

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09250

研究課題名(和文)人工骨肉腫幹細胞を用いた骨肉腫新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment strategies for osteosarcoma using induced osteosarcoma stem cells

研究代表者

河本 旭哉 (Kawamoto, Teruya)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：30420558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、我々が先行研究で作成に成功した人工骨肉腫幹細胞MG-OKSを用いて、骨肉腫における新たな治療標的の探索を行うことである。

人工骨肉腫幹細胞MG-OKSにおいて親細胞株MG-63よりも有意に発現上昇していたSPRR1Aに着目し、選択的siRNAによる発現阻害を行ったところ、in vitroにて細胞形態変化、細胞増殖能・遊走能の低下をみとめ、in vivoでは腫瘍形成能低下、Ki-67の発現低下をみとめた。さらに網羅的遺伝子解析によって、細胞接着および細胞周期に関わる遺伝子発現が変化することを示した。本研究の結果からSPRR1Aが骨肉腫において新たな治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、希少かつ治療困難な骨肉腫において、研究者らが作成に成功した人工骨肉腫幹細胞を応用して行った初めての基礎研究である。間葉系由来の悪性腫瘍である骨肉腫において、本来着目されにくい上皮系関連因子SPRR1Aの機能を検討し、骨肉腫の細胞形態、細胞増殖、腫瘍形成に関与する可能性を示した革新的な研究である。得られた結果を元に今後さらなる検討を続けることで、骨肉腫における幹細胞機能を解明することに繋がり、骨肉腫の新たな病態理解や治療標的分子の同定とそれらに基づく新規治療開発を行うことが期待出来る非常に有用な成果であり、学術的意義、社会的意義ともに非常に高いものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to explore the new therapeutic targets in osteosarcoma using MG-OKS, an engineered osteosarcoma stem cells, that we have successfully generated in a previous study.

We focused on SPRR1A, which was significantly upregulated in the engineered osteosarcoma stem cells MG-OKS compared to the parental cell line MG-63. We investigated the roles of SPRR1A in osteosarcoma by inhibition of SPRR1A expression in MG-OKS using selective siRNA. In vitro, we found that alternation in cell morphology, and decreased cell proliferation and migration abilities in SPRR1A inhibited MG-OKS, and in vivo, a decrease in tumorigenicity and Ki-67 expression was observed. Comprehensive genetic analysis showed that the expression of genes related to cell adhesion and the cell cycle was altered. These results suggest that SPRR1A may be a new therapeutic target for osteosarcoma.

研究分野：骨軟部悪性腫瘍

キーワード：骨肉腫 肉腫幹細胞 がん幹細胞 治療標的 SPRR1A

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨・軟部組織に発生する悪性腫瘍である骨軟部肉腫は、罹患率人口 10 万人に 3 人未満の希少がんである。1970 年代以降、術前後の化学療法と広範切除により治療成績は大幅に改善したが、5 年生存率は非転移例で 70%、転移例ではさらに低くその傾向は近年において変化が乏しい。近年の幹細胞研究の進歩に伴い、がん組織においても『がん幹細胞 (Cancer stem cell)』と呼ばれる未分化な細胞集団が存在し、がんの発生、再発や転移、治療抵抗性など、その悪性化に重要であることが明らかとなってきた。この『がん幹細胞』の性質や機能を解析することが新たながん治療に繋がると考えられるが、極めて少数の細胞集団である『がん幹細胞』を腫瘍組織から分離・同定することは非常に困難かつ労力を要する。そこで我々はより効率的に『がん幹細胞』に対する研究を行うべく、先行研究にて共同研究者である青井らとともに、既存のヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 に *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2* を遺伝子導入することによって骨肉腫と『がん幹細胞』の特性を併せ持つ人工骨肉腫幹細胞 MG-OKS を作成することに成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨肉腫とがん幹細胞の特性を併せ持つ人工骨肉腫幹細胞 MG-OKS を研究対象とし、骨肉腫における『がん幹細胞』の特性を探索することによって、骨肉腫における新たな治療法の探索を行う。先行研究においてこの人工骨肉腫幹細胞 MG-OKS と元の細胞株である MG-63 に対して網羅的遺伝子解析を行い、MG-OKS で発現上昇のみられた遺伝子を抽出、それら遺伝子で Gene Ontology 解析を施行したところ、間葉系細胞由来である骨肉腫において本来特徴的な発現がみられない上皮系細胞の形成・機能に関与する遺伝子発現が上昇しているという結果が得られた。有意な発現上昇のみられた遺伝子の中から、過去に悪性腫瘍との関連が報告されている *SPRR1A* (small proline-rich protein 1A) に着目した。*SPRR1A* はヒト上皮角化肥厚膜に含まれる架橋された膜タンパク質であり、ケラチノサイトの分化マーカーや心筋に対する保護作用、神経再生への関与などの報告とともに、乳がんや大腸がんにおいて予後不良と関連するとの報告がある。しかしこの *SPRR1A* と骨肉腫に関連した基礎研究報告は管見の限りなく、その機能は明らかになっていない。本研究の目的は、我々が作成に成功した人工骨肉腫幹細胞を用いて *SPRR1A* の骨肉腫における機能解明を行うことである。

