

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09031

研究課題名(和文) iPS細胞作製技術を用いた人工骨肉腫幹細胞の樹立と機能解明

研究課題名(英文) Establishment of an artificial osteosarcoma stem cell line by transduction of defined factors with with iPS cell technology

研究代表者

河本 旭哉 (Kawamoto, Teruya)

神戸大学・医学研究科・特命講師

研究者番号：30420558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：希少がんである骨肉腫細胞からiPS細胞作製技術を応用して幹細胞の性質を併せ持つ骨肉腫幹細胞を作製し、その性質について検討を行った。
骨肉腫細胞株MG-63にOCT3/4・KLF4・SOX2を遺伝子導入することで、骨肉腫とがん幹細胞の特性を持つ細胞の作製に成功した。同細胞は、幹細胞マーカーの発現上昇、細胞増殖能低下、薬剤耐性能・細胞遊走能・骨形成能の増強を認め、In vivoでの腫瘍形成能増強と腫瘍組織内の悪性度上昇を認めた。本研究によって、骨肉腫細胞に特定因子を導入することでがん幹細胞の特性を獲得し得ることが明らかとなり、骨肉腫の新たな病態理解や治療標的分子の同定、新規治療開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、希少かつ治療困難な骨肉腫において、iPS細胞作製に用いられる技術を応用することで骨肉腫幹細胞を得ることに成功した初めての研究である。この成功によって骨肉腫においてもがん幹細胞研究を遂行することが可能となる革新的な成果であり、学術的意義が非常に高い。また得られた細胞の特性を解析することは、骨肉腫における幹細胞の機能を解明することに繋がり、骨肉腫の新たな病態理解や治療標的分子の同定とそれらに基づく新規治療開発を行うことが期待出来る。とくに新規治療開発は限られた治療法しか存在しない骨肉腫の臨床において、非常に有用な成果であり、社会的意義も非常に高いものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to generate the cancer stem cell (CSC)-like cells from human osteosarcoma cells by introducing reprogramming factors, and to reveal the obtained cell characteristics.

We could obtain the osteosarcoma stem cells by transduction of OCT3/4-KLF4-SOX2 genes into a human osteosarcoma cell line MG63. mRNA expression of reported CSC markers significantly increased in the cells. In the cells, WST-8 assays revealed that significantly lower cell proliferation and higher chemo-resistance were observed. After osteogenic induction, strongly positive staining of Alizarin red S and ALP was also observed. In vivo experiments, tumors from the cells were significantly larger in size, and strong immunopositivity of Ki-67, Osteocalcin and HIF1- was observed. We could generate the osteosarcoma stem cells by introducing reprogramming factors. This method could be useful to elucidate the molecular mechanisms and the effective therapeutic targets in human osteosarcoma.

研究分野：骨軟部悪性腫瘍

キーワード：骨肉腫 がん幹細胞 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨・軟部組織に発生する悪性腫瘍である骨軟部肉腫は、本邦での罹患率は人口 10 万人に 3 人未満の希少がんである。手術、化学療法、放射線治療を組み合わせた集学的治療が行なわれるが、確立された治療法はまだまだ存在せず、治療に難渋することも多い。また、補助療法である化学療法、放射線治療による治療効果は非常に乏しいものであり、切除不能の進行例や再発、遠隔転移例においては予後不良となることも稀ではない。手術侵襲の縮小化や再発、転移を予防する観点から有効かつ副作用の少ない補助療法の確立が必要不可欠であるが、骨軟部肉腫の悪性化に寄与すると考えられる要因についての解析はまだまだ発展途上である。

近年の幹細胞研究の進歩に伴い、がん組織においても『がん幹細胞 (Cancer stem cell)』と呼ばれる未分化な細胞集団が存在し、がんの発生、再発や転移、治療抵抗性など、その悪性化に重要であることが明らかとなってきた。骨軟部肉腫においても、同様にがん幹細胞様細胞 (肉腫幹細胞 Sarcoma stem cell) が存在し、腫瘍発生や悪性化、治療抵抗性への関与を示唆する報告がなされつつある。『がん幹細胞』の性質や機能を解析することは、再発や転移の予防、治療に対する反応性の向上に繋がり、がん治療における新たな breakthrough となることは言うまでもなく、とくにいまだ治療困難かつ非常に希少である骨軟部肉腫領域において、その意義は非常に高い。しかし、極めて少数の細胞集団である『がん幹細胞』を腫瘍組織から分離・同定することは非常に困難かつ労力を要するため、研究の進歩に大きな妨げとなっている。

