腫について、low attachment plate 上で N2 medium/1% methylcellulose 培地を用いた serum depleted - anchorage dependent 環境下の培養により、おおよそ 0.2-0.3% の incidence で sarcosphere が形成された (図 1)。これらは、STAT3、Bmi1 の発現を示し、INK4a-ARF の発現を欠いており、強い造腫瘍性を示した。



(図 1)

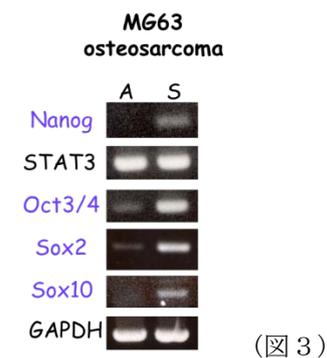
ラット骨肉腫 COS1NR sarcospheres

(2) ヒト osteosarcoma MG63, Ewing's sarcoma HTB166, fibrosarcoma HT1080 細胞株においても、すべての細胞株は、無血清・非足場依存で sarcosphere を形成し (図 2)、その sarcosphere は 0.2-0.8% の population で存在、secondary sphere 形成による自己複製能、幹細胞関連遺伝子 Nanog, Oct3/4, STAT3 および SOX2 の発現増加を (図 3)、幹細胞様性格を有していると考えられた。



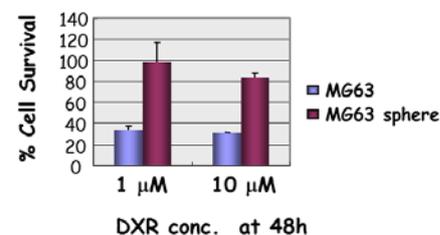
(図 2)

ヒト骨肉腫 MG63 sarcospheres



ヒト骨肉腫 MG63 sarcosphere における幹細胞関連遺伝子発現

さらに sarcosphere 細胞は、doxorubicin と cisplatin に対し強い抵抗性を示し (図 4)、

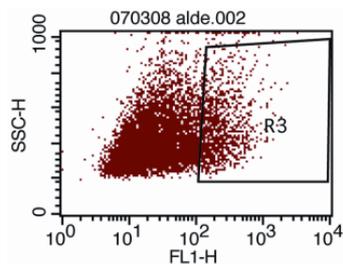


(図 4)

ヒト骨肉腫 MG63 sarcosphere における薬剤耐性

その機序として DNA repair enzyme genes, MLH1 and MSH2 の発現増加による DNA 修復能の増強の関与が一部示唆された。従って、DNA 修復阻害薬であるカフェインの併用により化学療法剤の薬理効果の増強が確認された (Fujii H, et al. *Int J Oncol.*, 2009)。幹細胞様細胞ではラット肉腫で見られたものと同様 (Fujii H, et al, *BBRC*, 2007) INK4a 遺伝子の発現低下が確認されており、細胞の老化に関与することにより幹細胞様性質の獲得に必須のものであることが示唆された。これは、epigenetic な調節の関与が示唆されている。

(3) ヒト肉腫細胞においても、aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) 活性の高い集団が幹細胞様細胞を含んでおり (図 5)、自己複製能を有すること、幹細胞関連遺伝子 Nanog, Oct3/4, STAT3 および SOX2 の強発現を示すことなどを明らかにしてきた (Honoki K, et al. *Oncol. Rep.* 2010)。



(図 5)

Aldefluor assay (R3: MG63ALDH1 陽性細胞)

(4) 幹細胞の特性維持には、微小環境 niche の関与が不可欠であり、今回はその中でも間葉系幹細胞 (MSC) に着目し、その肉腫伸展機構に与える影響についてラット骨肉腫モデルを用いて検討を加えた。その結果、MSC が骨肉腫細胞の早期生着、転移形成を促進することが示唆された。遺伝子発現解析において focal adhesion, cytokine - cytokine receptor, extracellular matrix - receptor

pathway などに関与する遺伝子群が、MSC において骨肉腫細胞に比して強く発現しており、MSC が骨肉腫の進展過程に影響を与える際に、これらの遺伝子群が何らかの関与をしていることを示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Honoki K, Fujii H, Kubo A, Kido A, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol. Rep.* 24: 501-505, 2010(査読有).
- ② Honoki K. Do stem-like cells play a role in drug resistance of sarcomas? *Expert Rev. Anticancer Ther.* 10: 261-270, 2010(査読有).
- ③ Okabe K, Hayashi M, Fujii M, Honoki K, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Mutations of lysophosphatidic acid receptor genes in human osteosarcoma cells. *Pathobiology.* 77(5):278-82, 2010(査読有).
- ④ Honoki K, Morita K, Kasai T, Fujii H, Kido A, Tsukamoto S, Nonomura A, Tanaka Y. Hibernoma of the axillary region: a rare benign adipocytic tumor. *Rare Tumors.* 2: 2010 Epub(査読有).
- ⑤ Tsukamoto S, Kido A, Honoki K, Akahane M, Mii Y, Tanaka Y. Type 1 neurofibromatosis with a giant intrathoracic lesion: A case report with 25 years of follow-up. *Pathol Res. Pract.* 2010. Epub ahead(査読有).
- ⑥ Fujii H, Honoki K, Yajima H, Kido A, Kobata Y, Kaji D, Takakura Y. Epithelioid sarcoma of the forearm arising from perineural sheath of median nerve mimicking carpal tunnel syndrome. *Sarcoma.* 2009: 595391. Epub 2009 Apr 14(査読有).
- ⑦ Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, Kido A, Yoshitani K, Takakura Y. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int J Oncol.* 34:1381-6, 2009(査読有).