### 3. 研究の方法

先行研究と同様に既存の骨肉腫細胞株 MG-63 に対してレトロウイルスベクターにて *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2* を導入して人工骨肉腫幹細胞 MG-OKS を作成した。この MG-OKS に対し、Lipofection 法を用いて *SPRR1A* 選択的 siRNA を導入することで *SPRR1A* の発現阻害を行った。同細胞を用いて *in vitro* にて遺伝子発現、細胞形態変化、細胞増殖能、細胞遊走能を評価し、さらに *in vivo* にて腫瘍形成能、組織学的検討を下記のごとく行った。

#### (1) ヒト骨肉腫由来細胞株を用いた人工骨肉腫幹細胞の作成

先行研究と同様、親細胞株としてヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 を用い、レトロウイルスベクターにて *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2* を導入して作成した MG-OKS、コントロールとして GFP を導入した MG-GFP を作成し、リアルタイム PCR (RT-qPCR) にて導入遺伝子の発現 (*OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*, *CD24*, *CD26*, *CD133*) を確認した。

(2) MG-OKS に対する SPRR1A の発現阻害

MG-OKS に対して Lipofection 法を用いて SPRR1A 選択的 siRNA を導入することで SPRR1A 発現を阻害した siMG-OKS, コントロールとして意味を持たない配列を持つ scramble siRNA を同様の手順で導入した scMG-OKS を作成した. SPRR1A の knock down について, 遺伝子レベル, 蛋白レベルでの確認をそれぞれ RT-qPCR, Western blot で行った.

(3) MG-OKS に対する SPRR1A の knock down による phenotype の評価

(2)で作成した siMG-OKS, scMG-OKS において, 細胞形態の変化を位相差顕微鏡, 細胞増殖能を WST-8 assay, 細胞遊走能を Wound healing assay によって評価した. また次世代シーケンスを用いて siMG-OKS において有意に発現変動している遺伝子を抽出した.

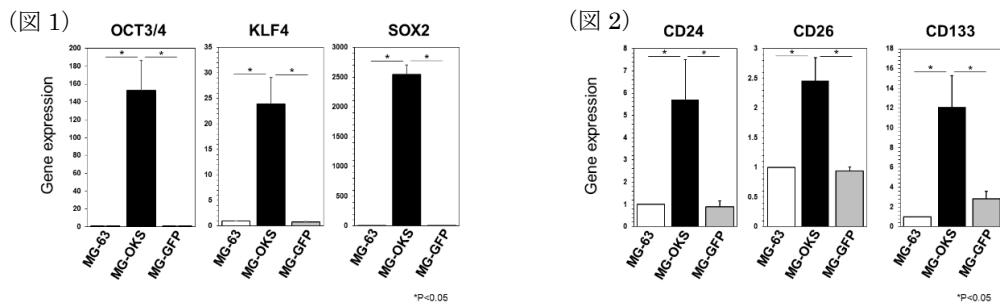
(4) MG-OKS に対する SPRR1A 発現阻害による腫瘍形成能の評価

5 週齢雄のヌードマウス (Balb/c-mu)の背部皮下に MG-OKS, siMG-OKS および scMG-OKS を移植して xenograft model を作成した. 4 週間経過後, 形成された腫瘍の体積を実測および  $\mu$ CT で計測し, 腫瘍組織内の評価として Ki-67 の発現を蛍光免疫染色で検討した.