2. 研究の目的

iPS 細胞 (Induced pluripotent stem cell) は、山中らが世界で初めて作製に成功した体細胞に極少数の遺伝子を導入することで得られる多能性幹細胞であり、幹細胞研究における breakthrough となった。本研究の共同研究者である青井らは、この iPS 細胞作製技術を用いて大腸がん細胞株から幹細胞の特性を有する人工大腸がん幹細胞を作製することに成功した。この iPS 細胞作製技術による人工がん幹細胞作製の成功は、がん幹細胞研究に用いるサンプルの量的および時機的制約を解消するものであり、がん幹細胞機能の解明や新規治療法開発において革新的な手法となる可能性が極めて高い。本研究でもこの技術を用いることで、効率的に人工骨肉腫幹細胞を作製することが可能となり、非常に希少な腫瘍型である骨肉腫においてもがん幹細胞研究を遂行することが可能となる。本研究の目的は、希少かつ治療困難な骨軟部肉腫の再発・転移、治療抵抗性に関わる因子の解明を目指す『がん幹細胞』研究のため、代表的な骨軟部肉腫である骨肉腫に対して iPS 細胞作製技術による人工骨肉腫幹細胞の作製を行い、得られた人工骨肉腫幹細胞の機能解明を行うことである。

3. 研究の方法

本研究では、骨肉腫の基礎研究において広く用いられている骨肉腫細胞株を用いて、iPS 細胞作製技術による人工骨肉腫幹細胞の作製を行い、同細胞の幹細胞特性、腫瘍増生、治療抵抗性について、下記のごとく、形態学的、組織学的、分子生物学的に評価した。

(1) ヒト骨肉腫由来細胞株を用いた人工骨肉腫幹細胞の作製

本研究において、遺伝子の導入には安定して長期間導入効果の得ることができる方法としてレトロウイルスを用いた方法を選択した。親細胞株としてヒト骨肉腫細胞株 MG-63 を用い、レトロウイルスベクターにて *OCT3/4*、*KLF4*、*SOX2* を導入した MG-OKS 株、コントロールとして GFP を導入した MG-GFP 株を作製し、リアルタイム PCR (RT-qPCR) にて導入遺伝子の発現を確認した。

(2) 人工骨肉腫幹細胞における幹細胞特性の評価

過去にがん幹細胞関連マーカーとして報告のあった表面マーカー (CD24, CD26, CD133) の発現量を RT-qPCR、細胞の形態を位相差顕微鏡、上皮間葉転換能 (E-cadherin, Vimentin) を immunoblot analysis、細胞増殖速度・ドキシソルピシンに対する薬剤耐性能を WST-8 assay、薬剤耐性に関連した遺伝子として ABCB1 の発現量を RT-qPCR、遊走能を Wound healing assay、自己複製能を Sphere formation assay (低接着・血清飢餓状態で培養) を行い評価した。また骨肉腫の特性である骨分化能として、骨分化培地で 3 週間培養後の骨形成能をアリザリンレッド染色、ALP 活性を ALP 染色で評価し、骨形成因子である BMP2, 4, 6 の発現量を RT-qPCR で評価した。また、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子解析を行い、MG-OKS 株で変動している遺伝子を抽出した。さらに Gene ontology 解析にて抽出遺伝子の傾向を探索し、得られた signal から細胞周期・上皮間葉転換・上皮関連因子について検討した。

