

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700887

研究課題名（和文） 間葉系悪性腫瘍（骨肉腫）の未分化性維持に関わる微小環境の解明

研究課題名（英文） Investigation of the roles of tumor environment in osteosarcoma

研究代表者

清水 孝恒（SHIMIZU TAKATSUNE）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40407101

研究成果の概要（和文）：我々は新規に樹立した骨肉腫マウスモデルを用いて、非腫瘍細胞（線維芽細胞、マクロファージ）から産生される Fgf2、Lif など液性因子が Erk1/2 を強力に活性化し、骨肉腫細胞の未分化維持に関わることを明らかにした。さらに Fgf2 は骨肉腫細胞の増殖、遊走を促進し抗癌剤への感受性低下にも関与した。Fgfr 阻害剤を用いた *in vivo* の治療効果検証ではアドリマイシンの効果を増強させた。以上の結果は、これらの液性因子が分化・非分化部を有する骨肉腫の病理・病態像形成に深く関わること、下流のシグナル伝達経路が骨肉腫の病勢を抑える有望な治療標的となる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：The roles of environmental soluble factors in the formation of histopathological characteristics of osteosarcoma (OS) remains to be elucidated. Here, a newly established murine OS model was used to clarify the roles of environmental factors such as fibroblast growth factor-2 (Fgf2) or leukemia inhibitory factor (Lif) in the maintenance of OS cells in an immature state. These factors were highly expressed in stromal fibroblasts and macrophages, but not in OS cells, and potently suppressed osteogenesis of OS cells *in vitro* and *in vivo*. Further investigations revealed that the activation of Erk1/2 induced by these factors was deeply involved in the process of OS differentiation. In addition, Fgf2 enhanced both proliferation and migratory activity of OS cells and modulated the sensitivity to an anti-cancer drug. These findings suggest that the seemingly chaotic structures of OS could be dependent on the distribution of such factors. The combined blockade of the signaling pathways of several growth factors, including Fgf2, might be useful in controlling the aggressiveness of OS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：癌、環境

1. 研究開始当初の背景

癌は自己複製能、増殖能、分化能をもつ癌幹細胞分画を含むことが報告されている。我々はマウス骨髄ストローマ細胞から

Ink4a/Arf -/- 及び c-MYC 過剰発現によりヒト骨肉腫の病態に極めて類似した腫瘍を形成する骨肉腫癌幹細胞 (AX 細胞) を樹立した。ユニークな特徴として、AX 細胞はクローンから

樹立されたにも関わらず、in vivo で未分化な部分と特異的な転写因子の活性化を伴い骨・軟骨に最終分化した部分を含み、分化の階層性をもつ腫瘍が形成される。もし、仮に移植した全ての細胞が最終分化した場合、細胞は枯渇し腫瘍は成立しないと考えられる。即ち、この腫瘍が全てのマウスを短期間で死に至らしめることは、in vivo において癌幹細胞の自己複製、未分化性を維持する機構の存在することを意味する。これまで固形腫瘍進展に重要な微小環境に関して、構成細胞 (tumor associated macrophage(TAM)、cancer associated fibroblast(CAF)、血管内皮細胞など) 液性因子、細胞外マトリックスなど様々な要素が報告されている。しかし固形腫瘍における微小環境の解析は、癌細胞の増殖、浸潤・転移、細胞死の抑制などに関与する因子の解明が中心で、in vivo における癌幹細胞の機能維持の観点から「真の cancer niche」に言及した報告は稀である。難治性間葉系悪性腫瘍である骨肉腫は小児に多く、診断時より肺微小転移が存在し、既存の抗癌剤に不応例は予後不良である。明らかとなる微小環境が、例えば正常造血幹細胞の niche の様に細胞を休止期状態 (quiescent) にする機能を有する場合、治療抵抗性機構の原因となる可能性がある。以上の背景から、骨肉腫癌幹細胞マウスモデルを用いた「癌幹細胞の未分化性を維持する微小環境の解明」は骨肉腫の cancer niche を標的とした新規治療法開発に大きく貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