4. 研究成果

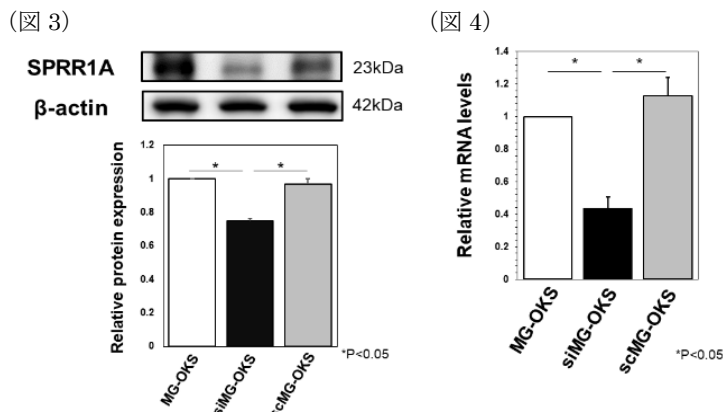
(1) ヒト骨肉腫由来細胞株を用いた人工骨肉腫幹細胞の作製

先行研究に従いレトロウイルスベクターにて *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2* を導入した MG-OKS において, 導入遺伝子および幹細胞マーカーが有意に発現上昇していることを確認した(図 1, 2).



(2) MG-OKS に対する SPRR1A の発現阻害

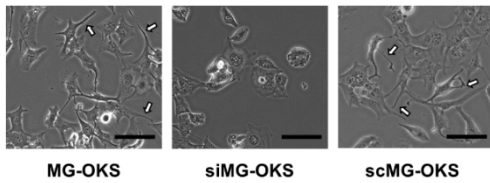
SPRR1A を発現阻害した siMG-OKS およびコントロールである scMG-OKS における SPRR1A 発現変化を Western blot および RT-qPCR によって確認した. siMG-OKS において有意なタンパク発現の低下(図 3)と遺伝子発現の低下をみとめた(図 4).



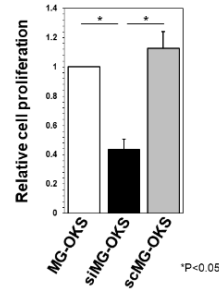
(3) MG-OKS に対する SPRR1A の knock down による phenotype の評価

siMG-OKS, scMG-OKS および MG-OKS を用いて SPRR1A の knock down に伴う phenotype の変化を評価した。細胞形態の変化を位相差顕微鏡にて確認したところ、MG-OKS にて確認された細胞突起の伸張が scMG-OKS では維持されていたが、siMG-OKS においては減少していた(図 5)。さらに siMG-OKS では細胞増殖能(図 6)と細胞遊走能(図 7)の有意な低下をみとめた。

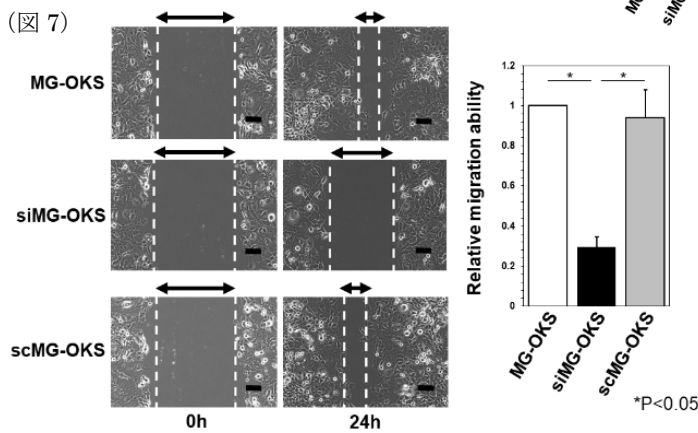
(図 5)



(図 6)

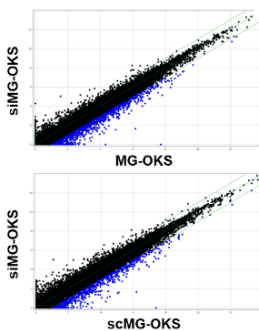


(図 7)

