

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501320

研究課題名(和文) インスリン様成長因子による骨肉腫治療誘導型休眠状態の分子機構解明と克服

研究課題名(英文) Investigation and conquest of the therapeutic resistant dormancy in osteosarcoma mediated by insulin-like growth factor (IGF) signaling

研究代表者

清水 孝恒 (SHIMIZU, TAKATSUNE)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40407101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫は予後不良の骨原発悪性腫瘍であり治療抵抗性の克服が急務である。新規に樹立した骨肉腫マウスモデルに化学療法を行ったところ、腫瘍内でIGF2が有意に増加した。IGF2は血清非存在下で骨肉腫細胞の生存を支持し、ストレスに対して耐性の休眠状態へ導入する効果を示した。一方、休眠状態にある細胞はグルタミン要求性を示し、細胞内ではautophagyが亢進していた。それらの阻害を化学療法に組み合わせたところ、化学療法単独と比較してin vivoで抗腫瘍効果が増強された。ヒト骨肉腫においても治療後にIGFは上昇することが示唆され、IGFシグナルの阻害は骨肉腫の治療感受性を改善する可能性が示唆される。

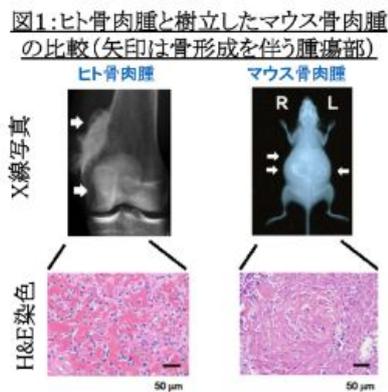
研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma (OS) is a malignant tumor for which new approaches to overcome therapy resistance are urgently required. On the basis of the identification of IGF2 as a soluble factor whose expression is elevated in tumors after chemotherapy, we have examined the role of this factor. Continuous exposure of OS cells to IGF2 promoted cell survival in a state of dormancy that conferred marked resistance to chemotherapeutic drugs. Dormancy mediated by IGF2 was associated with down-regulation of IGF signaling pathway. Screening of various agents revealed that such dormancy was dependent on an enhanced autophagy and the presence of extracellular glutamine. Inhibition of autophagy or depletion of glutamine increased the efficacy of chemotherapy in mice bearing OS tumors. Our results suggest that activation of IGF signaling in regions of a tumor that become separated from the vasculature allows the survival of stressed tumor cells that are subsequently responsible for minimal residual disease.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨肉腫 癌微小環境 治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

難治性間葉系悪性腫瘍であるヒト骨肉腫は若年者に多く、診断時より肺微小転移が存在し、既存の抗癌剤に抵抗を示す治療不応例は予後不良である。悪性腫瘍全体における発症頻度が少ないことから他の癌に比較して研究が進んでいない。未だに約3割の罹患者は長期生存が得られず、治療抵抗性分画の同定、克服が急務である (*J Clin Oncol* 20:776-790,2002)。私たちはこれまでに、マウス骨髄ストローマ細胞から *Ink4a/Arf*-/- 及び *c-MYC* 過剰発現の条件により骨肉腫マウスモデルを樹立した (*Oncogene* 29:5687-5699,2010)。この細胞は C57BL/6 syngeneic mouse に移植することにより致死的な骨肉腫を形成する (図1)。



骨肉腫 (AXT) 細胞が形成する腫瘍はレントゲンで描出可能な骨形成を伴い、さらに約3週間の短期で肺をはじめとした臓器への転移能を有し、病理・病態像はヒト骨肉腫に極めて酷似したマウスモデルである。骨肉腫克服への一環として、骨肉腫細胞の治療抵抗性分画を明らかにするため担癌マウスに化学療法を行い癌微小環境の変化を解析したところ、化学療法後の腫瘍では液性因子であるインスリン様成長因子 (Igf2) の遺伝子発現が有意に上昇することが見出された。この因子の効果を *in vitro* で解析した結果、血清非存在下で骨肉腫細胞の生存を支持し増殖を停止させる効果を有することが明らかとなった。樹立した骨肉腫細胞は、早い細胞増殖を示す一方で血清依存性が強い。以上から Igf2 存在下では生存と増殖抑制シグナルの dynamic な cross talk の存在が想定された。私たちは、これら予備実験で観察された現象を Igf2 が増殖の速い癌細胞を休眠状態 (dormancy) (*Nat Rev Cancer* 10:871-877,2010) に入れる作用があると解釈した。さらに、最も重要なことはこの条件下で骨肉腫細胞は高い抗癌剤耐性を示す点である。即ち、治療後になお残存し再発に関わる治療抵抗性分画生存の機構に関して、Igf2 は治療誘導型の薬剤耐性化機構の中心分子となりうる可能性も示唆された。以上の観点から、骨肉腫マウスモデルで観察された休眠状態の分子機構解明及び克服が、骨肉腫根治のみならず、難治性悪性腫瘍に対する新規治

