

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07503

研究課題名(和文) 骨肉腫マウスモデルを用いた悪性腫瘍の発症・進展におけるCD109の発現意義の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of CD109 in tumor progression using osteosarcoma cells and tissue

研究代表者

三井 伸二 (Mii, Shinji)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80646505

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)：がん関連タンパク質CD109の機能を解明するために、骨肉腫細胞株およびヒト組織を用いて解析を行った。腫瘍細胞においてCD109が高発現である骨肉腫症例は、低発現である症例に比べて有意に予後不良であることが明らかとなった。また骨肉腫細胞株を用いた解析では、CD109がTGF- β シグナルに対しては明らかな影響を及ぼさなかった一方、BMP-2によるSMAD1/5/9のリン酸化に対しては抑制的に作用することが明らかとなった。

以上の結果から、CD109は骨肉腫においては癌腫の場合とは異なり、TGF- β シグナルではなくBMPシグナルを負に制御することで、腫瘍の進展・増悪に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多くのがん効果的な治療法が登場しているにも関わらず、難治性の希少がんである骨肉腫においては依然として新規治療法の開発が進んでいない。本研究では、CD109の発現が高い骨肉腫症例が、CD109の発現が低い症例に比べて有意に予後不良であり、その原因の一つがCD109による影響であることを示す成果が得られており、CD109を標的とした骨肉腫の新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of CD109 using osteosarcoma cell lines and human osteosarcoma tissue. We performed immunohistochemical analysis on human osteosarcoma tissue and found that patients with CD109-high osteosarcoma had a significantly worse prognosis than those with CD109-low one.

Although no significant difference was found in TGF- β 1 signaling between CD109-knockdown osteosarcoma cells and control cells, we observed that CD109 suppressed SMAD1/5/9 phosphorylation by BMP-2, which is one of the member of TGF- β superfamily.

These results suggest that CD109 is involved in the exacerbation of osteosarcoma via not TGF- β but BMP signaling.

研究分野：実験病理学

キーワード：CD109 骨肉腫 TGF- β BMP

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は発生頻度が人口 100 万人あたり 2 人程度と希少がんに含まれるが、原発性悪性骨腫瘍の中では発生頻度が最も高いことが知られている。疾患特異的な遺伝子異常は同定されておらず、p53 遺伝子や Rb 遺伝子の異常との関連が指摘されているものの、ここ 20 年治療成績に大きな改善がみられない難治性悪性腫瘍であり、再発と肺転移が特に問題である。希少がんは新規治療法の開発が十分でない傾向があり、骨肉腫においても再発・肺転移を抑制する新たな治療標的の同定が望まれている。

我々は、2004 年に食道扁平上皮癌に高発現する遺伝子として *CD109* を同定して以降、*CD109* が種々の悪性腫瘍に高発現する「がん関連タンパク質」であることを継続して示してきた。個体レベルの解析として、*CD109* ノックアウトマウスを作出・解析したところ、骨粗鬆症様の骨表現型が認められるとともに、野生型マウスの骨芽細胞で *CD109* が発現していることが明らかとなった。加えて、ヒト骨肉腫由来細胞株において *CD109* が高発現し、*CD109* のノックダウンにより細胞の移動能が低下するという予備的データも得られた。

以上の状況から、骨肉腫由来の細胞株およびヒト骨肉腫組織を研究材料として用いた解析を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、がん関連タンパク質 *CD109* が腫瘍の発症・進展にどのように関与するのかを解明するとともに、*CD109* が抗体医薬の新規治療標的分子となる可能性を検討することを目的とする。

すなわち、ヒト病理検体を用いた組織学的検討や、ヒト骨肉腫細胞株を用いた細胞生物学的解析を行うとともに、学外のグループとの共同研究により抗 *CD109* モノクローナル抗体を作製し、得られた候補の中から、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を持つ抗体の探索を行う。また、有望な抗体が得られた場合には、骨肉腫マウスモデルに投与することで、抗体医薬としての評価を行うことを目指す。

3. 研究の方法

- (1) 骨肉腫における *CD109* の役割を検討するため、ヒト骨肉腫組織を用いた解析を行う。具体的には、ヒトの骨肉腫組織を用いて抗 *CD109* 抗体による免疫染色を行い、予後との相関について統計学的に解析し、骨肉腫における *CD109* の生物学的意義について検討する。
- (2) 複数の骨肉腫由来細胞株を用いて、RNA 干渉法により *CD109* をノックダウンした場合に、細胞の増殖能・移動能が低下するかどうかを、位相差顕微鏡を用いて解析する。
種々の癌腫において *CD109* は TGF- β シグナルを制御することが知られており、骨肉腫においては TGF- β シグナルが増悪因子であることから、骨肉腫における TGF- β シグナルと *CD109* 発現の関連をウエスタンブロッティングで解析するとともに、TGF- β シグナル以外のシグナル経路についても検討を加える。
- (3) (1)および(2)における結果を踏まえ、治療標的としての *CD109* の有用性について検討する。共同研究により抗 *CD109* モノクローナル抗体を作製し、*CD109* に対する感度・特異度の観点からスクリーニングを行うとともに、培養細胞を用いて ADCC 活性を持つ抗体を探索する。有望な抗体が得られた場合には、ヒト骨肉腫由来細胞株を移植した免疫不全マウス

