

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791629

研究課題名(和文) 骨肉腫の新たな病態解明を目指したがん幹細胞の同定とその特性の解析

研究課題名(英文) Identifying challenges to discover cancer stem-like cells in osteosarcoma

研究代表者

武内 章彦 (Takeuchi, Akihiko)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：70512218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫の培養細胞に、後期糖化産物受容体(Receptor for advanced glycation end-products: RAGE)を強制発現させると幹細胞マーカーであるCD133、CD24の発現が亢進し、腫瘍塊形成能が高く、また抗がん剤に対する薬剤耐性能も高くなることが示された。手術切除標本におけるCD133の発現は、有意な予後不良因子であった。さらに網羅的遺伝子解析により、RAGE遺伝子導入により細胞周期、細胞分裂に関わる分子が発現誘導されることが判明した。今回の研究成果から、RAGEが骨肉腫においてがん幹細胞マーカーの発現に関与し、がん幹細胞の性質を生み出す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Induced expression of RAGE (receptor for advanced glycation end-products) resulted in the co-expression of CD133 and CD24, stem-cell markers, in human osteosarcoma cell lines. Moreover, the RAGE-overexpressing cells showed higher spheroid-forming ability and a resistance to treatment of cisplatin, an anti-cancer drug, in vitro. Upregulated gene expression of cell-cycle and cell-division drivers was observed in microarray analyses. We also found that the expression of CD133 was significantly correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma using immunohistochemical analyses. Our results suggest that the RAGE could elicit the expression of cancer stem cell markers and may promote the cancer stem-like cell characteristics in osteosarcoma.

研究分野：腫瘍生物学

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：骨・軟部腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに肉腫の転移にかかわる分子として、後期糖化産物受容体 (Receptor for advanced glycation end-products: RAGE) に注目して研究を行ってきた。軟骨系腫瘍 (内軟骨腫・軟骨肉腫) における RAGE、HMGB1 及び、esRAGE (RAGE のスプライズバリエーション) の発現が軟骨肉腫の組織学的悪性度、臨床経過と有意に関連することを見出し (Takeuchi A., et al. Cancer 2007) さらに RAGE 遺伝子を導入し、RAGE を強制発現させた肉腫細胞 (ヒト線維肉腫細胞株: HT1080) の表面マーカーを解析すると、CD133、CD24、CD44、CXCR4 などの幹細胞マーカーの発現が著明に亢進していることを新たに見出した。すなわち、RAGE により、腫瘍細胞の悪性度が増し、さらに幹細胞マーカーの発現が亢進するということが初めて見出された。さらに、骨肉腫生検標本における蛍光免疫染色において、RAGE と CD24、CD133 陽性細胞の染色像が一致することを予備実験で見出した。以上より、がんの転移に関わるとされる RAGE が骨肉腫にも発現し、さらに幹細胞マーカーの発現と一致していることから、RAGE が幹細胞マーカーの発現に関与し、がん幹細胞の性質を生み出すというこれまでにない全く新しい仮説を提唱するに至った。

2. 研究の目的

骨肉腫細胞株の RAGE・幹細胞マーカーの発現を解析し、RAGE 遺伝子を導入することで幹細胞マーカーの発現が誘導され、さらにがん幹細胞様の性質を示すかを解析することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨肉腫細胞株 (HOS, MG63, SaOS2) における幹細胞マーカー (CD133, CD24, CD44) RAGE 発現のフローサイトメトリーによる解析