新規に樹立した骨肉腫マウスモデルを用いて骨肉腫細胞が in vivo において環境から受ける役割を解明する。特に未分化性の維持、癌の進展に関わる因子に注目する。

(1) 癌幹細胞微小環境構成細胞の解明：骨肉腫を構成細胞に分け、間質構成細胞に注目して微小環境に寄与しうる細胞を同定する。解析が比較的容易な皮下の原発巣から着手する。次に、転移巣や骨髄を原発巣としたよりヒト骨肉腫に近い病態における解析を行う。

(2) 癌幹細胞と微小環境構成細胞の相互作用の解明：上記で同定した微小環境構成細胞と癌幹細胞との間の相互作用を明らかにする。ここでは、1. 液性因子、2. 接着を介した細胞間の直接作用、3. 細胞外マトリックスなど産生物質を介するものの大きく3つの観点から、真に癌幹細胞の未分化性維持に働く分子機構を明らかにする。

(3) 微小環境形成機構の解明：上記で明らかとなる癌幹細胞微小環境を既存の正常組織と比較し、cancer niche の形成機構を明らかにする。即ち、癌幹細胞は正常組織を niche

として利用するのか、もしくは正常組織に修飾を加えて自らに適した環境を作るのか、という問題の解明を目指す。

(4) 治療効果の検証：本項目では大きく2つの解析を行う。1. 上記解析結果から得られた分子機構の知見を踏まえ阻害剤、中和抗体、shRNA を用いた鍵分子のノックダウンを用いて分子機構の確認、in vivo における抗腫瘍効果を明らかにする。さらにモデルを種々の薬剤のスクリーニングに用いることによって cancer niche を標的とした治療法開発に繋げる。2. 上記解析から得られた分子機構が (既存の) 抗癌剤への耐性化機構としても機能するか解明する。

(5) ヒト骨肉腫における解析：マウスモデルから得られた骨肉腫癌幹細胞の微小環境がヒト骨肉腫においても存在し、機能しうるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 癌幹細胞微小環境構成細胞の解明：AX細胞を皮下に移植し形成した骨肉腫を DNase、Collagenase を含む medium で処理し single cell suspension を作成した。CD45, F4/80, Sca1 などの表面抗原マーカーと GFP (腫瘍細胞で発現) を用いて FACS にて腫瘍の構成細胞を分取した。これらの細胞の腫瘍内での局在は表面マーカーに対する抗体を使った免疫蛍光染色法にて確認した。

皮下モデルに加え骨髄内における腫瘍細胞の挙動に関しては、大腿骨顆間窩に 23G 針にて腫瘍細胞を骨髄内移植し観察した。

(2) 癌幹細胞と微小環境構成細胞の相互作用の解明：癌幹細胞の未分化性を維持する微小環境因子の同定はまず液性因子の解明より開始した。

第一段階として骨肉腫細胞から産生され autocrine, paracrine により腫瘍細胞自身に作用する因子を除外するため、腫瘍から分取した AX 細胞の gene expression profiling を行い遺伝子発現レベルの低い液性因子に注目した。(1)で分取した細胞から cDNA を作成し、real-time PCR 法にて腫瘍細胞、微小環境構成細胞における遺伝子発現を確認した。さらに免疫染色法により液性因子の in vivo における発現・局在を解析した。絞り込まれた液性因子が腫瘍細胞の分化に関して与える影響に関しては、recombinant の液性因子を骨分化培地に添加し Alizarin RedS 染色を行うことにより骨分化の抑制の程度を評価した。加えて、液性因子を長期 (1 か月以上) にわたって徐放するビーズを腫瘍細胞に混ぜて移植することにより液性因子を in vivo で過剰発現させることによる影響を評価した。さらに、real-time PCR 法により骨分化に必須な遺伝子群の発現を解析した。液性因子が骨肉腫細胞へもたらす細胞内シグ