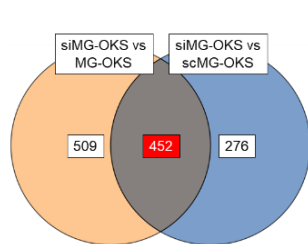


次世代シーケンスを用いて siMG-OKS と MG-OKS, scMG-OKS での遺伝子発現をそれぞれ比較したところ、siMG-OKS において 2 倍以上の発現低下をみとめた遺伝子がそれぞれ 961 個、728 個あり(図 8)、両比較で共通して発現低下がみられた遺伝子は 452 個であった(図 9)。これら遺伝子群を用いて pathway 解析を行ったところ、細胞形態・性質に関連する 11 の特徴的な pathway が検出された(図 10)。また、siMG-OKS で有意に発現変化をみとめた遺伝子として、ITGA5・ITGB3・ITGB4・PTK2 など細胞接着に関わる遺伝子の発現低下(図 11)と、細胞周期に関わる遺伝子である CDKN1B の発現上昇および CDK2 の発現低下をみとめた(図 12)。これら次世代シーケンスによる解析から、SPRR1A の発現阻害によって骨肉腫細胞に対して細胞接着および細胞周期に影響することが示唆される結果となった。

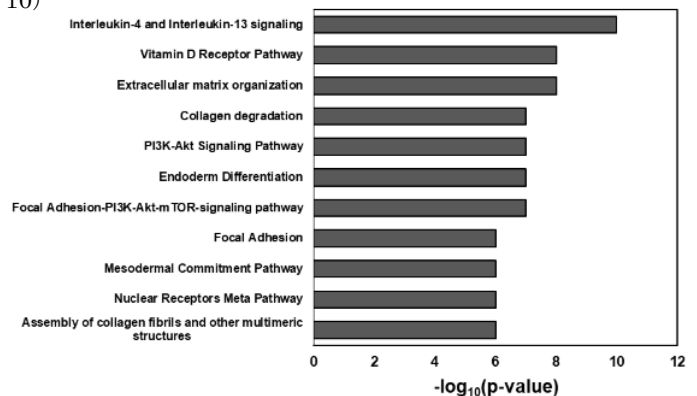
(図 8)



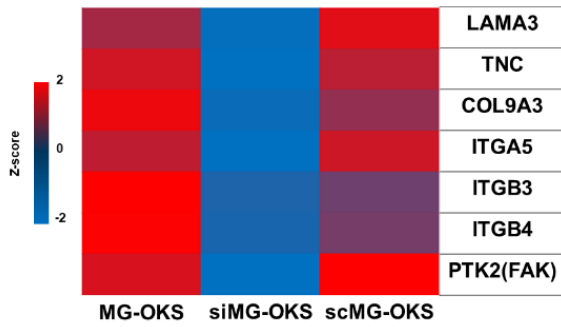
(図 9)



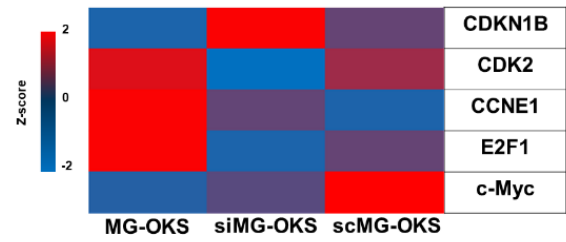
(図 10)



(図 11)



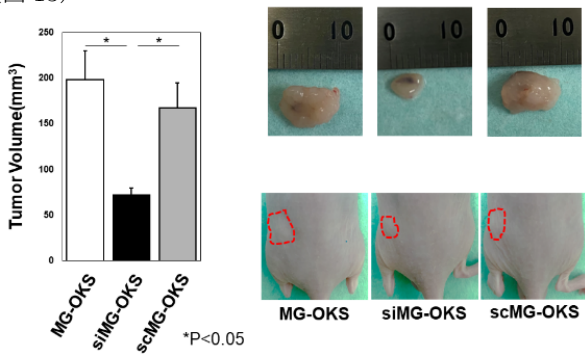
(図 12)