療法の開発に大きく貢献すると考え研究に着手した。

2. 研究の目的

癌細胞の休眠 (tumor dormancy) の意味は広く、もともとは臨床で治療後に検出できなくなった腫瘍が長期間 (5年以上) を経て再発・転移巣を形成する個体レベルの概念である (*APMIS* 116:569-85,2008)。細胞レベルで見ると *in vivo* で腫瘍が増大するのに必要な腫瘍血管の発達開始 (angiogenic switch) 以前に腫瘍細胞が腫瘍量を増加させずに生存し続ける現象である (*APMIS* 116:648-59, 2008)。本研究は骨肉腫モデルで見出された知見をもとに、以下の事項の解明を通して分子機構の詳細を *in vitro*、*in vivo* で明らかにすることを目的としている。

(1) 休眠細胞の細胞周期の解明: 休眠状態を細胞周期の観点からみた場合、2つのメカニズムが考えられる。一つは細胞周期が完全に停止している状態 (quiescence)、もう一つは、増殖と停止が拮抗した動的平衡状態であり、見かけ上停止しているように見える。Igf2 による休眠がどちらのタイプであるか明らかにする。

(2) Igf2 がもたらす細胞内シグナル伝達経路の解明: 骨肉腫細胞に休眠状態をもたらす機構、即ち生存と増殖抑制シグナルの dynamic な cross talk を分子レベルで解明する。

(3) 休眠状態克服に向けた治療効果検証: ここまでの研究で明らかとなる鍵分子の阻害は dormancy がもたらす治療抵抗性の克服及び骨肉腫の新規治療法となり得るかを検証する。

(4) ヒト骨肉腫検体を用いた検証: マウスモデルで見られた休眠状態の現象がヒト骨肉腫でも普遍化できるかヒト細胞及び臨床検体を用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) 休眠状態下の細胞周期の解明
細胞周期の解明は、Flow cytometry (各条件で細胞を固定後、propidium iodide (PI) と Ki67 の二重染色を施行) により、免疫染色法 (各条件で細胞を固定後、Ki67 染色で細胞周期が回転している細胞を染色、リン酸化ヒストン H3 染色で分裂期細胞を染色) により解析を行った。さらに、増殖と細胞死を拮抗させる dynamic な平衡関係が存在するか、もしくは細胞周期を停止 (quiescent) させ真の休眠状態にあるかを調べるため、顕微鏡経時的連続撮影 (Time lapse) を施行して観察した。

(2) Igf2 がもたらす細胞内シグナル伝達経路の解明
細胞内シグナル伝達経路は各条件に調整した細胞を lysis buffer によりサンプル化した後、各種抗体を用いてウェスタンブロット法で解析を行った。また、電子顕微鏡撮影を用

いた細胞内器官の変化の観察を行った。関与が疑われる分子 (Atg7) に関しては、siRNA を用いたノックダウンを施行し細胞形質変化を観察した。さらに、in vitro の解析から関与が示唆された分子に関しては、マウス骨肉腫腫瘍サンプルの免疫染色にて、サンプル化した後、ウェスタンブロット法を用いて解析を行った。

