

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592192

研究課題名(和文)軟骨肉腫幹細胞に注目した、新規軟骨肉腫治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new treatment for chondrosarcoma by targeting sarcoma stem cells

研究代表者

松本 嘉寛 (Matsumoto, Yoshihiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10346794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨肉腫(Chondrosarcoma: CS)は、腫瘍性軟骨の形成を特徴とする悪性腫瘍である。化学療法・放射線治療に抵抗性で現在でも予後不良であるが、病態解明は進んでいない。本研究では、CSの悪性化機構を特にCS幹細胞に注目して解析し、CS予後改善のための新規治療法の開発を目指した。その結果、CS幹細胞はS100A4蛋白質やType I collagenを発現することが示唆された。また、肉腫幹細胞は薬剤耐性とも関与していると考えられるため、CSの薬剤耐性株を作製した結果、薬剤排出ポンプであるP糖蛋白が強発現していることを確認、CSの新規化学療法の分子標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Primary chondrosarcoma (CS) is the second most common primary malignant tumor of bone. Despite the continuous development and progress made in diagnostic techniques and auxiliary treatment, there is still no good treatment for CS at present. To develop new treatment for CS, we studied the oncogenesis of CS by focusing on the CS stem cells. We found that S100A4 and type I collagen were expressed in CS cell line that would have phenotype of CS stem cell by spheroid colony assay. We also established drug-resistance CS cell lines and the cell line expressed P-glycoprotein (Pgp), indicating that Pgp was able to be a candidate of molecular target of CS treatment.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨肉腫 肉腫幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)軟骨肉腫(Chondrosarcoma: CS)は、腫瘍性の軟骨を形成するが骨・類骨形成を示さないことを特徴とし、悪性骨腫瘍のなかで2番目の発生頻度を持つ。化学療法、放射線治療に極めて抵抗性であり外科的切除が唯一の治療法である。CSには通常型、脱分化型、間葉型などの組織型が存在する。CSの5年生存率は通常型高悪性度CSの場合約40%、間葉型、脱分化型の場合は20%以下と現在でも予後不良である。よって、CSの悪性化機構の解明による新規治療法の開発が、CS予後改善のために必要である。

(2)脱分化型CSは高分化CS成分の中に未分化の紡錘形細胞成分を含み、化学療法に強い耐性を示す。よって脱分化型CSの中には腫瘍幹細胞様の性質を持った細胞、すなわち多分化能や高い薬剤排出能を持つ細胞が多く含まれている可能性がある。そのため脱分化型CSの病態を詳細に解析することにより、CS幹細胞の同定を初めとするCSの悪性化機構の糸口がつかめると予想される。これまで腫瘍幹細胞の研究は主として血液系腫瘍もしくは癌腫を中心に行われ、腫瘍幹細胞を標的とした新規治療法の開発が進められている。一方、肉腫に関する解析は進んでおらず、CS幹細胞に関する報告はない。

(3)代表研究者は、骨肉腫(Osteosarcoma: OS)、Ewing肉腫(Ewing's family of tumora: EFT)を中心に悪性骨軟部腫瘍の病態解明を系統的に行っており、これまで、(1)肉腫細胞の転移・浸潤機構の解明(Matsumoto Y, Jpn J Cancer Res, 2001)(Kamura S, Br J Cancer, 2010)(2)OSの薬剤耐性化機構の解明(Oda Y, Oncol Rep, 2000)(3)EFTの悪性化メカニズムの解明(Matsumoto Y, Br J Cancer, 2001)(Nakatani F, J Biol Chem 2003)(Matsunobu T, Cancer Res 2006)などの結果を得ている。さらに、当研究施設においては長期間にわたるCS症例の蓄積があり、多数の臨床検体が入手可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的はCS幹細胞が同定、CS悪性化を解明することにより、全く新しいCS治療法の基盤が確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では軟骨肉腫悪性化機構のため、以下の方法を用いた。

(1)CS細胞株、CS臨床検体を用いたCS幹細胞の同定

脱分化型CS細胞株に加え、通常型CSより樹立された複数の細胞株を用いて、幹細胞様細胞の濃縮、その幹細胞性を確認し、c-kitを含むCS幹細胞マーカーの同定を行う。CS細胞株の解析により得られたCS幹細胞マーカーのCS臨床検体での発現を検討する。