(2) ヒト骨肉腫細胞株 (HOS, MG63, SaOS2) への RAGE 遺伝子の導入

(3) 遺伝子導入後の細胞における幹細胞マーカー (CD133, CD24, CD44) RAGE 発現のフローサイトメトリーによる解析

(4) RAGE 高発現細胞と陰性細胞のセルソーティング

(5) RAGE 高発現細胞と陰性細胞の CD133, CD24, RAGE の蛍光免疫染色。

(6) RAGE 高発現細胞と陰性細胞の Sphere アッセイ

(7) RAGE 高発現細胞と陰性細胞の脂肪分化誘導アッセイ

(8) RAGE 高発現細胞と陰性細胞のシスプラチンを使った薬剤耐性試験

(9) 骨肉腫手術標本の幹細胞マーカー、RAGE 発現の解析

(10) RAGE 安定高発現細胞の樹立

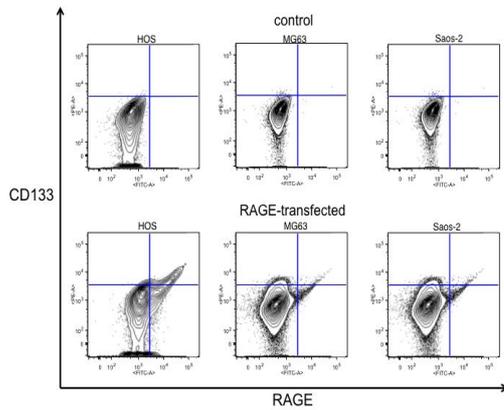
(11) RAGE 発現細胞を標的とした治療法確立の試み: RAGE 安定発現株である線維肉腫細胞 (RAGE 遺伝子導入 HT1080) に対して、低分子ヘパリンを添加し、抗腫瘍効果を示すかと RAGE の下流シグナル (Cdc42, Rac1, NF B) の抑制効果の解析

(12) RAGE により誘導される遺伝子の網羅的解析

4. 研究成果

(1) ヒト骨肉腫細胞株 (HOS, MG63, SaOS2) における幹細胞マーカー (CD133, CD24) および RAGE の発現をフローサイトメトリーを用いて解析したが、陽性率は 0.1% 以下であった。

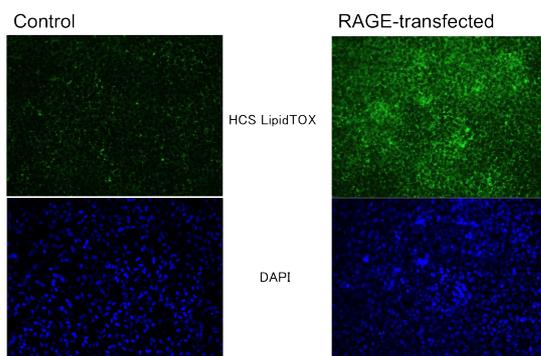
(2) RAGE 遺伝子の導入により幹細胞マーカー (CD133, CD24) および RAGE の陽性率は上昇した。



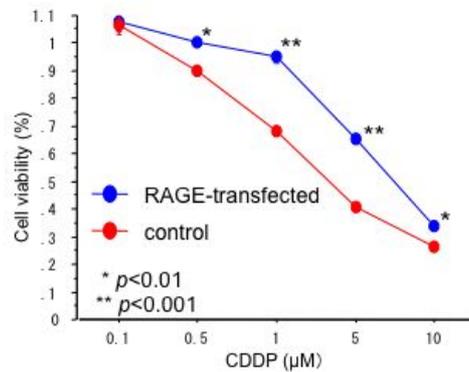
(3) RAGE 高発現細胞と陰性細胞をチャンバースライド上で培養し、CD133, CD24, RAGE の蛍光免疫染色を行った。RAGE 高発現細胞では、RAGE のシグナルに一致して CD133 と CD24 の発現が亢進していた。一方陰性細胞では、CD133, CD24, RAGE いずれの発現もほとんどみとめられなかった。

(4) RAGE 高発現細胞と陰性細胞を Ultra Low Attachment Culture Dish で培養すると、陽性細胞では HOS, MG63, SaOS2 いずれも Sphere を形成したが、陰性細胞では Sphere の形成を認めなかった。

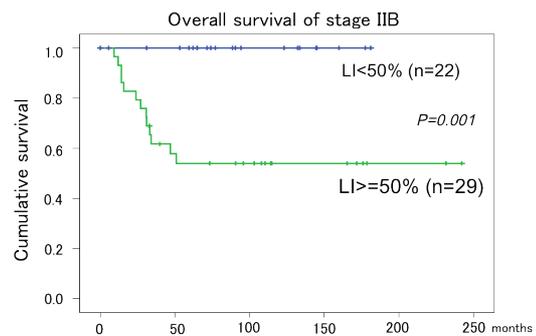
(5) RAGE 高発現細胞と陰性細胞を脂肪分化誘導培地で培養すると、陽性細胞は HCS LipidTOX 陽性となり脂肪産生が確認されたが、陰性細胞の陽性率は低かった。



(6) RAGE 高発現細胞と陰性細胞に各濃度 (0.1-10 μM) のシスプラチンを添加し WST assay を施行すると、RAGE 陽性細胞は、有意に陰性細胞よりも薬剤耐性が高かった。



