

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790310

研究課題名（和文）骨髄由来間葉系幹細胞の c-Myc による発癌モデル構築と発癌機構解明、その克服

研究課題名（英文）Establishment and analysis of mouse tumor models from multipotent bone marrow stromal cells overexpressing c-MYC

研究代表者

清水 孝恒（SHIMIZU TAKATSUNE）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40407101

研究成果の概要（和文）：マウス骨髄ストローマ細胞に *Ink4a*<sup>-/-</sup>、c-Myc 過剰発現の条件を付加することにより骨肉腫の発生が確認された。single cell cloning により骨肉腫の tumor initiating cell として骨、軟骨前駆細胞（AX 細胞）と間葉系幹細胞（MSC）の性質を有する（AO 細胞）2 種の細胞が同定された。前者の分画は発癌能が高く骨肉腫幹細胞の性質を有していた。後者の細胞からの発癌には脂肪分化能の喪失が必要であった。また骨肉腫幹細胞に PPAR $\gamma$  を導入し脂肪分化能の回復させたとこ腫瘍形成能が抑制された。以上から脂肪分化は骨肉腫形成に負に働くことが解明され、発癌には分化の因子も重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：By overexpressing c-MYC in mouse bone marrow stromal cells (BMSCs) derived from *Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup> mice, we generated mouse osteosarcoma *in vitro*. To clarify the cells of origin of OS, we performed single cell cloning. According to differentiation potentials, those c-MYC expressing BMSCs were composed of two distinctly different clones: bipotent (osteogenic and chondrogenic) cells designated AX cells and tripotent (adipogenic, osteogenic, and chondrogenic) cells termed AO cells. AX cells were derived from osteo-chondro-committed progenitor cells, while AO cells were originated from MSCs. Bipotent AX cells were highly tumorigenic and possessed high propensity for distant metastasis that mimics human disease. In addition, they showed both terminal differentiation and self-renewal capacity *in vivo*, which are properties ascribed to cancer stem cell. Notably, tripotent AO cells also developed lethal OS in syngeneic mice more slowly and less frequently than AX cells. Moreover, during OS development tripotent AO cells lost their adipogenic potential and transformed into AX-like cells *in vivo*. Thus, the loss of adipogenic potential was suggested to be an essential event for OS development. The PPAR $\gamma$  knockdown afforded tripotent AO cells the advantage to OS formation in both differentiation and proliferation. In contrast, overexpression of PPAR $\gamma$  in bipotent AX cells attenuated their tumorigenic activities. Therefore, our findings indicated that differentiation potentials played key roles on the tumor initiating activity and lineage commitment to osteocyte might be a critical factor for the OS development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
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：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は、骨髄中の付着細胞のうち低頻度で存在する非血液系の細胞であり、脂肪、骨、軟骨、筋、神経、血管内皮、上皮組織など幅広い組織への分化能をもつ。さらに、*in vitro*で急速に増殖させることができ、継代しても多分化能を維持し形質が安定である。このため再生医療の有力なツールとして注目され、実際に臨床応用が開始されている。さらに造血幹細胞移植における生着効率の上昇や移植片対宿主病 (GVHD) の予防効果、MSCの持つ免疫抑制能を利用した自己免疫疾患治療への応用などが報告され、今後の臨床応用の可能性は計り知れない。ところが、MSCからの発癌が大きな問題として浮上してきた。MSCから実際の疾患と同じ組織像を呈する間葉系腫瘍を作製した報告がなされ、起源細胞となる可能性が示唆されている。MSCを起源とした発癌に関するdataは蓄積されつつあるが、一方で発癌機構に関しては不明な点が多い。MSCの発癌機構解明は癌治療開発の観点から急務であり、再生医療、臨床応用への安全性確立にも大きく貢献する。