ナル伝達経路の活性化に関しては western blot 法にて解析し、in vivo における pathway の関与は免疫染色により確認を行った。液性因子の細胞増殖に与える影響は細胞内在性 ATP を定量化することで評価し、遊走能、浸潤能における効果は transwell membrane filter を用いて解析した。液性因子に対する腫瘍細胞の受容体発現レベルは遺伝子を real-time PCR 法にて、タンパクを免疫染色法で解析した。受容体に対する阻害剤・siRNA、シグナル伝達分子に対する阻害剤を用いて液性因子の腫瘍細胞の分化に与える影響をキャンセルできるか即ち、受容体を含めたシグナル伝達経路が関わっているか評価した。

(3) 微小環境形成機構の解明

(4) 治療効果の検証:

液性因子の阻害剤を in vivo に投与することにより骨肉腫進展に与える影響、治療効果を評価した。解析はここまでで最も強い生理活性を示した Fgf2 に注目し、Fgfr の阻害剤 (PD173074) を用いて施行した。Fgf が微小環境形成にいかに関わるか免疫染色法で陰性対照と比較し検討した。

(5) ヒト骨肉腫における解析: ヒト骨肉腫細胞株、SAOS2、U2OS、SJS1 を用いてマウスの系で解析した液性因子がヒト骨肉腫細胞においても、分化・増殖において同じ生理活性を示すか検証した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞微小環境構成細胞の解明: 皮下に形成した骨肉腫から single cell suspension を作成し FACS にて解析したところ腫瘍は腫瘍細胞 (AX)、血液細胞 (macrophage)、Sca1 陽性繊維芽細胞を含んでいることが明らかとなった (図1)。

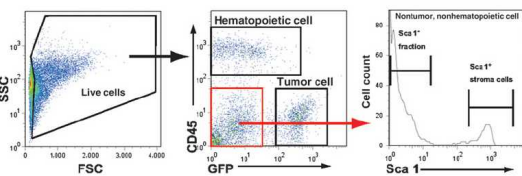


図1: FACS を用いた腫瘍構成細胞の解明

腫瘍細胞より分取した AX 細胞の gene expression profile から AX 細胞でほとんど遺伝子発現の見られない液性因子として Igf, Fgf, Lif, Hgf があげられた。定量 PCR にて評価したところ Fgf, Lif, Igf1 は非腫瘍分画で高く (図2) 腫瘍細胞で低いことが明らかとなり、これらの因子に関して更なる解析を行った。

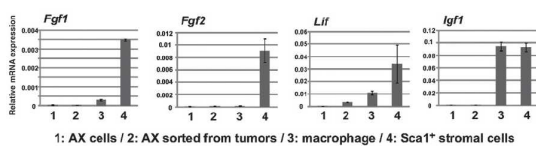


図2: 腫瘍構成細胞における液性因子の発現

これら全ての液性因子は骨肉腫細胞の増殖を促進し、骨分化を抑制した (図3)。

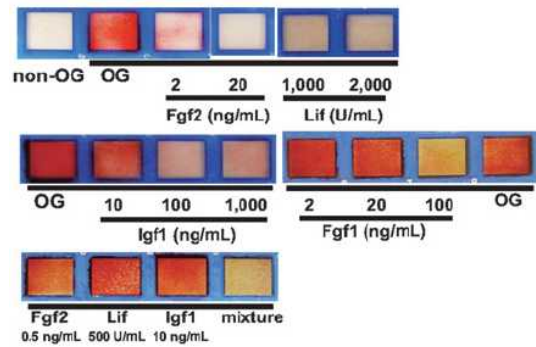
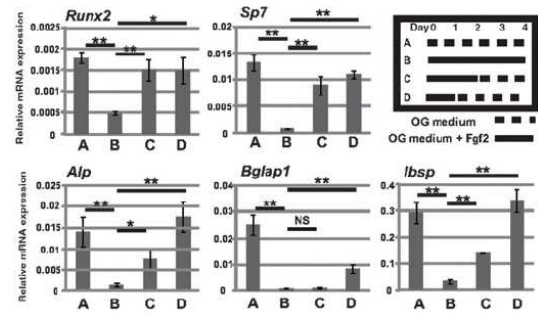