- ⑧ Yoshitani K, Kido A, Honoki K, Fujii H, Takakura Y. Pelvic metastasis of breast synovial sarcoma. *J Orthop Sci.* 142: 219-23, 2009(査読有).
- ⑨ Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, Kido A, Yoshitani K, Takakura Y. Growth inhibition and induction of apoptosis by 3-Methoxyestradiol in rat osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma cell lines. *In vivo.* 22: 21-26, 2008(査読有).
- ⑩ Honoki K, Kobata Y, Miyauchi Y, Yajima H, Fujii H, Kido A, Kawamura K, Morishita T, Mii Y, Takakura T Epiphyseal preservation and an intercalary vascularized fibular graft with hydroxyapatite composites. Reconstruction in metaphyseal osteosarcoma of the proximal tibia: a case report. *Arch Orthop Trauma Surg.* 128: 189-193, 2008(査読有).
- ⑪ 朴木寛弥. がん細胞の社会学 ~良・悪性を隔てるもの~. *大阪臨床整形外科医会会報.* 36: 90 - 93, 2009(査読無).
- ⑫ 朴木寛弥. 骨軟部腫瘍・現況と展望について. *奈良県医師会医学会年報.* 23: 25-31, 2010(査読無).

[学会発表] (計 13 件)

- ① Honoki K. Cancer stem cell in sarcomas: Role in drug resistance and tumor progression. BIT's 3rd Annual World Cancer Congress, 2010, Singapore
- ② Honoki K, Fujii H, Kido A, Tsukamoto S, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Possible involvement of stem-like population with elevated ALDH1 and DNA repair enzymes for drug resistance in human sarcoma. 56th Annual Meeting of Orthopedic Research Society, 2010.
- ③ Honoki K, Fujii H, Kubo A, Kido A, Yoshitani K, Mori T, Tsujiuchi T. Human sarcoma cell lines contain drug-resistant sphere forming stem-like cell populations with elevated aldehyde dehydrogenase 1. 100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2009.
- ④ Honoki K, Fujii H, Tsujiuchi T, Kido A, Yoshitani K, Takakura Y. Human fibrosarcoma cell line HT1080 lacking INK4a-ARF locus gene expression

contains sphere forming stem-like cells. 99th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2008.

- ⑤ Honoki K, Fujii H, Takakura Y, Tsujiuchi T: Stem-like sphere forming cell populations in sarcomas. Implications in chemo-resistance and possible therapeutic targets. 8th International Conference of Anticancer Research, Kos, Greece, 2008
- ⑥ 朴木寛弥、藤井宏真、藤間保晶、森 俊夫、城戸 顕、辻内俊文. 間葉系幹細胞はラット肉腫モデルにおいて腫瘍細胞の早期正着および転移巣形成を促進する. 第69回日本癌学会総会. 2010
- ⑦ 城戸 顕, 朴木寛弥, 赤羽学, 山崎正晴, 田中康仁. がん患者の病的骨折リスク管理を目的とした新しい診療プロトコルの開発. 第43回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学会. 2010
- ⑧ 朴木寛弥, 藤井宏真, 久保篤史、城戸 顕, 森 俊夫、辻内俊文. ヒト肉腫幹細胞様細胞はアルデヒドデヒドロゲナーゼ1およびDNA修復酵素を高発現し強い薬剤抵抗性を示す. 第68回日本癌学会総会. 2009
- ⑨ 城戸 顕, 芳谷和洋, 朴木寛弥, 藤井宏真. 低濃度ビスフォスフォネート製剤による造骨性肉腫細胞株の局所浸潤能の増強作用. 第68回日本癌学会総会. 2009
- ⑩ 藤井宏真、朴木寛弥、城戸 顕、芳谷和洋、高倉義典. イホマイド脳症における危険因子の検討. 第82回日本整形外科学会総会. 2009
- ⑪ 朴木寛弥. がん細胞の社会学~良・悪性を隔てるもの~. 第209回大阪臨床整形外科医会研修会. 2009.
- ⑫ 朴木寛弥, 藤井宏真, 城戸 顕, 辻内俊文. ユーイング肉腫細胞株HTB166における化学療法抵抗性幹細胞様細胞の単離. 第67回日本癌学会総会. 2008
- ⑬ 宮内義純, 三井宜夫, 森下亨, 朴木寛弥, 城戸 顕, 芳谷和洋, 藤井宏真, 高倉義典. 高純度β-TCPによる良性骨腫瘍の治療. 第41回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学会.

2008

[図書] (計 1 件)

- ① Honoki K,
Fujii H, Tsujiuchi T. Cancer Stem Cell
Niche: The Role of Mesenchymal Stem
Cells in Tumor Microenvironment. In:
Cancer Stem Cells (ISBN
978-953-307-1454-5), INTECH d.o.o.,
Rijeka, Croatia, 2011, *in press*(査読
有).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴木寛弥 (HONOKI KANYA)
奈良県立医科大学・医学部医学科・講師
研究者番号：40336863

(2) 研究分担者

辻内俊文 (TSUJIUCHI TOSHIFUMI)
近畿大学・理工学部生命科学科・教授
研究者番号：10254492

(3) 研究協力者

田中康仁 (TANAKA YASUHITO)
奈良県立医科大学・医学部医学科・教授
研究者番号：30316070
藤間保晶 (TOHMA YASUAKI)
奈良県立医科大学・医学部医学科・博士
研究員
研究者番号：60448777