(7) 骨肉腫手術標本の幹細胞マーカー、RAGE (後期糖化産物受容体) 発現の解析: 骨肉腫の手術標本を、抗 RAGE 抗体、抗 CD133 抗体で蛍光免疫染色を行った。その結果、RAGE と CD133 のシグナルは一致し、転移のある症例は転移のない症例よりも有意に RAGE/CD133 の高発現群が多く、また、初発よりも再発の病巣は、高発現群が有意に高かった。さらに、転移のない症例 (stage IIB) では、RAGE/CD133 の低発現群は高発現群よりも有意に生存率が高く、RAGE/CD133 の発現が予後予測因子として有用である可能性が示唆された。



(8) RAGE 高発現細胞の樹立: RAGE 遺伝子導入細胞から、RAGE 高発現細胞を樹立するために、limited dilution 法により高発現株を樹立。

(9) フローサイトメトリーにて CD133 と RAGE 発現細胞を標的とした治療法確立の可能性: RAGE 安定発現株である線維肉腫細胞 (RAGE 遺伝子導入 HT1080) に対して、低分子ヘパリンを添加することで、抗腫瘍効果を示しさらに RAGE の下流シグナル (Cdc42, Rac1, NF-κB) が抑制されることを見出した。

(10) limited dilution 法により樹立したヒト骨肉種細胞株(HOS)を用いて、RAGE 遺伝子導入により誘導あるいは抑制される遺伝子の解析のためにコントロール細胞とともに Affimetrix genechip pathway 解析を施行した。階層的クラスタリングの結果は RAGE 遺伝子導入群とコントロール群がきれいに2つのクラスタに分かれ、Rank products 法にて発現変動遺伝子の抽出を行った。その結果、発現が誘導される遺伝子と抑制される遺伝子が約 1500 個ピックアップされた (FDR : false discovery rate <0.05)。特に発現の上昇しているものは細胞周期、細胞分裂に関わる分子が多いことが判明した。

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 11 件)

1. Miwa S, Takeuchi A, Ikeda H, Shirai T, Yamamoto N, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Igarashi K, Tsuchiya H. Prognostic value of histological response to chemotherapy in osteosarcoma patients receiving tumor-bearing frozen autograft. PLoS One. 査読有 8: e71362, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0071362
2. Miwa S, Takeuchi A, Shirai T, Taki J, Yamamoto N, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Igarashi K, Ooi A, Tsuchiya H. Prognostic value of radiological response to chemotherapy in patients with osteosarcoma. PLoS One. 査読有 8:e70015, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0070015
3. Takeuchi A, Yamamoto N, Nishida H, Kimura H, Ikeda H, Tsuchiya H. Complete necrosis of a giant cell tumor with high expression of PPAR : a case report. Anticancer Res. 査読有 33:2169-74, 2013. <http://ar.iiarjournals.org/content/33/5/2169>
4. Takeuchi A, Yamamoto Y, Munesue S, Harashima A, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, Tsuchiya H. Low molecular weight heparin suppresses receptor for advanced glycation end products-mediated expression of malignant phenotype in human fibrosarcoma cells. Cancer Sci. 査読有 104:740-9, 2013. doi: 10.1111/cas.12133
5. Suganuma S, Tada K, Hayashi K, Takeuchi A, Sugimoto N, Ikeda K, Tsuchiya H. Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration. J Orthop Sci. 査読有 18:145-51, 2013. doi: 10.1007/s00776-012-0306-9.
6. Watanabe K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Takeuchi A, Matsubara H, Nomura I. Over 10-year follow-up of functional outcome in patients with bone tumors reconstructed using distraction osteogenesis. J Orthop Sci. 査読有 18:101-9, 2013. doi: 10.1007/s00776-012-0327-4.
7. Kato S, Murakami H, Takeuchi A, Demura S, Yoshioka K, Kawahara N, Tomita K, Tsuchiya H. Fifteen-year survivor of renal cell carcinoma after metastasectomies for multiple bone metastases. Orthopedics. 査読有 36:e1454-7, 2013. doi: 10.3928/01477447-20131021-32.
8. Yamamoto N, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Takeuchi A, Igarashi K, Inatani H, Shimozaki S, Kitamura S,

Tsuchiya H. Treatment strategies for well-differentiated liposarcomas and therapeutic outcomes. *Anticancer Res.* 査読有 32:1821-5, 2012.