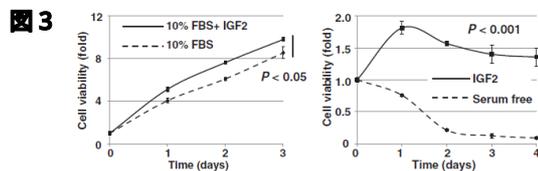
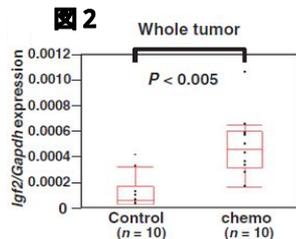
(3) 休眠状態の克服に向けた治療効果検証
各種薬剤に関する感受性は細胞増殖を生細胞数、ATP 産生を評価することにより解析した。薬剤による DNA 傷害は細胞を抗リン酸化ヒストン H2AX 抗体で染色後、flow cytometry にて定量解析した。薬剤感受性に影響を与える代謝酵素 Gstm の発現は各条件の細胞から RNA を回収し、RT-定量 PCR 法を用いて定量化して比較を行った。Gst の活性は、基質である CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) が Gst により GS-DNB に変換することによって生じる dinitrophenyl thioether の発色を定量化することにより施行した。抗癌剤の感受性に関する in vivo の評価は AXT 細胞 1×10^6 個を皮下移植したマウスに day13,16 に化学療法 (ADR 4mg/ml, MTX 20 mg/ml, IFO 50 mg/ml) を施行し chloroquine、Bafilomycin A、L-asparaginase を組み合わせて投与することにより検証した。薬剤の効果検証は腫瘍重量の測定と免疫化学染色による観察により行った。Glutamate、Glutamine、Asparagine の血清濃度は HPLC 法により測定した。

(4) ヒト骨肉腫検体を用いた検証
マウスの細胞に加えて、ヒト骨肉腫細胞株 SAOS2、U2OS を用いて、in vitro 解析を施行した。化学療法前後による IGF の発現の変化は、京都大学医学部整形外科、との共同研究により、同大学の骨肉腫臨床検体 (ペア検体) 7 例よりそれぞれ RNA を採取した。逆転写反応後、定量 PCR を施行し IGF1、IGF2 の発現を解析した。

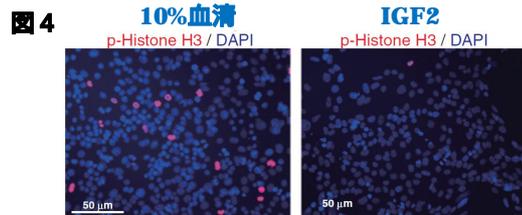
4. 研究成果

(1) 化学療法に伴う腫瘍内液性因子の変化
AXT 細胞を皮下移植して骨肉腫を形成させたマウスに化学療法を行い、液性因子の遺伝子発現変化を観察した。化学療法前は発現が低く、治療に伴い上昇する因子に注目した結果、Igf2 が有意に上昇することが定量的 PCR で確認された (図 2)。

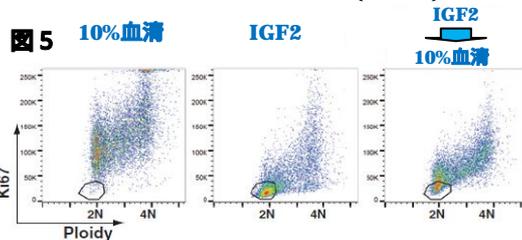
Igf2 の増殖における影響を調べたところ、血清存在下では極わずかに増殖を亢進させるのみであった (図 3 左)。一方、血清非存在下では AXT 細胞は生存できないのに対して、Igf2 存在下では細胞の生存を支持する効果があることが明らかとなった (図 3 右)。



興味深いことに、この条件下ではリン酸化ヒストン H3 染色により分裂期の細胞は認められず骨肉腫細胞は増殖を停止していることが示唆された (図 4)。



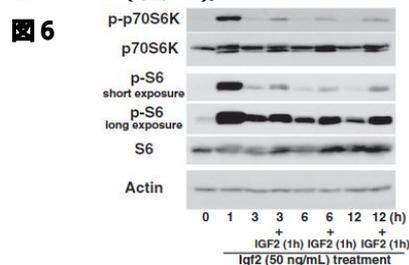
そこで、細胞周期を PI と Ki67 抗体を用いて評価した結果、血清非存在下で Igf2 を添加した場合、Ki67 は陰性となり、細胞は静止 (G0) 期に入ることが示唆された (図 5)。



この静止期は可逆性であり、細胞に血清を添加すると、再び細胞回転を開始した。この現象は顕微鏡経時的連続撮影 (Time lapse) を用いた解析でも認められた。静止期にある細胞はサイクリンの発現が低かった。上記の現象は Igf2 と共通のシグナル伝達経路を持つ Insulin でも再現され、また、AXT 細胞ほど明確ではないもののヒト骨肉腫細胞株 (SAOS2, U2OS) でもみられた。以上から、骨肉腫細胞は血清非存在下において Igf2 に暴露されると、静止期に入り、休眠状態 (dormancy) となることが示唆された。