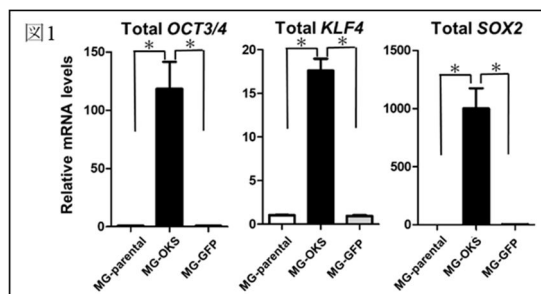
(3) 人工骨肉腫幹細胞の腫瘍形成能の評価

5 週齢雄のヌードマウス (Balb/c-mu) の背部に親細胞株、MG-OKS 株および MG-GFP 株を 200 万細胞皮下移植して xenograft を作成した。8 週間経過後、形成された腫瘍体積を μ CT で計測し、腫瘍組織内の評価として Ki-67, Osteocalcin, HIF1- α の発現を蛍光免疫染色で検討した。

4. 研究成果

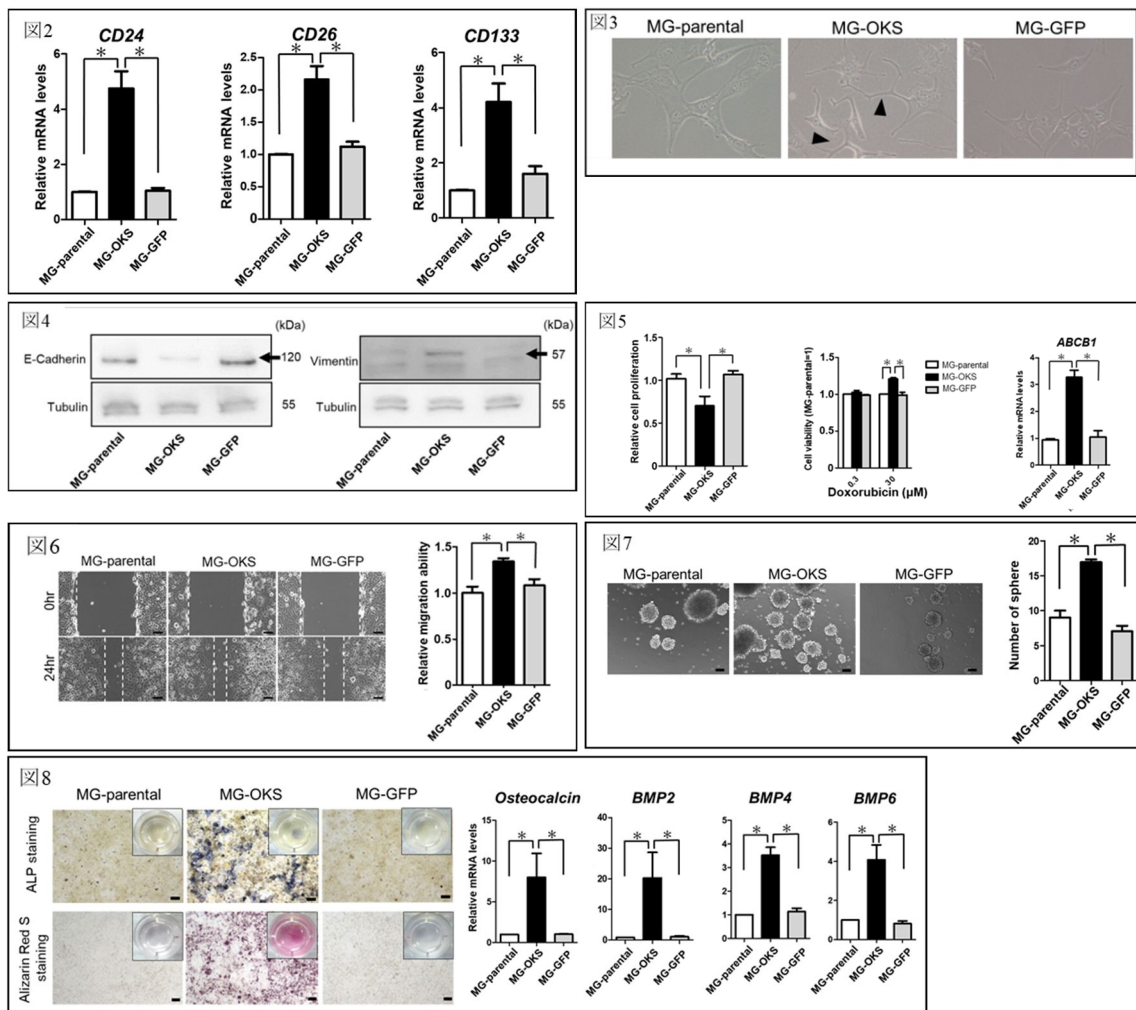
(1) ヒト骨肉腫由来細胞株を用いた人工骨肉腫幹細胞の作製

レトロウイルスベクターにて *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2* を導入した MG-OKS 株において, 導入遺伝子が有意に上昇していることを qPCR にて確認した (図 1)。



(2) 人工骨肉腫幹細胞における幹細胞特性の評価

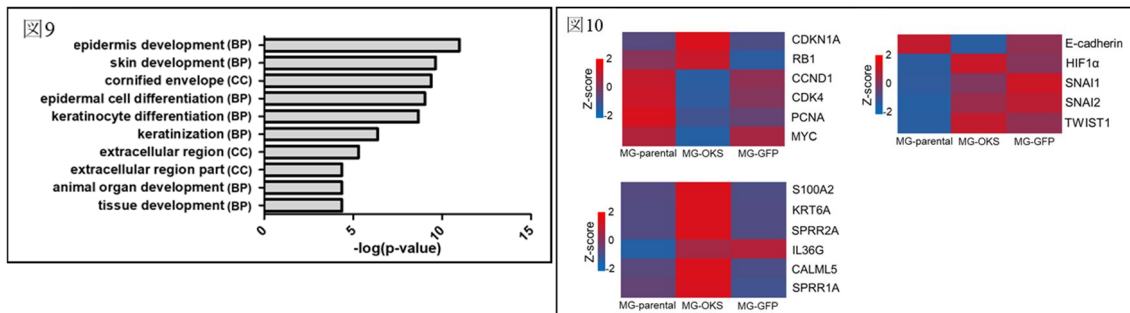
次に, (1)で得られた MG-OKS 株の特性について評価した. MG-OKS 株では, 過去に他のがん腫で報告のある幹細胞表面マーカー *CD24*, *CD26*, *CD133* の発現が qPCR にて上昇していた (図 2). 遺伝子導入による細胞形態の変化について, 位相差顕微鏡を用いて評価したところ, 親細胞株と MG-GFP 株では紡錘形の形態を示すのに対し, MG-OKS 株では菲薄化した細胞質と伸長する突起形成を認めた (図 3). 上皮間葉転換能について, 上皮マーカーである E-cadherin, 間葉系マーカーである vimentin を immunoblot analysis で評価したところ, MG-OKS 株で E-cadherin の発現低下と vimentin の発現上昇を認めた (図 4). 細胞増殖速度および薬剤耐性能の評価では, MG-OKS 株では細胞増殖速度の有意な低下とドキソルビシンに対する薬剤耐性能の増強を認め, さらに RT-qPCR にて薬剤耐性関連遺伝子 *ABCB1* の発現量上昇を認めた (図 5). Wound healing assay では, MG-OKS 株で遊走能の上昇を認めた (図 6). 自己複製能の指標となる sphere formation assay では MG-OKS 株において sphere 形成能が有意に高かった (図 7). 骨分化能の評価では, MG-OKS 株においてアリザリンレッド染色および ALP 染色が共に強い染色を示し, RT-qPCR に骨形成因子である *BMP2*, *4*, *6* の発現上昇を認めた (図 8).