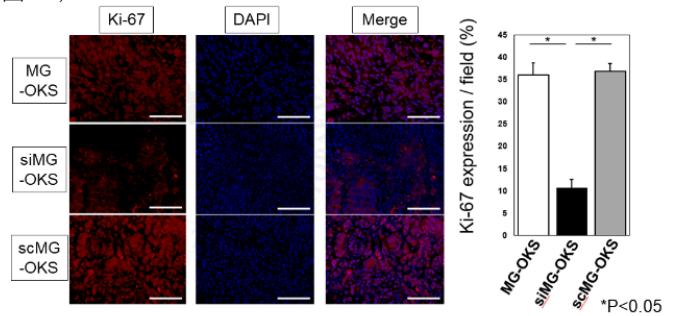
#### (4) MG-OKS に対する SPRR1A の knock down による腫瘍形成能の評価

SPRR1A の発現阻害をおこなった MG-OKS が生体内でどのような phenotype を示すかについて in vivo で検討した。5 週齢雄のヌードマウス(Balb/c-mu)の背部皮下に MG-OKS, siMG-OKS, scMG-OKS を移植して xenograft model を作成した。皮下移植 4 週後の腫瘍体積は siMG-OKS で有意に小さかった(図 13)。また、形成された腫瘍内の Ki-67 発現について蛍光免疫染色で検討したところ、有意な発現低下をみとめた(図 14)。

(図 13)



(図 14)