(2) Igf2 暴露により下流のシグナル伝達経路は Igf2 に不応性になる

血清非存在下では Igf2 の存在により骨肉腫細胞は細胞死を回避し、休眠状態に入るが、その細胞内分子機構を明らかにするため、Igf シグナルに関わる分子をウェスタンブロット法で確認した。その結果、PI3K-AKT 経路の下流分子の p70S6K や S6 は Igf2 添加当初は強くリン酸化されるが、その後は不応答となり、Igf2 を新たに添加しても活性化されなくなることが明らかとなった (図 6)。

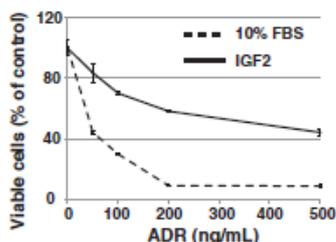


長期暴露に伴う下流シグナルの不応答はインスリンでも認められた。またヒト骨肉腫細胞でも同様の現象がみられた。興味深いことに不応答な状態の細胞に血清を添加したところ、p70S6K や S6 は再び活性化された。即ち、Igf2 長期暴露により下流のシグナル伝達経路は Igf2 に不応性となり、この状態は血清添加で解除されることが明らかとなった。この所見は細胞周期の可逆的停止と一致した所見であった。

(3) 休眠状態となった細胞は化学療法に抵抗性を示す

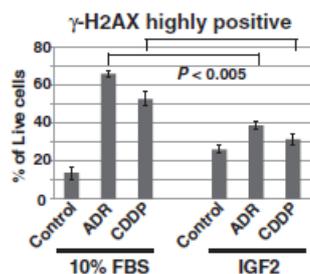
休眠状態に陥った癌細胞は特に細胞周期を標的とした各種抗癌剤に対して抵抗性を示すことがこれまで明らかにされている。そこで Igf2 により休眠状態を誘導した細胞における抗癌剤の感受性を評価した結果、骨肉腫に対し臨床で使用されるドキソルビシン、シスプラチン、メソトレキサートに高い耐性を示した(図7: ドキソルビシンの感受性を示す)。

図7



抗癌剤添加に伴う DNA 傷害を Flow cytometry で評価したところ休眠状態にある骨肉腫細胞は血清存在下で培養した条件と比較して低い DNA 傷害を示した(図8)。さらに、薬物の解毒酵素である、グルタチオン S 転移酵素 (Gst) の発現は休眠状態を導入した細胞で高く、その酵素活性も高かった。以上から、Igf2 により休眠状態となった骨肉腫細胞は化学療法に抵抗性を示すことが明らかとなった。

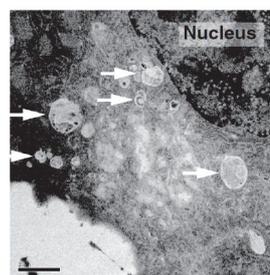
図8



(4) Igf2 添加による休眠状態では autophagy が亢進している

Igf2 添加により誘導される休眠状態では既存の化学療法に抵抗性を示すことが示唆された。そこで休眠状態の細胞が感受性を示す薬剤のスクリーニングを行った結果、autophagy を阻害する chloroquine、Bafilomycin A において、また、アスパラギン、グルタミンの代謝に関わる L-asparaginase において高い感受性が認められた。電子顕微鏡による観察では、休眠状態の細胞では autophagy の亢進を示唆する vacuole の多数の形成を認めた(図9 矢印)。

図9

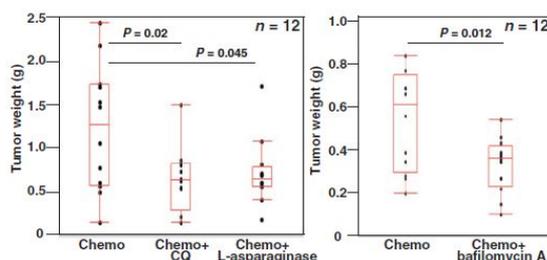


ウェスタンブロットにおいても休眠状態では LC3II の発現が血清存在下の細胞周期が回転している場合に比較して増加していた。そこで、autophagy の休眠状態における役割を明らかにするため、autophagy に重要な分子である Atg7 を siRNA によりノックダウンしたところ、autophagy は阻害されるとともに細胞の生存率も低下した。このことから autophagy の亢進は休眠状態に維持に必要である可能性が示唆された。一方、培養液からグルタミンを除去しても、休眠状態は維持できなかった。以上から、Igf2 添加による休眠状態の維持には、autophagy の亢進、細胞外グルタミンの存在が必要である可能性が示唆された。

