

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590323

研究課題名（和文）骨軟部肉腫の転移と抗癌剤耐性に関わるアクアポリン分子種の同定と分子機構の解明

研究課題名（英文）Involvement and their roles of aquaporins in the metastasis and drug-resistance of bone and soft tissue sarcomas

研究代表者

上田 善道（UEDA YOSHIMICHI）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50271375

研究成果の概要（和文）：骨軟部肉腫の浸潤・転移に関する情報は乏しい。本研究では水分子に特異的な細胞膜チャンネルであるアクアポリンの新規機能に着目し、アクアポリン 1、5 が骨軟部肉腫に発現すること、発現が独立した予後因子であることに加え、ヒト培養骨・軟部肉腫細胞株を用いた遺伝子発現修飾により、アクアポリン 1 は偽細胞突起形成促進を介した細胞移動・浸潤能の亢進に、アクアポリン 5 は細胞増殖の亢進機能があることを、細胞培養ならびに動物実験レベルで検証した。

研究成果の概要（英文）：Little is known on the molecular mechanism of invasion and metastasis of bone and soft tissue sarcomas. The present research addressing to the involvement of the novel functions of aquaporins revealed the expression of aquaporin 1 and 5 and their prognostic significance in bone and soft tissue sarcomas. Furthermore, modification of aquaporin 1 and 5 gene expression in human bone and soft tissue sarcoma cell lines disclosed the functional roles of aquaporin 1 in the migration and invasion and aquaporin in cell proliferation *in vitro*, and involvement of aquaporin 1 in the invasion and metastasis *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：骨軟部腫瘍病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：アクアポリン、骨肉腫、軟部肉腫、浸潤・転移、細胞移動、細胞増殖、遺伝子発現修飾、自然肺転移実験動物モデル

1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫（骨軟部悪性腫瘍）は高い転移能を特徴とする。バリアー概念の浸透により腫瘍の局所制御法は格段に進歩した。

しかし、未だ多くの骨軟部肉腫患者は転移、特に肺転移のため悲惨な転帰をとる。また、いくつかの骨軟部肉腫では術前化学療法が有効で生命予後の顕著な改善が得られてい

るが、約 30~40%の症例は化学療法不応である。研究分担者の土屋らはカフェインに着目した化学療法感受性増強法を開発し良好な成績を得ているが、約 20%の症例では腫瘍細胞の抗癌剤耐性獲得が大きな障壁となっている。骨軟部肉腫の克服に向けて、肉腫細胞の浸潤・転移と抗癌剤耐性に関わる分子機構の解明は緊急の研究課題である。

アクアポリン aquaporin (AQP)は、あらゆる生命現象に必須な水分子に対する特異的チャネルとして 1992 年 Agre らにより発見された。現在までに 13 種の異なる分子種が哺乳類では同定され、(1) 水選択性の狭義のアクアポリン (AQP 0, 1, 2, 4, 5, 6)、(2) 水以外の非イオン性小分子も通すアクアグリセリポリン (AQP 3, 7, 9, 10)、(3) 細胞内小器官に存在するアクアポリン (AQP 8)、4) 他型との相同性が乏しいスーパーアクアポリン (AQP 11, 12)の 4 群に分類されている。近年、AQP には、本来の水チャネル機能のほかに、アポトーシス阻止、細胞周期の調節、移動能の亢進、血管新生など予期せぬ機能があることが発見され、細胞増殖や浸潤・転移などがんの生物学的特性に重要な役割を果たしている可能性が Verkman らにより提唱された。いくつかのヒト上皮性悪性腫瘍において研究が展開されているが、骨軟部腫瘍における研究は未だ行われていない。

申請者の専門分野の一つである「肺癌の浸潤・転移機構の解明」での研究から、(1) 肺癌における AQP の発現には分化に伴うものと悪性転化に伴う異常発現の 2 種類があること、(2) AQP 1, 5 の過剰発現が浸潤先端部での lamellipodia 形成と関係すること、(3) AQP 1, 5 の過剰発現が術後転移発生と生命予後に密接に関係していることを明らかにした。肺癌での研究結果を発展させ、骨肉腫における AQP1 の mRNA ならびに蛋白発現を複数の樹立骨肉腫細胞株とヒト生検・摘出病理組織を用い解析した。骨肉腫細胞株での AQP1 の高頻度の発現とヒト骨肉腫組織中、特に浸潤先端部における発現亢進と術後肺転移の関連性が示された。