に当該抗体投与することで、その効果を評価する。

4. 研究成果

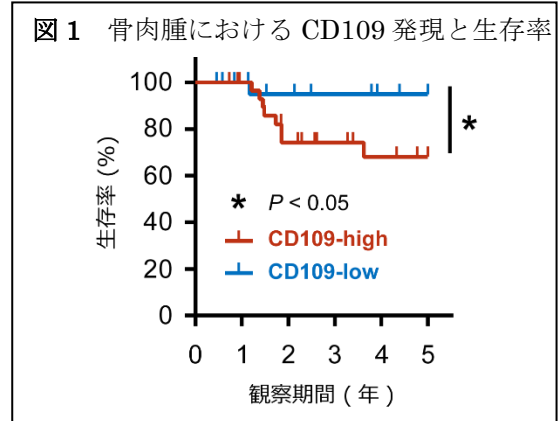
- (1) 55 症例の骨肉腫組織を用いて下記の評価基準による半定量的免疫組織化学的解析(IHC)を行った。

【染色範囲(PS)は3段階とした】

- 0: 腫瘍細胞の 1/3 未満が陽性
- 1: 腫瘍細胞の 1/3 以上, 2/3 未満が陽性
- 2: 腫瘍細胞の 2/3 以上が陽性

【染色強度(IS)は4段階とした】

- 0: 陰性
- 1: 弱陽性
- 2: 中等度陽性
- 3: 強陽性



PS + IS により合計スコア(TS)を算出し、TS が 0~3 の症例を CD109-low, 4 または 5 の症例を CD109-high とし、Kaplan-Meier 法により解析した(図 1). Log-rank 検定により、CD109-high 群では有意に生命予後不良であった。

- (2) ヒト骨肉腫由来細胞株 MG-63 を用いて、WST-1 assay により増殖能を検討したが、コントロール群と CD109 ノックダウン群とで有意な差は認められなかった。一方、*in vitro* wound healing assay を行ったところ、CD109 ノックダウン群に比べ、コントロール群で有意に細胞移動能が亢進していた(図 2)。