上記結果から, in vitro において作製した MG-OKS 株は, 幹細胞関連表面マーカーの発現, 低い細胞増殖能, 高い薬剤耐性能, 高い細胞遊走能, 高い sphere 形成能, 高い骨分化能を示し, がん幹細胞の特性を獲得していた. また, この細胞では形態的な変化とともに, EMT 能の亢進

を認めるという特性を示した。

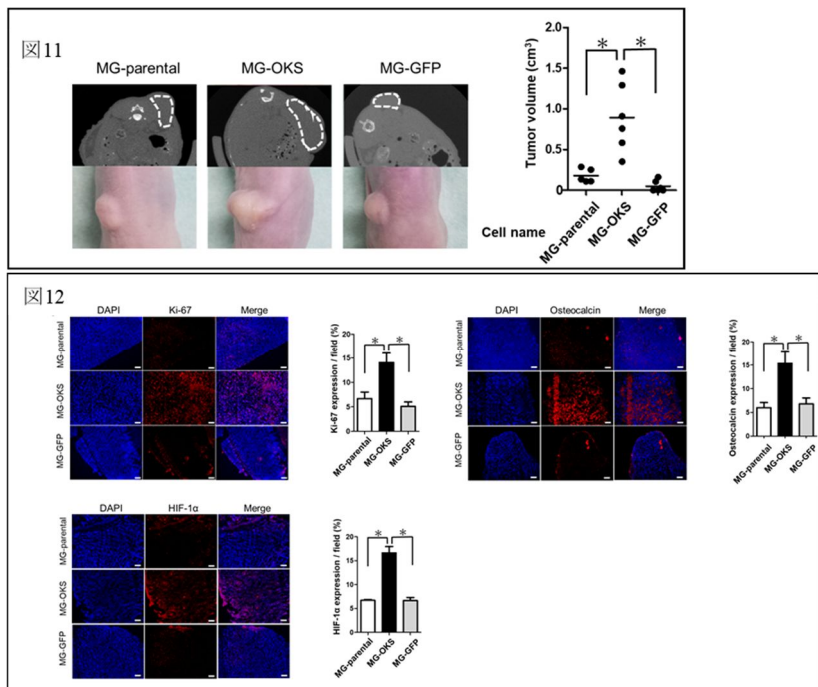
マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析では、親細胞株および MG-GFP 群と比較して MG-OKS 株で 10 倍以上発現強度が上昇した遺伝子を gene ontology 解析すると、“epidermis development”, “skin development”, “cornified envelope”など上皮に関連した term で P 値が低い結果であった (図 9)。また、得られたすべての signal から細胞周期・上皮間葉転換・上皮に関連した遺伝子について抽出した。MG-OKS 株では、細胞周期に関連した遺伝子として CDKN1A・RB1 の上昇と CDK4・CCND・PCNA・MYC の低下、上皮間葉転換を調整する遺伝子として HIF-1 α ・TWIST の上昇と E-cadherin の低下、上皮に関連した遺伝子として S100A2・KRT6A・SPRR2A・CALML5・SPRR1A の上昇を認めた (図 10)。



マイクロアレイによる解析において、間葉系細胞由来の腫瘍である骨肉腫より作製したがん幹細胞様細胞にて上皮に関連した遺伝子が上昇していた点は非常に興味深く、治療標的や後予測マーカーになる可能性が示唆された。

(3) 人工骨肉腫幹細胞の腫瘍形成能の評価

作製した MG-OKS 株が生体内でどのような phenotype を示すかを検討した。5 週齢雄のヌードマウス (Balb/c-mu) の背部皮下に親細胞株、MG-OKS 株および MG-GFP 株を 200 万細胞皮下移植して xenograft を作成し、in vivo での検討を行った。皮下移植 8 週後の腫瘍体積は MG-OKS 株で有意に大きく (図 11)、MG-OKS 株では悪性度の指標である Ki-67、骨分化能の指標である Osteocalcin、組織内低酸素環境の指標である HIF-1 α の有意な発現上昇を認めた (図 12)。