ヒト AQP は 13 種類あり、これまでの上皮性悪性腫瘍における研究から複数の分子種ががん細胞の増殖、移動能、血管新生に関

与する可能性が示唆されている。また、AQP 8, 11 では初期エンドサイトーシスとの関係も報告され、金属系抗癌剤の解毒や排出など薬剤耐性機構に関わる可能性が推定される。このため、複数の AQP 分子種からの選別とその機能検証、分子機構の解明、それらのヒト骨軟部肉腫症例における意義の検討が重要な研究課題となった。

2. 研究の目的

骨軟部肉腫の転移阻止と抗癌剤耐性克服のための新規標的分子の特定を目標に、以下の 3 項目を研究目的とする。

(1) 骨軟部肉腫の転移と抗癌剤耐性に関わる AQP 分子種を選別する。

(2) 選別された AQP の *in vitro* での機能検証とその分子機構を明らかにする。

(3) ヒト骨軟部肉腫症例での AQP 発現の臨床病理学的意義を明らかにする。

各研究目的の具体的到達点

(1) に関して：

- ①正常骨軟部組織
- ②ヒト骨軟部肉腫細胞株
- ③代表的ヒト骨軟部肉腫腫瘍組織における AQP1, 3 - 11 の発現・局在を明らかにし、その比較解析から候補 AQP 分子種を選別する。

(2) に関して：

- ①AQP 高発現細胞への small interference RNA (siRNA) と AQP 特異的阻害物質投与による
- ②AQP 低発現細胞への AQP 遺伝子導入による細胞移動・浸潤能と薬剤感受性の変化を明らかにする。
- ③細胞移動能・浸潤能に関し、AQP の lamellipodia 形成への関与と AQP リン酸化により活性化される細胞内シグナル伝達経路を明らかにする。

(3) に関して：

- ①本邦
- ②国外の骨軟部肉腫症例多数例を用い、AQP 異常発現亢進と術後転移、薬剤感受性との関連性を統計学的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 骨軟部肉腫の転移と薬剤耐性に関係する AQP 分子種を選別

[材料]

①正常骨・軟部組織（仮骨・肉芽組織も含む）および②骨軟部肉腫生検組織の OCT 包埋新鮮凍結標本とホルマリン固定・パラフィン包埋組織；③培養骨軟部肉腫細胞株：骨肉腫細胞株（HOS, MG63, Saos2, OST, CDDP 耐性 OST）；軟部肉腫細胞株（HT1080, HT1080M, HT1080SC, KMLS-1, RD, KYM1）

[方法]

①正常骨軟部組織における AQP 1, 3-11 局在解析：免疫染色（AQP 1, 5 はパラフィン切片、AQP3, 6-11 は凍結切片）；Western blot；real time RT-PCR

②樹立ヒト骨軟部肉腫腫瘍細胞株の AQP1, 3-11 の mRNA 及び蛋白発現：蛍光抗体法；Western blot；real time RT-PCR

③ヒト骨軟部肉腫生検組織における AQP 1, 3-11 の mRNA 及び蛋白発現解析：骨肉腫、脂肪肉腫、滑膜肉腫、横紋筋肉腫の術後肺転移（+）と（-）各 4 例、ならびに術前化学療法 responder と non-responder 各 4 例で同様の解析を行う。

④ ①～③で得られたデータの比較解析による転移及び薬剤耐性関連 AQP 種の選別

（2）選別された AQP の *in vitro* での機能検証と分子機構の解析

① AQP 高発現細胞における siRNA ならびに AQP 特異的阻害物質による細胞移動能、浸潤能の抑制と抗癌剤感受性の亢進の検証

② AQP 低発現細胞における AQP 遺伝子導入による細胞移動能、浸潤能の亢進と抗癌剤感受性の抑制の検証

Scratch assay による移動能の計測；Matrigel invasion assay による浸潤能の計測；MTT assay によるシスプラチン CDDP 感受性の計測

③ 移動能・浸潤能に関し AQP の lamellipodia 形成への関与、AQP のリン酸化状態、c-Src との結合性、活性化される細胞内シグナル伝達経路の解明

Scratch 後の細胞移動の培養細胞イメージングシステムによる lamellipodia 形成の計測と AQP 発現との関連性の解析；抗 AQP 特異抗体による免疫沈降と抗リン酸化抗体（anti-phospho Ser/Thr PKA substrate 抗体）を用いた Western blot

法によるリン酸化 AQP の検出 Phospho-ERK, p38, JNK 抗体による Western blot 法と各シグナル伝達経路特異的な阻害薬を用いた AQP リン酸化により活性化される細胞内シグナル伝達経路の解明；免疫沈降法による AQP と c-Src との結合性の解析

④薬剤耐性機構における AQP による初期エンドサイトーシスの亢進の証明

電顕的を用いたエンドサイトーシスの計測

（3）ヒト骨軟部肉腫症例での AQP 遺伝子発現（蛋白及び mRNA）の臨床病理学的解析

① 金沢大学整形外科の骨軟部腫瘍症例（生検と転移性肺腫瘍組織）での AQP 異常発現亢進と術後転移の相関の解析

② 金沢大学整形外科の骨軟部腫瘍症例（生検と化学療法後組織）を用いた AQP 発現と薬剤感受性の関係の解析

③ 独マクデブルグ大学の骨軟部肉腫ファイルにおける AQP 異常発現亢進と転移との相関の解析：

4. 研究成果

（1）ヒト正常骨組織、骨肉腫およびヒト骨肉腫細胞株におけるアクアポリン aquaporin (AQP) の発現解析を行ない、以下の結果を初めて明らかにした。

① 非腫瘍性ヒト骨・軟骨組織では、AQP1 の骨芽細胞と幼若な軟骨細胞の細胞膜での、AQP5 の一部の破骨細胞の細胞膜での発現を認めた。

② ヒト骨肉腫腫瘍生検組織では、AQP1 は 23/26 例（88%）で腫瘍細胞の細胞膜あるいは細胞質に、AQP5 は 17/26 例（65%）で細胞質に強発現を認めた。

③ AQP1 は骨形成性と軟骨形成性骨肉腫細胞の細胞膜に限局する発現パターンと細胞質内・偽細胞突起での発現亢進パターンの 2 種類が識別され、後者は生命予後不良と有意な関連を示した（ $p=0.004$ ）。

④ 腫瘍摘出組織 11/18 例（61%）では浸潤先進部に一致した AQP1 の細胞質内・細胞偽突起内での発現亢進を認め、生命予後不良と有意な関連を示した（ $p=0.013$ ）。

⑤ 骨肉腫細胞における AQP1, 5 の発現は、骨肉腫腫瘍組織とヒト骨肉腫細胞株 4 株における western blot および real time RT-PCR 解析で確認された。

以上の結果から、ヒト骨肉腫では、A. 骨芽細胞・軟骨芽細胞の分化に対応した AQP1 の細胞膜局在性発現、B. 腫瘍発生に伴う AQP5 の aberrant な発現、C. 腫瘍進展に関連する AQP1 の発現亢進の存在が初めて明らかになった。さらに、AQP1 の過剰発現は、偽細胞突起形成を促進し、骨肉腫細胞の浸潤性と転移能の亢進に関与することが明らかになった。

(2) ヒト成人組織 10例、ヒト胎児組織 3例、良性および低悪性軟部腫瘍 27例、外科切除された軟部肉腫 73例とヒト軟部肉腫樹立細胞 5株における AQP1, 5の発現解析により以下の結果を初めて明らかにした。

①ヒト成人軟部組織では、AQP1は血管内皮、平滑筋細胞、末梢神経 (Schwann細胞)、滑膜被覆細胞、中皮細胞に、AQP5は平滑筋細胞、末梢神経 (Schwann細胞) に発現・局在した。

②ヒト胎児軟部組織では、AQP1, 5とも成人組織に加え、増生する骨格筋、心筋、神経節と、AQP1は伸長する足指先端部、AQP5は先進部骨膜に発現・局在を認めた。さらに、AQP1の発現は F-actinとの、AQP5の発現は Ki67発現との関連が示された。

③良性軟部腫瘍では神経鞘腫に AQP1, 5の、平滑筋腫に AQP5の発現を認めた。AQP1は皮膚線維腫では陰性だったが低悪性の隆起性皮膚線維肉腫 DFSPでは 2/9例で浸潤先進部腫瘍細胞に陽性所見を認めた。

④ヒト軟部肉腫樹立細胞株では横紋筋肉腫細胞に AQP1の、平滑筋肉腫細胞に AQP5の発現が蛋白および mRNA レベルで観察された。AQP1は細胞突起部細胞膜に一致した発現を、AQP5は細胞膜ならびに細胞質内両者での発現を認めた。

⑤軟部肉腫 37例 (50.7%) に AQP1の、29例 (39.7%) に AQP5の発現を認めた。AQP1は浸潤部細胞突起に一致した高発現を示した。AQP5の発現は Ki67標識率との相関を示した。

⑥軟部肉腫における AQP1, 5の発現は、Western blot及び real time RT-PCRによる解析で検証された。

⑦成人・胎児軟部組織と良性腫瘍における発現との比較から、平滑筋・Schwann細胞への細胞分化に伴う発現と細胞増殖、移動・浸潤など悪性腫瘍の細胞特性に伴う発現に分類された。後者の発現パターン群 (AQP1 and/or AQP5 陽性、AQP5発現) では累積生存率の有意な短縮を認めるとともに ($p=0.005$)、特に前者は独立した予後因子であることが多変量解析で示された。

以上の結果から、AQP1, 5 は軟部肉腫の浸潤・転移機構において重要な役割を演じている可能性が示唆され、軟部肉腫の肺転移阻止法の確立への有望な分子であると考えられた。

(3) AQP1 及び 5 の骨軟部肉腫の肺転移と生命予後への関与に関し、複数の樹立ヒト軟部肉腫細胞株を用い、トランスフェクションによる強制発現と siRNA を用いた遺伝子発現抑制による軟部肉腫細胞の細胞増殖、移動、浸潤能と転移への AQP-1 と AQP-5 の関与とその機能を *in vitro*ならびに *in vivo*レベルで検証した。

①通常状態で AQP1 を発現しない HT1080 線維肉腫細胞と SKN 平滑筋肉腫細胞株への AQP1 遺伝子強制発現は、細胞増殖への影響は認めないが、細胞偽突起形成を促進させるとともに、Oris Pro Cell Migration Assay による細胞移動と Matrigel Invasion Assay による浸潤能を有意に亢進させた。

②AQP1 は培養肉腫細胞の細胞膜突起部に強発現し、F-actin との共存が多重蛍光法により示された。

③HT1080 のヌードマウスの筋肉内接種は皮下組織への接種と比較し肺転移数の有意な亢進を認めた。筋肉内接種組織から得られた細胞株 HT1080M は、皮下組織接種組織から得られた細胞株 HT1080S と比較し、AQP1 の発現亢進が蛋白ならびに mRNA レベルでみられ、細胞増殖に有意差はみられないが、細胞移動・移動ならびに浸潤能の有意な亢進を認めた。さらに、siRNA による AQP1 遺伝子発現ノックダウンにより HT1080M の細胞移動と浸潤能の有意な抑制を認めた。

④通常状態で AQP1 を高発現する NRS-1 横紋筋肉腫細胞株への siRNA による AQP1 発現抑制は、細胞増殖への影響は認めないが、細胞移動と浸潤能を有意に低下させた。

⑤通常状態で AQP5 を発現しない HT1080 への AQP5 遺伝子強制発現は、細胞増殖能を亢進させた。細胞移動と浸潤能も軽度亢進したが細胞増殖能亢進による影響と考えられた。また、細胞偽突起形成など形態変化は認めなかった。

⑥通常状態で AQP5 を高発現する SKN 平滑筋肉腫細胞株での siRNA による AQP5 発現抑制は細胞増殖能を低下させたが、移動能ならびに浸潤能への有意な変化はなかった。

⑦ヌードマウスを用いた自然転移モデルにおける検討で、AQP1 遺伝子強制発現 HT1080 細胞は、MOCK あるいは遺伝子導入をしない親株と比較し、細胞接種部での浸潤性増殖を促進させるとともに、肺転移形成数を有意に増加させた。

以上の結果から、AQP1 遺伝子発現は細胞移動能・浸潤能の亢進を介して、AQP5 は主に増殖能の亢進を介して、軟部肉腫の浸潤・転移に関わることが明らかになった。さらに、AQP1 による細胞移動と浸潤能の亢進には、細胞偽突起形成の促進を介することも明らかになった。AQP1 ならびに AQP5 は軟部肉腫症例に対する新規進展阻止法の確立に向けた有望な分子であると考えられた。

(4) 今回の研究では腫瘍進展で注目されているアクアポリン亜型 AQP1, 5 に焦点を当て研究を進め、骨軟部肉腫の浸潤・転移における各々の役割を *in vivo* 及び *in vitro* の解析で検証した。今後、AQP1, 5 を標的とした骨軟部肉腫細胞の浸潤・転移制御に向けた研究に加え、他のアクアポリン亜型に関する検討を行いたい。また、研究期間中に抗癌剤耐性に関する検討は行うことができず、これに関しても今後検討を進めて行きたい。

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 6 件)

①町田雄一郎、上田善道 (2 番目)、他 6 名：肺腺癌の進展におけるアクアポリンの役割。肺癌 52: 17-22, 2012. 査読有 www.haigan.gr.jp-japanese

②Yuichiro Machida, Yoshimichi Ueda, Miyako Shimasaki, Katsuaki Sato, Shogo Katsuda, Tsutomu Sakuma: Relationship of aquaporin 1, 3 and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth and metastasis potential. Hum Pathol 42: 669-78, 2011. 査読有 doi:10.1016/j.humpatho.2010.07.022

③ JianFei Guo, Yoshimichi Ueda (3 番目), 他 10 名: VEGF-A and its isoform VEGF₁₂₁ mRNA expression measured by quantitative real-time RT-PCR: correlation with F-18 FDG uptake and aggressiveness of lung adenocarcinoma: preliminary study. Ann Nucl Med 25: 29-36, 2011. 査読有 DOI 10.1007/s12149-010-0427-1

④ Yasuhito Ishigaki, Yoshimichi Ueda (7 番目), 他 11 名: Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of protrusions in TGF- β 1-treated mitotic cells. Microsc Res Tech 74: 1024-31, 2011. 査読有

DOI 10.1002/jemt.20989

⑤ Yoshimichi Ueda (1 番目), Miyako Shimasaki (2 番目)、他 8 名: Aquaporin as a novel player in cancer cell invasion. K anazawa Med J 35: 61-7, 2010. 査読有

⑥ 上田 善道、島崎 都、佐藤 勝明、勝田 省吾: がん浸潤・転移の分子機構. 検査と技術 38:1192-3, 2010. 査読無

[学会発表] (計 7 件)

①島崎 都、上田 善道、他: 軟部肉腫におけるアクアポリン 1, 5 の発現とその意義。第 102 回 日本病理学会総会 2013 年 6 月 7-9 日、札幌

②金澤芳充、上田善道、土屋弘行 他: 肉腫細胞におけるアクアポリン 1 の発現と浸潤能への関与。第 21 回日本がん転移学会 2012 年 7 月 12-13 日、広島

③島崎 都、上田 善道、他: 軟部肉腫におけるアクアポリン 1, 5 の発現とその意義。第 101 回 日本病理学会総会 2012 年 4 月 26-28 日、東京

④金澤芳充、上田善道、土屋弘行 他: Involvement of aquaporin 1 in the invasion potential of human sarcoma cell lines. 第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 2012 年 4 月 26-28 日、東京

⑤Miyako Shimasaki, Yoshimichi Ueda, 他: Relationship of aquaporin 1, 3 and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth and metastasis potential. Congress of European Respiratory Society. 2011 年 9 月 24-27 日、Amsterdam, Holland

⑥Yoshimitsu Kanazawa, Yoshimichi Ueda, Hiroyuki Tsuchiya、他: Involvement of aquaporin 1 and 5 overexpression in metastasis potential of human osteosarcoma. International Society of Lim Salvage. 2011 年 9 月 15-18 日、Beijing, China

⑦ 島崎 都、上田善道、他: 骨肉腫におけるアクアポリン 1, 5 の発現と肺転移への関与。第 100 回日本病理学会総会, 2011 年 4 月 30 日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 善道 (UEDA YOSHIMICHI)

金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：50271375

(2)研究分担者

土屋 弘行 (TSUCHIYA HIROYUKI)

金沢大学・医学部・教授

研究者番号：40227434

(H22)

(3)連携研究者

島崎 都 (SHIMASAKI MIYAKO)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：00440511