本研究では我々が作成に成功した人工骨肉腫幹細胞 MG-OKS において有意な発現上昇をみとめた SPRR1A に着目し、骨肉腫における機能の検討をおこなった。MG-OKS で SPRR1A を発現阻害することによって、in vitro では細胞形態の変化、細胞増殖能および細胞遊走能の低下をみとめ、in vivo では腫瘍形成能の低下と Ki-67 の発現低下をみとめた。また、次世代シーケンスを用いた網羅的遺伝子解析によって、細胞接着および細胞周期に関わる遺伝子発現が変化することを示した。本研究は人工骨肉腫幹細胞を使用した初めての研究であり、SPRR1A が骨肉腫において新たな治療標的になる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanda Yutaro, Kakutani Kenichiro, Sakai Yoshitada, Miyazaki Kunihiko, Matsuo Tomoya, Yurube Takashi, Takeoka Yoshiki, Ohnishi Hiroki, Ryu Masao, Kumagai Naotoshi, Kuroshima Kohei, Hiranaka Yoshiaki, Kawamoto Teruya, Hara Hitomi, Hoshino Yuichi, Hayashi Shinya, Akisue Toshihiro, Kuroda Ryosuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical Characteristics and Surgical Outcomes of Metastatic Spine Tumors in the Very Elderly: A Prospective Cohort Study in a Super-Aged Society	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4747 ~ 4747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm12144747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara Hitomi, Kawamoto Teruya, Fukase Naomasa, Sawada Ryoko, Fujiwara Shuichi, Yahiro Shunsuke, Miyamoto Tomohiro, Terakawa Tomoaki, Mifune Yutaka, Hoshino Yuichi, Kakutani Kenichiro, Matsumoto Tomoyuki, Matsushita Takehiko, Niikura Takahiro, Kuroda Ryosuke, Akisue Toshihiro	4. 巻 49
2. 論文標題 Outcomes of palliative surgery for bone metastasis of metastatic renal cell carcinoma in the era of targeted therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 928 ~ 933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2022.11.094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uemura Kotaro, Komatsu Masato, Hara Shigeo, Kawamoto Teruya, Bitoh Yuko, Itoh Tomoo, Hirose Takanori	4. 巻 47
2. 論文標題 CYP1A1 Is a Useful Diagnostic Marker for Angiofibroma of Soft Tissue	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 547 ~ 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000002029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Tomoaki, Oe Keisuke, Kawamoto Teruya, Morishita Masayuki, Fujita Ikuo, Takahara Shunsuke, Sakurai Atsushi, Iwakura Takashi, Yoshida Keiji, Ito Kenjiro, Shoda Etsuo, Hiranaka Takafumi, Tsunoda Masaya, Kuroda Ryosuke, Niikura Takahiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Multicenter study on atypical femoral fractures in patients with bone metastases taking bone-modifying agents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100478 ~ 100478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbo.2023.100478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kito Munehisa, Ae Keisuke, Okamoto Masanori, Endo Makoto, Ikuta Kunihiro, Takeuchi Akihiko, Yasuda Naohiro, Yasuda Taketoshi, Imura Yoshinori, Morii Takeshi, Kikuta Kazutaka, Kawamoto Teruya, Nezu Yutaka, Baba Ichiro, Ohshika Shusa, Uehara Takeshi, Ueda Takafumi, Takahashi Jun, Kawano Hirotaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Clinical Outcome of Low-Grade Myofibroblastic Sarcoma in Japan: A Multicenter Study from the Japanese Musculoskeletal Oncology Group	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2314 ~ 2314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15082314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Akihiko, Tsuchiya Hiroyuki, Setsu Nokitaka, Gokita Tabu, Tome Yasunori, Asano Naofumi, Minami Yusuke, Kawashima Hiroyuki, Fukushima Suguru, Takenaka Satoshi, Outani Hidetatsu, Nakamura Tomoki, Tsukushi Satoshi, Kawamoto Teruya, et al	4. 巻 481
2. 論文標題 What Are the Complications, Function, and Survival of Tumor-devitalized Autografts Used in Patients With Limb-sparing Surgery for Bone and Soft Tissue Tumors? A Japanese Musculoskeletal Oncology Group Multi-institutional Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Orthopaedics & Related Research	6. 最初と最後の頁 2110 ~ 2124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CORR.0000000000002720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shunsuke Yahiro, Shuichi Fujiwara, Teruya Kawamoto, Hitomi Hara, Naomasa Fukase, Ryoko Sawada, Toshiyuki Takemori, Tomohiro Miyamoto, Michiyo Koyanagi-Aoi, Takashi Aoi, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue
2. 発表標題 Identification of Slow-Cycling Cells in Ewing sarcoma
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiro Miyamoto, Shuichi Fujiwara, Teruya Kawamoto, Hitomi Hara, Naomasa Fukase, Ryoko Sawada, Toshiyuki Takemori, Shunsuke Yahiro, Michiyo Koyanagi-Aoi, Takashi Aoi, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue
2. 発表標題 Roles of SPRR1A in osteosarcoma cells
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本智弘、藤原周一、河本旭哉、原仁美、深瀬直政、澤田良子、八尋俊輔、青井貴之、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 骨肉腫細胞におけるSPRR1Aの機能の探索
3. 学会等名 第56回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本智弘、藤原周一、河本旭哉、原仁美、深瀬直政、澤田良子、八尋俊輔、青井貴之、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 骨肉腫細胞におけるSPRR1Aの機能の探索
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiro Miyamoto, Shuichi Fujiwara, Teruya Kawamoto, Hitomi Hara, Naomasa Fukase, Ryoko Sawada, Toshiyuki Takemori, Shunsuke Yahiro, Michiyo Koyanagi-Aoi, Takashi Aoi, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue
2. 発表標題 Role s of SPRR1A in tumorigenesis of osteosarcoma : a study using newly generated artificial cancer stem cells
3. 学会等名 2024 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society ( 国際学会 )
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮本智弘、河本旭哉、深瀬直政、竹森俊幸、藤原周一、北山和道、八尋俊輔、青井貴之、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 骨肉腫細胞におけるSPRR1Aの機能の探索
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Tomohiro Miyamoto, Shuichi Fujiwara, Teruya Kawamoto, Hitomi Hara, Naomasa Fukase, Ryoko Sawada, Shunsuke Yahiro, Takashi Aoi, Michiyo Koyanagi-Aoi, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue
2. 発表標題 Roles of SPRR1A in osteosarcoma cells
3. 学会等名 ORS 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青井 貴之  (Aoi Takashi)  (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授   (14501)	
研究分担者	竹森 俊幸  (Takemori Toshiyuki)  (20884456)	神戸大学・医学研究科・医学研究員   (14501)	
研究分担者	森下 雅之  (Morishita Masayuki)  (30814321)	神戸大学・医学研究科・医学研究員   (14501)	
研究分担者	深瀬 直政  (Fukase Naomasa)  (60579324)	神戸大学・医学研究科・特命助教   (14501)	
研究分担者	原 仁美  (Hara Hitomi)  (40437489)	神戸大学・医学部附属病院・助教   (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	澤田 良子  (Sawada Ryoko)  (30648308)	神戸大学・医学部附属病院・医員    (14501)	
研究分担者	秋末 敏宏  (Akisue Toshihiro)  (90379363)	神戸大学・保健学研究科・教授    (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関