本研究では、骨肉腫細胞株に特定の遺伝子を導入することで細胞増殖能・細胞遊走能・自己複製能・骨分化能・腫瘍形成能などの観点からがん幹細胞特性を持つ細胞を作製することに成功し、その細胞を網羅的遺伝子解析することで上皮に関連した遺伝子を含むいくつかの遺伝子の発現が上昇していることを示した。本研究で用いた手法は、side population 法や sphere 法、表面マーカーを用いた抽出など、過去にがん幹細胞の同定方法として報告されている方法では研究に十分量のがん幹細胞の採取が困難であるという問題点を解決し、骨肉腫の治療ターゲットの探索や病態解明に有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hara H, Sakai Y, Kawamoto T, Fukase N, Kawakami Y, Takemori T, Fujiwara S, Kitayama K, Yahiro S, Miyamoto T, Kakutani K, Niikura T, Miyawaki D, Okada T, Sakashita A, Imamura Y, Sasaki R, Kizawa Y, Minami H, Matsumoto T, Matsushita T, Kuroda R, Akisue T	4. 巻 27
2. 論文標題 Surgical outcomes of metastatic bone tumors in the extremities (Surgical outcomes of bone metastases)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100352 ~ 100352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbo.2021.100352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 TAKEMORI T, KAWAMOTO T, MORISHITA M, HARA H, FUKASE N, KAWAKAMI Y, FUJIWARA S, KITAYAMA K, YAHIRO S, MIYAMOTO T, FUJIMOTO T, FUJITA I, MIFUNE Y, HOSHINO Y, KAKUTANI K, MATSUMOTO T, MATSUSHITA T, NIIKURA T, KURODA RY, AKISUE T	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinical Outcome of the Patients With Brain Metastasis from Soft Tissue Sarcomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara S, Kawamoto T, Kawakami Y, Koterazawa Y, Hara H, Takemori T, Kitayama K, Yahiro S, Kakutani K, Matsumoto T, Matsushita T, Niikura T, Koyanagi-Aoi M, Aoi T, Kuroda R, Akisue T	4. 巻 11
2. 論文標題 Acquisition of cancer stem cell properties in osteosarcoma cells by defined factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-020-01944-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto T, Hara H, Morishita M, Fukase N, Kawakami Y, Takemori T, Fujiwara S, Kitayama K, Yahiro S, Miyamoto T, Fujimoto T, Fujita I, Kakutani K, Matsumoto T, Matsushita T, Niikura T, Kuroda R, Akisue T	4. 巻 37
2. 論文標題 Prognostic influence of the treatment approach for pulmonary metastasis in patients with soft tissue sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Metastasis	6. 最初と最後の頁 509 ~ 517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10585-020-10038-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Kitayama K, Kawamoto T, Hara H, Fukase N, Kawakami Y, Takemori T, Fujiwara S, Yahiro S, Miyamoto T, Kuroda R, Akisue T.
2. 発表標題 Identification Of Associated MicroRNAs In Bone Destruction By Breast Cancer Metastasis.
3. 学会等名 ORS 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yahiro S, Kawamoto T, Hara H, Kawakami Y, Takemori T, Fujiwara S, Kitayama K, Miyamoto T, Aoi T, Koyanagi-Aoi T, Kuroda R, Akisue T.
2. 発表標題 Identification of Dormant Cells in Ewing sarcoma.
3. 学会等名 ORS 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原周一, 河本旭哉, 川上洋平, 小寺澤康文, 原仁美, 竹森俊幸, 北山和道, 八尋俊輔, 青井貴之, 黒田良祐, 秋末敏宏.
2. 発表標題 骨肉腫細胞における特定因子導入を用いたがん幹細胞特性の獲得
3. 学会等名 第53回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北山和道, 河本旭哉, 原仁美, 深瀬直政, 川上洋平, 竹森俊幸, 藤原周一, 八尋俊輔, 黒田良祐, 秋末敏宏.
2. 発表標題 がん骨転移における骨破壊に寄与するmiRNAの探索
