

平成22年 5月 12日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791026

研究課題名（和文） 骨肉腫細胞における自己分泌型細胞運動刺激因子と骨形成関連分子の相互作用の解析

研究課題名（英文） Analysis of interaction between autocrine motility factor and molecules related to bone formation in osteosarcoma cells.

研究代表者

柳川 天志 (YANAGAWA TAKASHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40400725

研究成果の概要（和文）：

温熱刺激により転移を促進する分子である autocrine motility factor (AMF) の発現が減弱し細胞運動も温熱刺激により著明に減弱した。骨形成能には大きな変化は認められなかったが骨形成因子 BMP はサブタイプによって発現が減弱しているものと増強しているものがありこれらが相殺し合っている可能性が考えられた。骨転移病変と原発巣で糖代謝を比較したところ転移病変のほうが優位に高い値を示した。AMF は糖代謝にもかかわる分子であり転移巣のほうが高い糖代謝に寄与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Hyperthermia decreased motility of osteosarcoma cells via suppression of autocrine motility factor expression, while did not affect mineralization of osteosarcoma cells. Microarray revealed some subtypes of bone morphogenic protein (BMP) decreased by hyperthermia although others increased, that may compensate bone formation.

AMF is known to be identical to phosphoglucose isomerase that is an essential protein for glycolysis. We revealed metastatic tumor showed higher glucose than primary tumor did, that is compatible with the fact that AMF stimulates tumor motility and metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：autocrine motility factor、温熱刺激、転移、骨形成、糖代謝、FDG-PET

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで自己分泌型細胞運動刺激因子 (autocrine motility factor: AMF) について多くの報告をしてきた。AMF は細胞内の解糖系に必須の蛋白 phosphoglucose isomerase: PGI と相同分子であることを証明し、正常細胞を含むほとんどすべての細胞で細胞内には発現していることを報告している。しかし細胞外にこの分子を分泌するのはある種の腫瘍細胞だけであり、分泌された AMF は autocrine あるいは paracrine 的にその受容体 autocrine motility factor receptor: AMFR を介して腫瘍細胞を刺激し細胞運動を促進する。この性質により AMF は腫瘍の浸潤能、転移能を増強することが知られている。AMF は分泌に必須のシグナルペプチドを欠いておりその分泌機構はまだ明らかではないが細胞内の発現量が高い細胞は AMF を分泌するということが判明している。AMF は細胞運動を刺激する働き (サイトカイン活性) としての働きのほかに解糖系の酵素としての働き (PGI 活性)、神経細胞を栄養する働き、monocyte を成熟させる働きなど多岐にわたる。

上記のように AMF そのものの機能などは明らかになってきているが AMF の発現を調節するメカニズムについてはまだ不明な点が多い。最近、我々は低酸素状態に腫瘍細胞をおくことにより腫瘍細胞内の AMF の発現が増強するとともに分泌量が上昇することを確認した。これは hypoxia inducible factor: HIF-1 α の抑制により阻害されたため AMF の発現に HIF-1 α が関与している可能性が示唆されている。さらに我々は AMF の結合分子として poly(ADP-ribose) polymerase family-14: PARP14 を同定した。PARP14 は腫瘍細胞に高発現しており細胞内で AMF の分解を阻害していることが示された。この分子により腫瘍細胞において AMF の分泌が亢進していることが示唆された。

2. 研究の目的

近年放射線療法などと組み合わせて癌治療に用いられている温熱療法に着目して温熱刺激による骨肉腫細胞での AMF の発現変化を調べたところ AMF の発現は温熱刺激により低下することが判明した。AMF は細胞にストレスを与えた時にその発現が上昇することが多く、現在まで AMF の発現を低下させるような刺激は報告されていない

AMF は骨芽細胞が分化する際に高発現することが知られているため温熱刺激により骨肉腫細胞株で発現が変化する分子種をマイクロアレイにてピックアップし骨形成関連分子の発現の変化を調べることにした。

また AMF は解糖系の酵素でもあるため転移性骨腫瘍の糖代謝についても調べ、糖代謝と転移という二つの事象の中での AMF の役割を解明することをめざした。

AMF の mRNA レベルでの高発現は腫瘍の浸潤・転移につながるため AMF の発現を制御する因子などが明らかになれば AMF の発現抑制、ならびにこれに続く腫瘍の転移の抑制が期待できる。温熱療法の抗腫瘍効果のメカニズムはいまだ完全には判明していないが本研究により AMF を介した抗腫瘍効果の経路が示される可能性がある。骨肉腫は骨形成が強いもののほど悪性度が高いという報告があるが温熱療法により骨形成関連分子の発現が変化するならば温熱刺激により悪性度を変化させることが期待できると考え本研究を開始した。

3. 研究の方法

骨肉腫の細胞株としてヒト骨肉腫細胞株 Hu09、NOS を用いた。また骨芽細胞の細胞株としてマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。

通常の培養条件は 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ の存在下での培養であるが温熱刺激は 41 $^{\circ}$ C、5%CO₂ の存在下で 1 時間培養をした後に 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ に戻すという操作とした。

細胞の運動能は

(1) Transwell を用いて一定時間のうちにメンブレンに開けられた 8.0 μ m の pore を通過した細胞数をカウントすることにより評価する Transwell 法。