図3: 液性因子の骨分化に与える効果

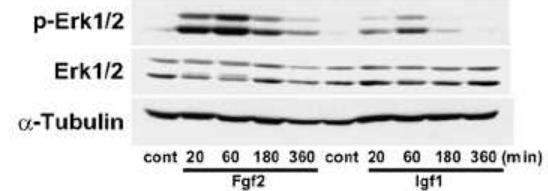
興味深いことに Fgf2 の骨分化抑制効果が最も強く、Igf1 の効果は弱かった。さらにこれらの因子の混合により抑制効果は増強した。骨分化抑制に関し Fgf2 を用いて機構をさらに解析したところ骨分化に関わる分子の遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。興味深いことにこの変化は可逆的であり、Fgf2 が除去されると再び骨分化マーカーの発現は回復した (図4)。

図4: Fgf2 による骨分化マーカー発現の抑制



次に、細胞内シグナル伝達経路を解析したところ Fgf, Lif, Igf1 はいずれも血清存在下において AX 細胞内で Erk1/2 を活性化したが、Fgf2 の活性が最も強かった (図5)。

図5: Fgf2 は Erk1/2 を強力に活性化する



一方、Akt を活性化させる効果は弱かった。Erk1/2 の活性化と骨分化抑制の関係を Mek 阻害剤 (PD98059, U0126) を用いて検証したところ Fgf2, Lif による骨分化抑制は解除され

た(図6)。骨分化マーカーの遺伝子発現レベルも回復し、これらの因子による骨分化阻害には Erk1/2 の活性化が関わっていることが明らかとなった。

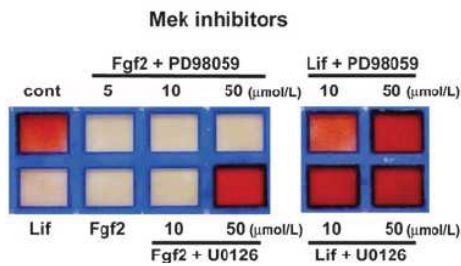


図6：骨分化抑制は Mek 阻害剤で解除される

Fgf2, Lif, Igf1 の骨肉腫進展に関わる役割をさらに解明するため遊走能、浸潤能を transwell を用いて解析したところ、いずれの因子も AX 細胞の遊走能を亢進させ、混合で作用は増強した。一方、浸潤能に対する効果はほとんど見られなかった。薬剤耐性に関する影響を検討したところ Fgf2 はアドリアマイシンの感受性を低下させることが明らかとなった(図7)。

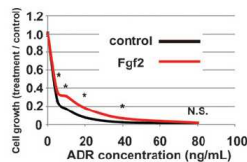


図7：Fgf2 による抗癌剤感受性の修飾

そこで、Fgfr 阻害剤 (PD173074) を用いて in vivo における治療効果を検証したところ、アドリアマイシンと Fgfr 阻害剤の混合投与は有意に腫瘍の進展を抑制した(図8)。

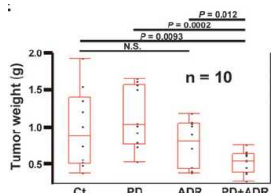


図8：Fgfr 阻害による抗癌剤感受性の亢進

このことから、Fgf をはじめ骨肉腫微小環境から産生される液性因子は骨肉腫進展を助け治療の標的となり得る可能性が示唆された。

最後に、ヒト骨肉腫においても FGF2 は同じ効果を示すかという問題に関し、骨肉腫細胞株 (U2OS, SAOS2, SJS1) を用いて検証した。FGF2 はこれらの細胞株全てにおいて細胞増殖をわずかに促進した。さらに ERK1/2 を活性化させた。in vitro で骨分化を示した株は SAOS2 のみであったが FGF2 添加により骨分化は抑制された。さらに、SAOS2, U2OS においては骨分化マーカーの遺伝子発現レベルも抑制した。以上から、マウス由来 AX 細胞でみられた現象はヒト骨肉腫においても見られうることを示唆された。