### 2. 研究の目的

- 1) MSCからの発癌条件の検討：申請研究の第一段階としてc-Mycの過剰発現、INK4aの欠損によりMSCは発癌するか、癌化に必要な最小限の分子変化は何かを解明する。同時に骨芽細胞などMSCから分化した間葉系前駆細胞レベルにおける腫瘍化も検討する。本解析によりMSCからの発癌モデルの構築を目指すと共に、間葉系悪性腫瘍の起源細胞を明らかにしたい。
- 2) 腫瘍組織型決定因子の解明：多分化能を有するMSCが癌化した場合どのような組織型の腫瘍ができるか、その組織型を決定する因子は何かを解明したい。即ち、腫瘍の組織型は、起源細胞にプログラムされた遺伝子レベルで決定されるか、腫瘍の形成する場、微小環境、環境因子(いわばcancer niche)で決定されるかを明らかにする。
- 3) 発癌機構の解明：発癌及び癌の維持におけるc-Mycの過剰発現、INK4aの欠損の関与を

明らかにする。c-Mycの標的遺伝子の検索、染色体不安定性の解析を通して本発癌系における直接の鍵分子を明らかにする。INK4aの欠損により、細胞は腫瘍排除機構を失うと考えられるが、MSCからの発癌におけるp16、p19の直接関与を解明する。

- 4) 癌治療モデルの確立：構築するモデルとヒト悪性腫瘍の相同性を確認し、治療モデルとしての妥当性を検証する。確立したMSCからの発癌マウスモデルは臨床治験も念頭に置き種々の薬剤のスクリーニングに用いる。

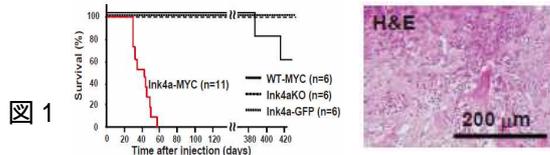
### 3. 研究の方法

- 1) 骨髄ストローマ細胞の採取及びc-MYCの過剰発現：C57BL/6マウスの野生型及びInk4a/Arf欠損型の大腿骨、頸骨から骨髄細胞を採取、抗CD45抗体、抗lineage抗体を用いて血液細胞を除去した。得られたストローマ細胞はMSCより派生する様々な分化段階の様々なlineageの細胞を含む。分化能は骨・軟骨・脂肪の分化条件で培養することにより検討した。これらのストローマ細胞にレトロウイルス(pMX-1g)感染によりc-MYCを導入した。感染細胞はGFPも発現しているためcell sorterにより分取した。
- 2) *in vivo*での腫瘍形成能の検討：樹立したc-MYC過剰発現細胞、及びコントロール細胞をC57BL/6マウスの野生型に腹腔、皮下、大腿骨内移植することにより腫瘍形成能を検討した。
- 3) 腫瘍起源細胞の同定・発癌条件の検討：骨髄ストローマ細胞では各分化段階やlineageに特異的に発現する表面抗原マーカーが知られておらず、血液細胞の様に分取ができない。このため、腫瘍形成が認められた細胞を限界希釈しsingle cell cloningすることにより起源細胞を同定した。分化能の違いに注目し、骨・軟骨・脂肪の分化能を示すMSC分画及び骨・軟骨の分化能を示す前駆細胞分画の2群に分けられた。さらに細胞起源の分子的背景を検討するため、網羅的遺伝子発現解析を行なった。

### 4. 研究成果

- 1) 腫瘍モデルの確立  
MSCを含む骨髄ストローマ細胞の腫瘍形成

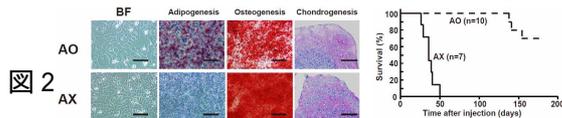
能を検討した結果、Ink4a/Arf 欠損、c-MYC 過剰発現の条件 (Ink4a<sup>-</sup>MYC 細胞) により早い腫瘍形成が観察された。これらは全例骨肉腫であった (図 1)。



興味深いことに野生型骨髄ストローマ細胞に c-MYC を過剰発現させた細胞 (WT-MYC) から長期観察期間を経て骨肉腫形成が見られた。さらに、骨肉腫から細胞を樹立して解析した結果、p16, p19 の発現は著明に低下しており、野生型細胞からの腫瘍化においても Ink4a/Arf の欠損が重要に関与している可能性が示唆された。