(2) プレパラートをアルブミンでコートしたのちに金コロイドを播種しその上に細胞を添加して、個々の細胞が金コロイド上に形成した軌跡の面積を測定することにより運動能を評価する金コロイド法。

を用いて測定した。

マイクロアレイは Isogen などの試薬を用いて RNA を抽出しマイクロアレイの評価で発現が 2 倍以上の増強・減弱を変化ありと定義した。細胞内の蛋白発現は Western blotting にて確認した。細胞外に分泌された AMF は無血清培地で一定時間細胞を培養したのちその培地を回収し、透析・濃縮したのちに Western blotting

にてその発現を確認した。

培養細胞株の骨形成能は培地に β -glycerophosphate、アスコルビン酸を添加して培養し、沈着した石灰成分をAlizarin red S で染色して評価した。

転移性骨腫瘍の糖代謝については24症例の原発巣と転移巣にそれぞれ関心領域を設定しグルコースの類似体である 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose: FDG をトレーサーとした 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose positron emission tomography: FDG-PETにて測定した。各腫瘍におけるFDGの取り込みをstandardized uptake value: SUV で表し評価した。

4. 研究成果

まず、1時間の温熱刺激を骨肉腫細胞株に与えてAMFの発現を調べたところmRNAレベルでAMFの発現低下が確認された。さらに細胞内のAMFの蛋白発現量はさほど変わらなかったものの蛋白分泌量はやはり減少した。続いて細胞の運動の変化を測定したところ細胞運動は温熱刺激により著明に減弱した。これらのことから骨肉腫細胞においては温熱刺激によりAMFを介した運動能・転移能が抑制されることが示唆された。またDNAマイクロアレイにて遺伝子の発現変化を比較し、温熱刺激に特異的と考えられる遺伝子をいくつか検出した。骨形成関連遺伝子の発現が認められ、これらの転写因子とAMFの関連が示唆された。しかし骨形成能には大きな変化は認められなかった。マイクロアレイの結果をみると骨形成因子BMPの発現に関してサブタイプによって減弱しているものと増強しているものがありこれらが相殺し合っている可能性が考えられた。AMFは糖代謝に関わる分子PGIと相同な蛋白であることが知られている。このため*in vivo*で細胞や組織の糖代謝を調べられるFDG-PETを用いて様々な骨腫瘍細胞の糖代謝を調べた。糖を細胞内に取り込む分子としてグルコーストランスポーター(GLUT)が知られているがそのアイソザイムの発現を調べ、各腫瘍における糖の取り込みに重要なGLUTアイソザイムをいくつか確認した。また化学療法の前後での手術材料を用いて骨肉腫細胞のAMF発現、FDG-PETで評価された糖代謝などの因子と生命予後の関連の解析を行った。興味深いことに化学療法後のAMFの発現と糖代謝は生命予後と相関していたものの、化学療法前のデータと生命予後との相関は認められなかった。これはClin Exp Metastasis に掲載されるなど一定の評価を受けているAMFの発現がFDG-PETで評価された糖代謝の指標となる値standardized uptake value(SUV)と相関するという知見をもとに転移性骨腫瘍をFDG-PETにて解析した。骨への転移病変のSUVと原発巣のSUVを比較したところ転移病変のほうが優

位に高い値を示した。これはJ Bone Joint Surg Br に掲載されている。AMFは転移を促進する分子であり、かつ糖代謝に必須の酵素である。転移巣のほうが高い糖代謝を示したことは今までの知見と矛盾しない結果であると考えられた。また悪性度の高い腫瘍細胞ほど糖代謝が亢進していることが古くから知られている。今後糖代謝をコントロールする分子を標的として腫瘍の代謝を抑えるとともに転移を制御できる可能性があることが示された。

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 3 件)

① Yanagawa T, Shinozaki T, Iizuka Y, Takagishi K, Watanabe H. Role of 2-deoxy-2-[F-18] fluoro-D-glucose positron emission tomography in the management of bone and soft-tissue metastases. J Bone Joint Surg Br. 2010 Mar;92(3):419-23. (査読あり)

② 柳川 天志, 篠崎 哲也, 高岸 憲二, 渡邊 秀臣
骨・軟部腫瘍診断における PET の有用性
関節外科(27), 2008, 214-23. (査読なし)

③ Sato J, Yanagawa T, Dobashi Y, Yamaji T, Takagishi K, Watanabe H. Prognostic significance of 18F-FDG uptake in primary osteosarcoma after but not before chemotherapy: a possible association with autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase expression. Clin Exp Metastasis. 2008;25(4):427-35. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

① 柳川 天志
転移性骨腫瘍とPET
第29回 日本画像医学会 2010年2月26日、東京都

② 柳川 天志, 渡邊 秀臣
リン酸化 autocrine motility factor の機能解析
第18回日本がん転移学会学術集会・総会、2009年7月23日、旭川市

③ 柳川 天志, 篠崎 哲也, 渡邊 秀臣, 高岸 憲二

FDG-PETの転移性骨・軟部腫瘍の診断における有用性の検討
第42回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2009年7月16日、横浜市

④ 柳川 天志

PGI/AMF 結合因子 PAR14 の機能解析
第7回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会、2009年4月11日、東京都

⑤ 柳川 天志

骨軟部腫瘍における PET での FDG 集積機序の解析
第6回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会、2008年4月12日、東京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 天志 (YANAGAWA TAKASHI)
群馬大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号：24485369