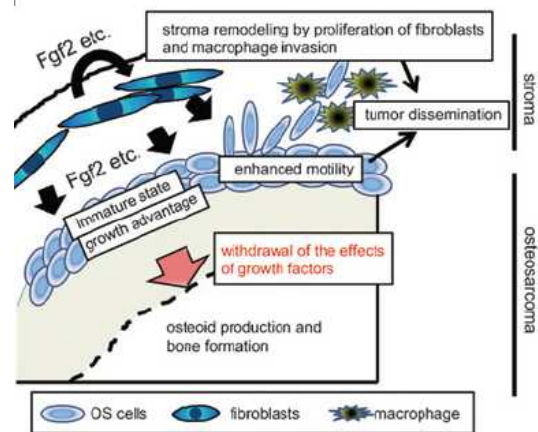


図9：Fgf2 など微小環境から産生される液性因子の骨肉腫病態像形成・進展における役割

以上の所見をモデル化したものが図9である。Fgf2 などの微小環境から産生される液性因子は骨肉腫細胞の未分化性を維持しその局在によって骨分化、非分化部を有する骨肉腫の病理像が形成される。一方、増殖や遊走能を亢進させ、腫瘍の進展に関わることに加え、薬剤耐性にも関与する。

また、Fgf2 をはじめとした液性因子は混合で作用が増強されることから、受容体や下流のシグナル伝達経路を複合的に抑制することは骨肉腫の新規治療法になりうると思われる。

申請時の目的には、腫瘍細胞が環境から受ける影響として液性因子を紹介するもの以外に、接着を介した細胞間の直接作用、細胞外マトリクスなど産生物質を紹介する効果の解明を上げていた。しかし、液性因子の解明において予想以上に多くの種類の因子から分化、増殖、遊走など多岐に渡る影響を腫瘍細胞は受けることが明らかとなった。このため、研究期間中には他の環境因子から受ける影響の解明には及ぶことができず、現在急ぎ解析を進めている。

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)

Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyamoto T, Toyama Y, Ijiri H, Mori H, Matsuzaki Y, Yaguchi T, Nishio H, Kawakami Y, Ikeda Y, Saya H. Fibroblast growth factor-2 is an important factor that maintains cellular immaturity and

contributes to aggressiveness of osteosarcoma. **Mol. Cancer Res.**;10,454-468,2012. (査読有り)

Kobayashi Y, Shimizu T, Naoe H, Ueki A, Ishizawa J, Chiyoda T, Onishi N, Sugihara E, Nagano O, Banno K, Kuninaka S, Aoki D, Saya H. Establishment of a choriocarcinoma model from immortalized normal extravillous trophoblast cells transduced with HRASV12. **Am. J. Pathol**;179,1471-82,2011. (査読有り)

Shimizu T, Ishikawa T, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Tsunoda T, Miya F, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Kawai A, Ichikawa H, Hasegawa T, Okada S, Ito T, Ikeda Y, Suda T, Saya H. c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. **Oncogene**;29,5687-99,2010. (査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

清水孝恒、Multifunctional roles of Fibroblast growth factor-2 (Fgf2) in the histopathology of murine osteosarcoma. 2011年10月4日、第70回日本癌学会学術集会、名古屋

清水孝恒、Mesenchymal differentiation potentials modify osteosarcoma stem cell activities. 2010年4月21日、American Association for cancer research 101st Annual meeting 2010, Washington, U.S.A.

〔図書〕(計1件)

清水孝恒、吉田剛、佐谷秀行．がん幹細胞研究の動向と治療標的としての将来性．最新医学(特集：がん幹細胞と支持細胞を標的とする薬剤の開発); 66, 387-392,2011.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.genereg.jp/>

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・特任助教
研究者番号：40407101