(2)CS幹細胞における幹細胞性維持機構の解明

CS幹細胞と精製前のCS細胞間での遺伝子、蛋白質発現の差異を網羅的に検討、幹細胞性維持に必須な分子もしくは情報伝達経路を同定する。軟骨肉腫細胞株を用いた解析として本研究では、脱分化型軟骨肉腫(脱分化型CS)細胞株 NDCS-1(新潟大学、生越先生よりご供与)を含むCS細胞株を用いて研究を遂行した。

(A)Spheroid colony assay:非接着性のプレートで培養し、球状のコロニーを形成させる方法であり、神経幹細胞の純化、培養法として開発された。継代を繰り返すことで、幹細胞様細胞が濃縮されると予想される(図1)

(B)Flowcytometryによる表面抗原マーカーの解析およびSide population assay: Flowcytometryを用いて、癌腫や骨肉腫幹細胞との関連が報告されているCD44, CD133, CD117などの発現を検討する。さらに、濃縮、分離した細胞の薬剤排出能をDNA蛍光色素を用いたSide population assayで解析する。

(C)幹細胞性に関与する遺伝子(Stemness genes)の発現解析:Oct3/4, Nanog, Sox-2など、いわゆるStemness genesの濃縮細胞における発現を、PCR法などで検討する(図2)

(D)Differentiation assay:濃縮細胞の、骨、軟骨、脂肪細胞などへの分化能を検討する

(3).CS細胞における薬剤耐性機構の解明

腫瘍幹細胞はしばしば化学療法抵抗性を示す事が報告されている。そのため、まず軟骨肉腫の薬剤耐性株(耐性株)を作製する。その後対照細胞と耐性株との間の遺伝子発現の変化をDNA microarrayにて検討することにより、網羅性が高く、大量かつ高精度の結果が得られると予想される。候補遺伝子を同定後は、それらの遺伝子の詳細な機能を解析す

る。

4 . 研究成果

(1) Spheroid colony assay は非接着性のプレートで培養し、球状のコロニーを形成させる方法であり、神経幹細胞の純化、培養法として開発された。NDCS-1 をこの Spheroid colony assay を用いて培養した結果、濃縮された細胞では幹細胞性に関与する遺伝子 (Stemness genes) である Oct3/4 や c-kit が高発現していることを、PCR 法にて確認した。

(2) 上記(1)に引き続き、通常培養細胞群と spheroid assay を用いて網羅的遺伝子解析を行った。解析には、研究計画にて予定していた DNA microarray 法を用いた。その結果、膜表面蛋白質である S100A4 が、spheroid 形成に伴い発現することを見だし、Real-time PCR 法にて確認した。さらに、軟骨肉腫臨床サンプルを用いた、免疫染色にて、脱分化型 CS で S100A4 が発現していることを確認した。これらの結果は、軟骨肉腫細胞の幹細胞性の維持に S100A4 が関与していることを強く示唆している。その他の結果として、spheroid 形成により、軟骨分化に伴い発現する Type II collagen の発現が減少し、Type I collagen の発現が増加することを見いだしており、spheroid 形成により、軟骨肉腫細胞株が脱分化することが確認された。

(3) 肉腫幹細胞の他の特徴として、化学療法への抵抗性がある。よって、軟骨肉腫における化学療法抵抗性を検討するために、軟骨肉腫細胞株に抗癌剤 (Adriamycin: ADR) を負荷することで薬剤耐性株を作製した。その結果、薬剤耐性化に伴い、耐性株では代表的な薬剤排出ポンプである P 糖蛋白が強発現することを確認した。さらに、プロテアソーム阻害剤によりその耐性化が克服されることも発見しており、ADR を含み既存の抗癌剤とプロテアソーム阻害剤の併用により軟骨肉腫の薬剤耐性が克服される可能性が示唆された。

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 12 件; すべて査読あり)

1. Li Y, Li X, Fan G, Fukushima J, Matsumoto Y, Iwamoto Y, Zhu Y.

Impairment of p53 acetylation by EWS-Fli1 chimeric protein in Ewing family tumors. *Cancer Lett.* 320: 14-22, 2012

2. Kubota K, Saiwai H, Kumamaru H, Kobayakawa K, Maeda T, Matsumoto Y, Harimaya K, Iwamoto Y, Okada S. Neurological Recovery is Impaired by Concurrent, but not by Asymptomatic Pre-existing Spinal Cord Compression after Traumatic Spinal Cord Injury. *Spine* 37: 1448-1455, 2012

3. Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, Takahashi Y, Ishii T, Iida K, Matsumoto Y, Hakozaki M, Aoki M, Iwasaki H, Dobashi Y, Nishiyama K, Iwamoto Y, Oda Y. Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res.* 19: 450-461, 2013