<http://ar.iiajournals.org/content/32/5/1821>.

9. Miwa S, Taki J, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Takeuchi A, Igarashi K, Ooi A, Tsuchiya H. A novel combined radiological method for evaluation of the response to chemotherapy for primary bone sarcoma. *J Surg Oncol.* 査読有 106:273-9, 2012. doi: 10.1002/jso.23074.
10. Miwa S, Sugimoto N, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Kimura H, Takeuchi A, Igarashi K, Yachie A, Tsuchiya H. Caffeine induces apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting AKT/mTOR/S6K, NF- B and MAPK pathways. *Anticancer Res.* 査読有 32:3643-9, 2012. <http://ar.iiajournals.org/content/32/9/3643>.
11. Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H. TNF- and tumor lysate promote the maturation of dendritic cells for immunotherapy for advanced malignant bone and soft tissue tumors. *PLoS One.* 査読有 7:e52926, 2012. doi: 10.1371/annotation/7c0f14e6-cfba-4f5f-b93d-1a149eaec96.

〔学会発表〕(計7件)

1. 武内章彦, 山本憲男, 白井寿治, 林 克洋, 西田英司, 丹澤義一, 木村浩明, 三輪真嗣, 土屋弘行 骨肉腫に対するカフ

ェイン併用化学療法と縮小手術 第 86 回日本整形外科学会学術集会 2013.5.23-26 リーガロイヤルホテル広島

2. 武内章彦, 山本憲男, 西田英司, 木村浩明, 五十嵐健太郎, 下崎真吾, 加藤貴士, 田中一広, 山本靖彦, 土屋弘行 骨巨細胞腫に対するペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体ガンマ活性化による分化誘導及び抗腫瘍効果の解析 第 46 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2013.7.11-12 東京ドームホテル
3. 武内章彦, 山本憲男, 西田英司, 木村浩明, 五十嵐健太郎, 下崎真吾, 加藤貴士, 土屋弘行 粘液型脂肪肉腫におけるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体ガンマの発現と臨床経過との相関 第 46 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2013.7.11-12 東京ドームホテル
4. 武内章彦, 山本靖彦, 棟居聖一, 原島 愛, 山本憲男, 土屋弘行 低分子ヘパリンは線維肉腫細胞における後期糖化産物受容体(RAGE)を介する悪性度を抑制する 第 72 回日本癌学会学術集会 2013.10.3-5 パシフィコ横浜
5. 武内章彦, 山本憲男, 西田英司, 木村浩明, 下崎真吾, 加藤貴士, 山本靖彦, 土屋弘行 Zaltoprofen は骨巨細胞腫に対して PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) の活性化により抗腫瘍効果および脂肪分化誘導を示す 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013.10.26-27 幕張メッセ
6. 武内章彦, 山本憲男, 白井寿治, 西田英司, 林 克洋, 丹澤義一, 木村浩明, 五十嵐健太郎, 稲谷弘幸, 下崎真吾, 加藤貴士, 青木 裕, 土屋弘行 骨肉腫に対するカフェイン併用化学療法と縮小手術の中長期成績 第 51 回日本癌治療学会

学術集会 2013.10.24-26 国立京都国際会館

7. 武内章彦, 山本靖彦, 山本 博, 土屋弘行 骨肉腫におけるがん幹細胞研究 第45回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2012.7.14-15 東京国際フォーラム

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

1. 名称: 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療のための薬剤、動脈塞栓術用局所注入材、および人工骨
発明者: 武内章彦、土屋弘行
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2013-199076
出願年月日: 2013年09月25日
国内外の別: 国内
2. 名称: 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍の予防または治療剤
発明者: 武内章彦、土屋弘行
権利者: 金沢大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2013/0587706
出願年月日: 2013年03月18日
国内外の別: 国外
3. 名称: 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍の予防または治療剤
発明者: 武内章彦、土屋弘行
権利者: 金沢大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-235784
出願年月日: 2012年10月25日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武内 章彦 (TAKEUCHI Akihiko)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号: 70512218

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山本 靖彦 (YAMAMOTO Yasuhiko)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 20313637

棟居 聖一 (MUNESUE Seiichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 10399040

原島 愛 (HARASHIMA Ai)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディシン研究センター・助教

研究者番号: 50705522