## 2) 腫瘍化の分子機構の解明

腫瘍起源細胞の同定: 高い腫瘍形成能を示す Ink4a<sup>-</sup>MYC 細胞に対し single cell cloning を施行し、分化能に応じて 2 群の細胞に分類した (図 2)。一つは骨・軟骨・脂肪 3 系統への分化能を示す AO 細胞、もう一方は骨・軟骨 2 系統への分化能を示す AX 細胞である。



網羅的遺伝子発現解析の結果と合わせて、AO 細胞は MSC 由来、AX 細胞は骨・軟骨前駆細胞由来であることが明らかとなった。これらの細胞の腫瘍形成能を比較したところ、より分化度の高い AX 細胞から早い骨肉腫形成が見られた。一方興味深いことに、長期観察期間を経て AO 細胞からも組織学的に AX 細胞と同様の骨肉腫が形成された。以上の結果から骨肉腫の起源細胞は MSC 及び骨・軟骨前駆細胞であることが明らかとなった。さらにこれらの細胞から発生する腫瘍は骨肉腫のみであり、細胞の移植場所の変化や、PPAR $\gamma$  アゴニストを投与して脂肪への分化条件を付加しても他の組織系の腫瘍は形成しなかった。腫瘍の組織系は cell autonomous な機構 (Ink4a/Arf 欠損、c-MYC 過剰発現) で決定される可能性が示唆された。分化能と腫瘍形成能の関係解明: 以上の結果からより分化度の高い細胞 (AX) がより高い腫瘍形成能を示した。そこで、腫瘍形成能を修飾する因子として MSC で見られ骨・軟骨前駆細胞で消失する脂肪分化能に注目した。AO 細胞から形成した骨肉腫より AOT 細胞を樹立したところ、脂肪分化能の消失、PPAR $\gamma$  の発現低下がみられた。(図 3)

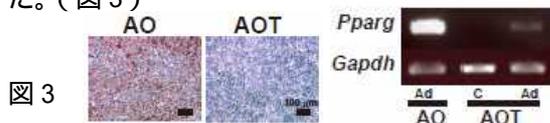
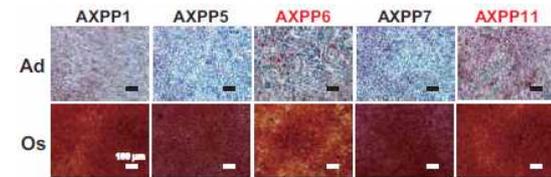
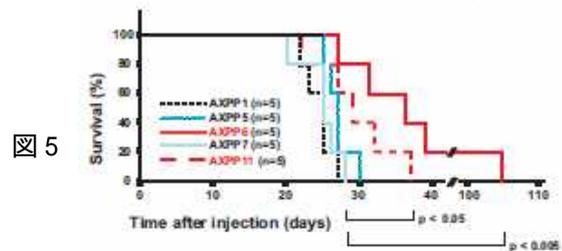


図 3

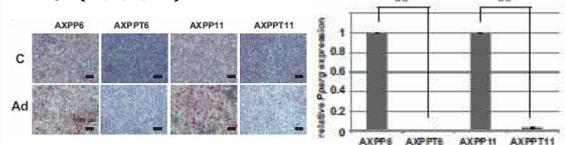
AO 細胞における PPAR $\gamma$  発現を shRNA でノックダウンし、脂肪分化能を低下させたところ、細胞は脂肪分化の条件においても増殖を続けた (AO 細胞は脂肪分化の条件において脂肪への最終分化に伴い細胞周期が停止する)。さらに、骨分化能の増強を認め、MSC における脂肪分化能の消失が骨肉腫形成に有利であることが示唆された。裏打ちの検討として、AX 細胞に PPAR $\gamma$  をレトロウイルスにて強制発現させ、脂肪分化能を回復するクローンを得た (AXPP6, 11 細胞) (下図 4)。



脂肪分化能を回復したクローンと PPAR $\gamma$  の発現が低く脂肪分化しないクローン間で腫瘍形成能を比較したところ (図 5)、脂肪分化したクローンでは骨肉腫の形成が遅れた。