4. Yokota K, Sakamoto A, Matsumoto Y, Matsuda S, Harimaya K, Oda Y, Iwamoto Y. Clinical outcome for patients with dedifferentiated chondrosarcoma: a report of 9 cases at a single institute. *J Orthop Surg Res.* 2012 Dec 10;7(1):38

5. Matsumoto Y, Takahashi Y, Harimaya K, Nakagawa T, Kawaguchi K, Okada S, Hayashida M, Doi T, Sakamoto A, Matsunobu T, Oda Y, Iwamoto Y. Dedifferentiated chondrosarcoma of the cervical spine: a case report. *World J Surg Oncol.* 2013;11(1):32

6. Fujiwara-Okada Y, Matsumoto Y, Fukushima J, Setsu N, Matsuura S, Kamura S, Fujiwara T, Iida K, Hatano M, Nabeshima A, Yamada H, Ono M, Oda Y, Iwamoto Y. Y-box binding protein-1 regulates cell proliferation and is associated with

clinical outcomes of osteosarcoma. Br J Cancer. 2013 Mar 5;108(4):836-47.

7. Iida K, Fukushi J, Matsumoto Y, Oda Y, Takahashi Y, Fujiwara T, Fujiwara-Okada Y, Hatano M, Nabashima A, Kamura S, Iwamoto Y. miR-125b develops chemoresistance in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. Cancer Cell Int. 2013 Mar 4;13(1):21.

8. Kubota K, Doi T, Murata M, Kobayakawa K, Matsumoto Y, Harimaya K, Shiba K, Hashizume M, Iwamoto Y, Okada S. Disturbance of Rib Cage Development Causes Progressive Thoracic Scoliosis: The Creation of a Nonsurgical Structural Scoliosis Model in Mice. J Bone Joint Surg Am. 2013 Sep 18;95(18):e1301-7

9. Matsumoto Y, Harimaya K, Doi T, Okada S, Hayashida M, Iwamoto Y. Minimum five-year follow-up of selective anterior thoracolumbar or lumbar fusion for adolescent idiopathic scoliosis: an analysis of radiographic parameters relevant to the uppermost instrumented vertebra and postoperative spinal balance. J Spine Res. 4: 933-940, 2013

10. Matsumoto Y, Endo M, Harimaya K, Doi T, Hayashida M, Iwamoto Y. Malignant peripheral nerve sheath tumors presenting as spinal dumbbell tumors: clinical outcomes and characteristic imaging features. Eur Spine J, 2014

11. Nabeshima A, Matsumoto Y, Fukushi J, Iura K, Matsunobu T, Endo M, Fujiwara T, Iida K, Fujiwara Y, Hatano M, Yokoyama N, Fukushima S, Oda Y, Iwamoto Y. Tumour-associated macrophages correlate with poor prognosis in myxoid liposarcoma and promote cell motility and invasion via

the HB-EGF-EGFR-PI3K/Akt pathways. Br J Cancer. 2015 in press

12. Matsumoto Y, Scoliosis in patients with multiple hereditary exostoses. Eur Spine J 2015 in press

〔学会発表〕(計4件)

1. 第50回日本癌治療学会学術集会、(2012.10.25-27 横浜)

骨近傍に発生した高悪性度軟部肉腫の臨床的特徴および治療成績

松本 嘉寛、松田 秀一、播広谷 勝三、坂本 昭夫、岩本 幸英、遠藤 誠、小田 義直

2. 第86回日本整形外科学術集会、(2013.5.23-26 広島)

Ewing 肉腫における Cadherin-11 の発現と臨床成績の相関

松本嘉寛、畑野 美穂子、福士 純一、飯田 圭一郎、藤原 悠子、鍋島 央、横山 信彦、小田 義直、岩本幸英

3. 第87回日本整形外科学術集会、(2014.5.22-25 神戸)

砂時計腫形態を呈した悪性神経鞘腫腫瘍の画像的特徴

松本 嘉寛、遠藤 誠、播広谷 勝三、林田 光正、岡田 誠司、松延 知哉、小田 義直、岩本 幸英

4. 第44回 日本脊椎脊椎病学会学術集会、(2015.4.16-18 福岡)

画像所見による脊髄砂時計腫の良悪性判定スコアリング法の開発

松本 嘉寛、播広谷 勝三、林田 光正、岡田 誠司、岩本 幸英

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織
(1)研究代表者

松本 嘉寛 (Matsumoto Yoshihiro)

研究者番号：10346794

(2)研究分担者

松本 和 (Matsumoto Kazu)

研究者番号：40422711

(3)連携研究者

なし