(5) 薬剤による autophagy の阻害と血清グルタミン濃度の低下は化学療法の感受性を増強する

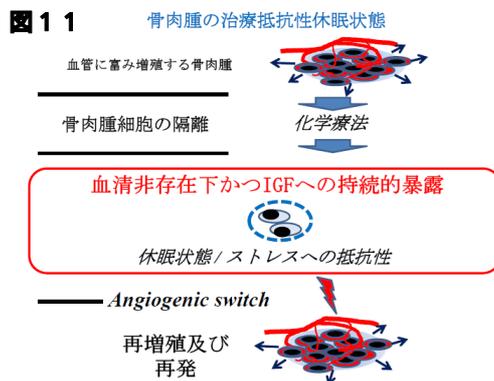
ここまでの in vitro の知見をもとにして、chloroquine、Bafilomycin A、L-asparaginase を化学療法に加えることによる抗腫瘍効果を in vivo で検討した。AXT 細胞を皮下移植して骨肉腫を形成した担瘤マウスを非投与群、化学療法 (ADR, MTX, IFO) 単独投与群、化学療法 + 上記薬投与群にわけ検討を行った結果、化学療法 + 上記薬投与群では化学療法単独投与に比較して有意に腫瘍の縮小を認めた(図10)。さらに、免疫染色の結果、chloroquine、Bafilomycin A 投与群では LC3 蓄積の亢進を認め、混合投与群では腫瘍内細胞死の亢進がみられた。L-asparaginase 投与群では、血清グルタミン、アスパラギンレベルの低下、グルタミン酸レベルの上昇がみられ、薬剤の in vivo における有効性が確認された。以上から、chloroquine、bafilomycin A、L-asparaginase は既存の化学療法と混合使用することにより、骨肉腫の治療感受性を上昇させることが示唆された。

図10



(6) IGFの上昇はヒト骨肉腫においても化学療法後に認められる

これまでの研究は、マウス骨肉腫細胞、ヒト骨肉腫細胞株を用いて行ったが、実際のヒト骨肉腫において IGF 発現が治療に関連して変動しているかについて検討を行った。京都大学医学部との共同研究により化学療法前後に採取した骨肉腫患者 7 例の検体を解析した。その結果、IGF1 の発現は全例で治療後に上昇を認め、IGF2 は 2 例において上昇を認めたと 5 例においては治療後に低下していた。上昇した 2 例に関しては、治療後の予後は不良であった。症例数が少なく確固たる結論付けはできないが、IGF はヒト骨肉腫において治療後に上昇し、その後の予後に関連する可能性も示唆された。



これまでの研究から、次のような治療抵抗性モデルを考えている。骨肉腫は腫瘍血管に富んだ悪性腫瘍であり、盛んに増殖する。化学療法を行うと腫瘍血管から途絶し、血清の恩恵を受けられない腫瘍細胞が出現する。その場が IGF に富んだ環境であった場合、腫瘍細胞は細胞死をまぬがれ休眠状態に陥り、同時にストレスへの耐性を獲得する。時間を経て再びその領域に腫瘍血管が入り込んでくると、腫瘍細胞は血清の恩恵を受け、休眠状態を脱し増殖を開始する(図 1 1)。以上から、IGF を標的とした治療は骨肉腫の治療抵抗性を克服する手段となる可能性が示唆される。また、なぜ治療後に腫瘍内で IGF が上昇するのか、上流の分子機構を解明することは今後の課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, et al. IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. *Cancer Research* 74:6531-41 (2014) (査読あり) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0914
2. Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, et al. Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nature Communications* 5:3368 (2014) (査読あり) DOI: 10.1038/ncomms4368