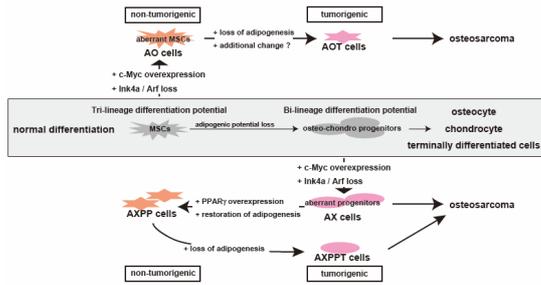


以上から脂肪分化能は骨肉腫形成に負に働く可能性が示唆された。しかしながら、脂肪分化を回復したクローンも最終的には骨肉腫を形成する。AXPP6, 11 細胞から形成した骨肉腫より AXPP7 細胞を樹立して脂肪分化能、PPAR $\gamma$  の発現を検討した結果、強制発現した PPAR $\gamma$  の発現低下、脂肪分化能の消失が見られた。(下図 6)



本研究から下記の重要な知見が得られた。免疫系が正常なマウスに発生するヒトの病態に極めて近い骨肉腫のモデルが樹立された。c-MYC 過剰発現、Ink4a/Arf 欠損は MSC、骨・軟骨前駆細胞より骨肉腫を起こすが、MSC からの発癌には脂肪分化の消失が必要である。即ち分化能が腫瘍形成能を修飾する (図 7)。c-MYC の過剰発現により多分化能を有する MSC から発生する腫瘍は骨肉腫のみであった。即ち腫瘍の組織型決定は遺伝子レベルで制御される可能性が高い。これらの解析結果は現在英文誌に投稿中である (Oncogene under revision)。

腫瘍形成能と分化の関係 (図7)



3) 新規癌治療法の開発

本研究で樹立された骨肉腫モデルは免疫系が正常なマウスに骨形成を伴う腫瘍を形成する。また皮下移植により多臓器への転移巣を形成し、極めてヒトの病態に近い。さらに腫瘍細胞は GFP でラベルされており in vivo で腫瘍細胞と微小環境構成細胞を容易に識別できる (図8)。

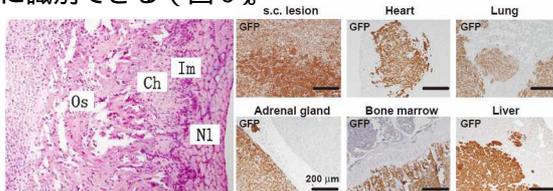
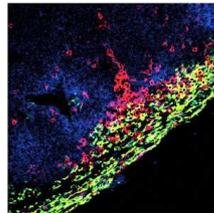


図8: 左: AX細胞より形成する骨肉腫 (Os: 骨形成, Ch:軟骨形成, Im: 未分化細胞, NI: 正常組織) 右: 多臓器への転移巣の形成

本モデルを活用し難治性ヒト悪性腫瘍である骨肉腫の新たな治療法開発に現在取り組んでいる。共同研究により、腫瘍は m-Csf を産生し腫瘍の周辺にはマクロファージが集積することが明らかとなった (図9)。

図9: AX由来骨肉腫周辺に集積するマクロファージ (赤) 青: AX細胞、緑: ストローマ細胞



m-Csf のレセプターである c-Fms を特異的に阻害することにより、マクロファージの集積は消失した。その結果、腫瘍血管・リンパ管の形成が阻害され腫瘍の進展が抑えられた。即ち c-Fms の阻害など腫瘍関連マクロファージを標的とした薬剤は骨肉腫の新規治療法に繋がる可能性が示唆された。この結果は 2009 年英文誌 J.Exp.Med に掲載された。

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 1 件)

Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H, Suda T. M-Csf inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis.

J.Exp.Med., 206;1089-1102, 2009. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

清水孝恒・Mesenchymal differentiation potentials modify osteosarcoma stem cell activities・101th Annual Meeting of American Association of Cancer Research・2010年4月21日・Washington

清水孝恒・Establishment and application of mouse osteosarcoma stem cells・第 68 回日本癌学会学術総会・2009年10月2日・横浜

清水孝恒・Establishment of osteosarcoma stem cell from bone marrow stromal cells・第 67 回日本癌学会学術総会・2008年10月28日・名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所遺伝子制御部 (<http://genereg.jp/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 孝恒 (SHIMIZU TAKATSUNE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40407101

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし