

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390419
 研究課題名（和文） がん・肉腫幹細胞を標的とした新規治療法の開発—治療抵抗性肉腫の克服を目指して
 研究課題名（英文） Targeting of osteosarcoma and soft tissue sarcoma initiating cells
 研究代表者
 小宮 節郎（KOMIYA SETSUROU）
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：30178371

研究成果の概要：

細胞表面の抗原 X を用いて分離した細胞をヌードマウスに移植して腫瘍形成能力を比較検討したところ陽性細胞は陰性細胞と比較して有意に腫瘍形成能力が高かった。Real-time PCR を用いた解析で陽性細胞では陰性細胞と比較して未分化マーカー遺伝子の発現が有意に高く、分化マーカーの発現が低かった。この細胞株は無血清培地では増殖しないが bFGF を添加することで抗原 X 陽性細胞は維持されまたその割合も増加した。一方で CNTF を添加すると陽性細胞の比率が減少した。肉腫患者組織では正常組織と比較して抗原 X の発現が亢進していた。この手法はがん幹細胞をターゲットとした軟部肉腫治療法の開発に有用であると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度	6,200,000	0	6,200,000
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	15,300,000	2,730,000	18,030,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨軟部肉腫、がん幹細胞、sarcoma-initiating cell

1. 研究開始当初の背景

近年ヒトの癌組織中にも造血幹細胞や神経幹細胞と同じように無制限に分裂可能な能力を持ったがん幹細胞が存在していることが明らかとなってきた。白血病や肺癌、神経膠腫の一部はこれら少数のがん幹細胞が分化増殖することにより癌組織全体を構成することが報告されている。

Singh SK. et al., Identification of human brain tumour initiating cells, Nature 432 396-401, (2004). Al-Hajj M. et al., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells Proc Natl Acad Sci USA. 100 3983-3988. (2003)

現在主流を占めている放射線治療や化学療法などはがん幹細胞には治療効果が低いと推察されており、再発や転移には生き残ったがん幹細胞の関与が大きいことが示唆されておりがん幹細胞をターゲットとした治療法の開発が望まれている。

がん幹細胞をターゲットとした治療法の開発のためにはがん幹細胞を濃縮・精製し、その維持・増殖・分化メカニズムを解明することが必須である。しかし生体内の多くの組織中には正常な幹細胞が存在しており、CD133などのがん幹細胞マーカーは元々正常幹細胞のマーカーであるため、生体癌組織からがん幹細胞

胞のみを濃縮・精製するのは非常に困難である。

申請者等は正常幹細胞のコンタミネーションがほとんど無いと考えられる癌細胞株からがん幹細胞様の細胞であるSP細胞をFlow cytometryを用いて比較的容易に精製する方法を報告している。これらの癌細胞株中のSP細胞は自己複製能と多分化能を持ち、腫瘍形成能力が有意に高いがん幹細胞様の細胞であることも合わせて報告した。Setoguchi T.(他2名、2番目イコールファーストオーサー) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line, Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 20;101(3):781-6, (2004).

Setoguchi T. (他2名, 1番目) Cancer Stem Cells Persist in Many Cancer Cell Lines, Cell Cycle, 3(4):414-415, (2004)

2. 研究の目的

骨軟部肉腫におけるがん幹細胞の報告はまだないため骨軟部肉腫における幹細胞、肉腫幹細胞の同定と解析の研究を始めた。上記 Proc Natl Acad Sci USA (2004)中で報告しているが、骨肉腫の細胞株である U2OS, Saos-2 には SP 細胞は存在していなかった。そのため新たな手法の開発を試み我々は骨軟部肉腫におけるがん幹細胞の同定法の開発とその機能解析を行うことにより、骨軟部肉腫の新規治療法の開発研究を行うこととした。

3. 研究の方法

細胞表面の抗原に対する抗体を用いてヒト軟部肉腫細胞株を染色し検討した。Xenograft モデルで腫瘍形成能力を検討した。また無血清培地中で抗原 X 陽性細胞の維持・増殖・増殖阻害に関する因子の検討を行った。

4. 研究成果

A
細胞表面の抗原 X に対する抗体を利用することにより腫瘍形成能力が著しく高い肉腫幹細胞様細胞 (sarcoma-initiating cell : SIC) を精製することを可能にした。抗原 X を用いて分離した細胞をヌードマウスに移植して腫瘍形成能力を比較検討したところ陽性細胞は陰性細胞と比較して有意に腫瘍形成能力が高かった。さらに陽性細胞では一個の細胞を移植した場合でも 6 匹中 2 匹のヌードマウスで腫瘍形成が認められた。一方で一個の陰性細胞移植では腫瘍形成は認められなかった。また陽性細胞から形成された腫瘍の一部を別のヌードマウスに移植したところ 6 匹中 6 匹で腫瘍形成を認めたが、陰性細胞から

形成された腫瘍を移植した群では腫瘍形成は認められなかった。

B

我々が濃縮精製した SIC は全体の 2%程の細胞群である。この SIC では非 SIC と比較して未分化細胞マーカー遺伝子の発現が上昇していた。

C

上記の骨軟部肉腫細胞株を無血清培地で培養しつつ様々な因子を加えたところ、bFGF を加えると SIC を維持可能なことが明らかとなった。また bFGF を加えて培養することにより SIC は全体の 6%程度まで増加することが明らかとなった。さらに ciliary neurotrophic factor を培養に添加すると SIC の割合が減少することが明らかとなった。

D

臨床検体をもちいて検討したところ、患者サンプルにおいて抗原 X の発現が有意に高いことが明らかとなった。

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 14 件)

① Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation

Motoyuki Tanaka¹, Takao Setoguchi¹, Masataka Hirotsu, Hui Gao, Hiromi Sasaki, Yukihiro Matsunoshita, Seturo Komiya.