3. Mori T, Sato Y, Miyamoto K, Kobayashi T, Shimizu T, et al. TNF α promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. *Oncogene* 33:4236-41 (2014) (査読あり) DOI: 10.1038/onc.2013.545
4. Kobayashi Y, Masuda K, Banno K, Kobayashi N, Umene K, Nogami Y, Tsuji K, Ueki A, Nomura H, Sato K, Tominaga E, Shimizu T, Saya H, Aoki D. Glycan profiling of gestational choriocarcinoma using a lectin microarray. *Oncology Reports* 31,1121-1126 (2014) (査読あり) DOI: 10.3892/or.2014.2979
5. Ishikawa T, Shimizu T, et al. Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. *Cancer Science* 104,880-8 (2013) (査読あり) DOI: 10.1111/cas.12163
6. Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, et al. IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in Glioma stem cells. *Stem Cells* 4,627-640 (2013) (査読あり) DOI: 10.1002/stem.1328
7. Nishiyama-Fujita Y, Shimizu T, et al. The role of TC-PTP (PTPN2) in modulating sensitivity to imatinib and interferon- γ in CML cell line, KT-1 cells. *Leukemia Research* 37,1150-5 (2013) (査読あり) DOI: 10.1016/j.leukres.2013.05.008
8. Kobayashi Y, Banno K, Shimizu T, et al. Gene expression profile of a newly established choriocarcinoma cell line iC3-1, compared to existing choriocarcinoma cell lines and normal placenta. *Placenta* 34,110-8 (2013) (査読あり) DOI: 10.1016/j.placenta.2012.11.003
9. Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, et al. Fibroblast growth factor-2 is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma. *Molecular Cancer Research* 10,454-468 (2012) (査読あり) DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0347
10. Ueki A, Shimizu T, Masuda K, et al. Up-regulation of Imp3 confers in vivo tumorigenicity on murine osteosarcoma cells. *Plos One* 7, e50621 (2012) (査読あり) DOI: 10.1371/journal.pone.0050621
11. Chiyoda T, Sugiyama N, Shimizu T, Naoe H, Kobayashi Y, Ishizawa J, Arima Y, Tsuda H, Ito M, Kaibuchi K, Aoki D, Ishihama Y, Saya H, Kuninaka S. LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. *Journal of Cell Biology* 197,625-641 (2012) (査読あり) DOI: 10.1083/jcb.201110110
12. Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, et al. Ink4a and Arf are crucial factors in the

determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene* 31,2849-61 (2012) (査読あり)
DOI: 10.1038/onc.2011.462

〔学会発表〕(計9件)

1. 清水孝恒、武藤章弘、佐谷秀行, マウス骨肉腫幹細胞の同定と克服への挑戦. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日-27日, 横浜
2. 清水孝恒, インスリン様増殖因子シグナルは骨肉腫細胞に治療抵抗性休眠状態を誘導する. 第2回がん代謝研究会, 2014年7月10日-11日, 東京
3. 清水孝恒, 武藤章弘, 佐谷秀行, Characterization and conquest of mouse osteosarcoma stem cells. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸
4. 山口さやか, 清水孝恒(代表), ポルテゾミブは小胞体ストレスを介して骨肉腫細胞株の細胞死を誘導する. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3-5日, 横浜
5. 西川純一, 清水孝恒(代表), IVVスクエア: パーソナル医療に向けた細胞丸ごとインタラクトーム解析法. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3-5日, 横浜
6. 清水孝恒(代表), インスリンシグナルによる骨肉腫休眠状態は微小残存病変につながる. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3-5日, 横浜
7. 杉原英志, 清水孝恒(代表), マウスB-ALLモデルにおけるがん幹細胞様の細胞は静止期にあり、解糖系遺伝子発現、可塑性を示す. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3-5日, 横浜
8. 清水孝恒, 佐谷秀行, マウス骨肉腫幹細胞の樹立とその特徴. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2012年7月26-28日, 大阪
9. Takatsune Shimizu, Molecular mechanism of in vivo tumorigenesis. The 11th Korea-Japan-Germany Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2012年7月5-7日, Gyeongju, Korea

〔図書〕(計2件)

1. 清水孝恒(分担執筆) 羊土社. 実験医学増刊号がん微小環境と標的治療, p18-24, 2015
2. 清水孝恒(分担執筆) Life-Science Information Center; seriesモデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用がん, p127-135, 2012

〔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

1. 星薬科大学薬学部病態生理学教室
(<http://www.hoshi.ac.jp/home/kyoiku/kyoushitsuugaid/15kyoushitsu.byoutai.html>)
2. 慶應義塾大学医学部・先端医科学研究所・遺伝子制御研究部門
(<http://www.genereg.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 孝恒 (SHIMIZU, Takatsune)
星薬科大学・薬学部・病態生理学教室・准教授, 研究者番号: 40407101