3. 学会等名 第53回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原周一, 河本旭哉, 川上洋平, 小寺澤康文, 原仁美, 竹森俊幸, 北山和道, 八尋俊輔, 青井貴之, 黒田良祐, 秋末敏宏.
2. 発表標題 骨肉腫細胞における特定因子導入を用いたがん幹細胞特性の獲得
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北山和道, 河本旭哉, 原仁美, 深瀬直政, 川上洋平, 竹森俊幸, 藤原周一, 八尋俊輔, 黒田良祐, 秋末敏宏.
2. 発表標題 乳癌骨転移における骨破壊に寄与するmiRNAの探索
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八尋俊輔, 河本旭哉, 川上洋平, 原仁美, 竹森俊幸, 藤原周一, 北山和道, 宮本智弘, 青井貴之, 黒田良祐, 秋末敏宏.
2. 発表標題 Ewing肉腫におけるcellular dormancyの同定とその特性の探索
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Morishita M, Fujimoto T, Kawamoto T, Akisue T, Fujita I, Takemori T, Fujiwara S, Kitayama K, Yahiro S, Miyamoto T, Kawakami Y, Fukase N, Hara H, Kuroda R.
2. 発表標題 Antitumor effect of LAT1 inhibition on clear cell sarcoma cells.
3. 学会等名 2020 The Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kitayama K, Kawamoto T, Hara H, Fukase N, Kawakami Y, Takemori T, Fujiwara S, Yahiro S, Kuroda R, Akisue T.
2. 発表標題 Identification Of Associated MicroRNAs In Bone Destruction By Breast Cancer Metastasis.
3. 学会等名 ORS 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuichi Fujiwara, Teruya Kawamoto, Hitomi Hara, Yohei Kawakami, Kazumichi Kitayama, Shunsuke Yahiro, Yasufumi Koterazawa, Toshihiro Akisue, Takashi Aoi, Ryosuke Kuroda
2. 発表標題 A New Method to Generate Osteosarcoma Cells with Cancer Stem Cell Properties by Reprogramming Factors
3. 学会等名 ORS 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 周一、河本 旭哉、川上 洋平、小寺澤 康文、原 仁美、深瀬 直政、竹森 俊幸、北山 和道、秋末 敏宏、青井 貴之、黒田 良祐
2. 発表標題 リプログラミング因子を用いた人工骨肉腫幹細胞株の樹立
3. 学会等名 第2回日本サルコーマ治療研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 周一、河本 旭哉、川上 洋平、小寺澤 康文、原 仁美、深瀬 直政、竹森 俊幸、北山 和道、秋末 敏宏、青井 貴之、黒田 良祐
2. 発表標題 リプログラミング因子を用いた人工骨肉腫幹細胞株の樹立
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 周一、河本 旭哉、川上 洋平、小寺澤 康文、原 仁美、深瀬 直政、竹森 俊幸、北山 和道、秋末 敏宏、青井 貴之、黒田 良祐
2. 発表標題 リプログラミング因子を用いた人工骨肉腫幹細胞株の樹立
3. 学会等名 第52回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuichi Fujiwara, Teruya Kawamoto, Naomasa Fukase, Hitomi Hara, Yohei Kawakami, Toshiyuki Takemori, Kazumichi Kitayama, Takashi Aoi, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue
2. 発表標題 Development of Induced Osteosarcoma Stem Cells Using Induced Pluripotent Stem (iPs) Cells Production Technology
3. 学会等名 ORS 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原周一、河本旭哉、川上洋平、小寺澤康文、原仁美、深瀬直政、竹森俊幸、北山和道、秋末敏宏、青井貴之、黒田良祐
2. 発表標題 リプログラミング因子を用いた人工骨肉腫幹細胞株の樹立
3. 学会等名 第2回日本サルコーマ治療研究学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原周一、河本旭哉、青井貴之、小寺澤康文、原仁美、深瀬直政、蒲田悦子、竹森俊幸、秋末敏宏、黒田良祐
2. 発表標題 iPS作製技術を用いた人工骨肉腫幹細胞株の樹立
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会 基礎学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原 仁美 (Hara Hitomi) (40437489)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究分担者	深瀬 直政 (Fukase Naomasa) (60579324)	神戸大学・医学部附属病院・医員 (14501)	
研究分担者	秋末 敏宏 (Akisue Toshihiro) (90379363)	神戸大学・保健学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	青井 貴之 (Aoi Takashi) (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授 (14501)	
研究分担者	川上 洋平 (Kawakami Yohei) (50626570)	神戸大学・医学部附属病院・医員 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------