¹ These two authors contributed equally. British Journal of Cancer 2009; 100:1957-65.

査読あり

② Stem cell factor prevents neuronal cell apoptosis after acute spinal cord injury.

Yamasaki K, Setoguchi T, Takenouchi T, Yone K, Komiya S.

Spine. 2009 Feb 15;34(4):323-7. 査読あり

③ Aging-related loss of the chromatin protein HMGB2 in articular cartilage is linked to reduced cellularity and osteoarthritis.

Taniguchi N, Caramés B, Ronfani L, Ulmer U, Komiya S, Bianchi ME, Lotz M.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 27;106(4):1181-6. 査読あり

④ Activation of synoviolin promoter in

rheumatoid synovial cells by a novel transcription complex of interleukin enhancer binding factor 3 and GA binding protein alpha.

Izumi T, Fujii R, Izumi T, Nakazawa M, Yagishita N, Tsuchimochi K, Yamano Y, Sato T, Fujita H, Aratani S, Araya N, Azakami K, Hasegawa D, Kasaoka S, Tsuruta R, Yokouti M, Ijiri K, Beppu M, Maruyama I, Nishioka K, Maekawa T, Komiya S, Nakajima T
Arthritis Rheum. 2009;60(1):63-72. 査読あり

⑤ Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells.

Tominaga H, Maeda S, Miyoshi H, Miyazono K, Komiya S, Imamura T.
J Bone Miner Metab. 2009;27(1):36-45. Epub 2008 Nov 19. 査読あり

⑥ Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells.

Fukunaga E, Inoue Y, Komiya S, Horiguchi K, Goto K, Saitoh M, Miyazawa K, Koinuma D, Hanyu A, Imamura T.
J Biol Chem. 2008 Dec 19;283(51):35660-7 査読あり

⑦ CCAAT/enhancer-binding protein beta promotes osteoblast differentiation by enhancing Runx2 activity with ATF4.

Tominaga H, Maeda S, Hayashi M, Takeda S, Akira S, Komiya S, Nakamura T, Akiyama H, Imamura T.
Mol Biol Cell. 2008 ;19(12):5373-86 査読あり

⑧ Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis.

Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, Yamada S, Nagayama S, Hashiguchi K, Sunahara N, Fukuzaki K, Nagata R, Komiya S, Maruyama I, Fukuda T, Abeyama K. Arthritis Rheum. 2008;58(9):2675-85 査読あり

⑨ Differential expression of GADD45beta in normal and osteoarthritic cartilage: potential role in homeostasis of articular chondrocytes.

Ijiri K, Zerbini LF, Peng H, Otu HH, Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir C, Walsh

N, Bierbaum BE, Mattingly D, van Flandern G, Komiya S, Aigner T, Libermann TA, Goldring MB.

Arthritis Rheum. 2008;58(7):2075-87 査読あり

⑩ Expression of apoptosis signal-regulating kinase 1 in mouse spinal cord under chronic mechanical compression: possible involvement of the stress-activated mitogen-activated protein kinase pathways in spinal cord cell apoptosis.

Takenouchi T, Setoguchi T, Yone K, Komiya S.
Spine. 2008 Aug 15;33(18):1943-50. 査読あり

⑪ Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification.

Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H.
Mol Cell Biol. 2007 Aug;27(16):5650-63. 査読あり

⑫ HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells.

Tofuku K, Yokouchi M, Murayama T, Minami S, Komiya S.
Int J Oncol. 2006 Jul;29(1):175-83 査読あり

⑬ Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage.

Sato T, Konomi K, Yamasaki S, Aratani S, Tsuchimochi K, Yokouchi M, Masuko-Hongo K, Yagishita N, Nakamura H, Komiya S, Beppu M, Aoki H, Nishioka K, Nakajima T.
Arthritis Rheum. 2006 Mar;54(3):808-17 査読あり

⑭ Suppression of IL-6 production and proliferation by blocking STAT3 activation in malignant soft tissue tumor cells.

Shouda T, Hiraoka K, Komiya S, Hamada T, Zenmyo M, Iwasaki H, Isayama T, Fukushima N, Nagata K, Yoshimura A.
Cancer Lett. 2006 Jan 18;231(2):176-84. 査読あり

[学会発表] (計1件)

第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会
骨・軟部腫瘍におけるがん幹細胞の研究
瀬戸口啓夫、小宮節郎
2008 年 10 月 24 日、京都市

〔図書〕（計 1 件）

関節外科 2007年2月号 pp.226-227

がん幹細胞と治療抵抗性

瀬戸口啓夫 小宮節郎 近藤 亨

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮 節郎 (KOMIYA SETSUROU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

(2) 研究分担者

横内 雅博 (YOKOUCHI MASAHIRO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80359976

瀬戸口 啓夫 (SETOGUCHI TAKAO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：40423727

(3) 連携研究者

なし