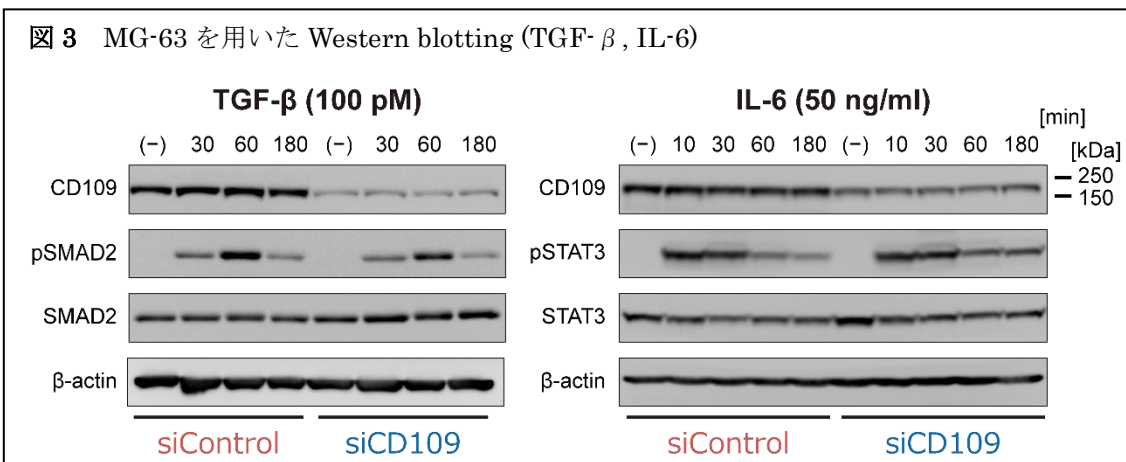
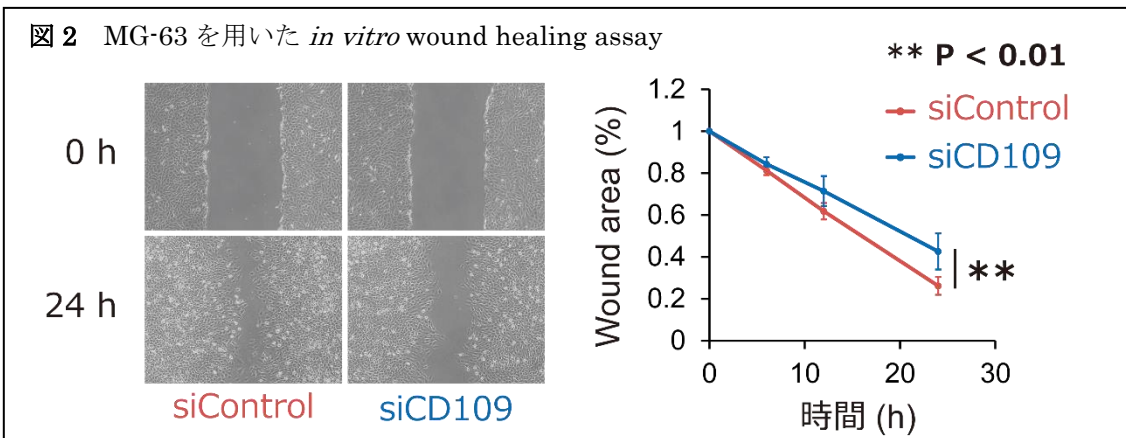
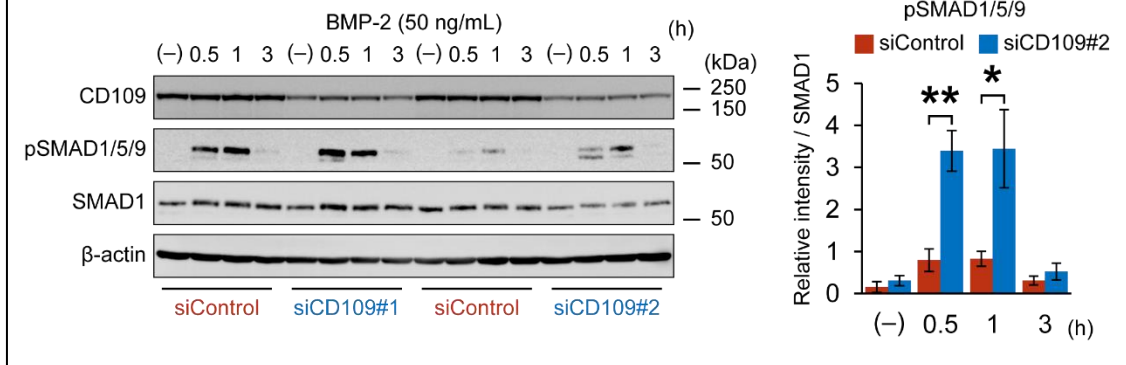


図4 MG-63 を用いた Western blotting (BMP-2)



続いて、MG-63 を用いて TGF- β 刺激あるいは IL-6 刺激を行い、ウエスタンブロッティングにより解析を行ったが、いずれにおいても、コントロール群と CD109 ノックダウン群の間で、SMAD2 あるいは STAT3 のリン酸化に明らかな差は認められなかった(図 3)。

さらなる検討を行うため、TGF- β スーパーファミリーである BMP に着目し、BMP-2 刺激下で同様にウエスタンブロッティングにより解析したところ、コントロール群に比べて CD109 ノックダウン群では、SMAD1/5/9 のリン酸化が有意に増強することが明らかとなった(図 4)。

- (3) 共同研究により抗 CD109 モノクローナル抗体を作製し、ELISA により CD109 との結合能を測定したところ、十分な感度を有する候補抗体が 6 種得られ、そのうち 2 種の抗体は特異性が高かった。しかし、得られた 2 種の抗体について市販の抗体と比較したところ、いずれも市販の抗体とほぼ同等の性能しか有しておらず、その後の ADCC 等の評価段階には進むことができなかった。さらなる抗体の開発が必要であると考えられた。

以上をまとめると、CD109 は骨肉腫細胞においては癌腫の場合とは異なり、TGF- β シグナルではなく BMP シグナル、すなわち BMP-2 による SMAD1/5/9 のリン酸化を負に制御することで、腫瘍の進展・増悪に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Iida T, Mizutani Y, Esaki N, Ponik SM, Burkel BM, Weng L, Kuwata K, Masamune A, Ishihara S, Haga H, Kataoka K, Mii S, Shiraki Y, Ishikawa T, Ohno E, Kawashima H, Hirooka Y, Fujishiro M, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 41
2. 論文標題 Pharmacologic conversion of cancer-associated fibroblasts from a protumor phenotype to an antitumor phenotype improves the sensitivity of pancreatic cancer to chemotherapeutics.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene.	6. 最初と最後の頁 2764-2777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02288-9	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 該当する
1. 著者名 Miyai Y, Sugiyama D, Hase T, Asai N, Taki T, Nishida K, Fukui T, Chen-Yoshikawa TF, Kobayashi H, Mii S, Shiraki Y, Hasegawa Y, Nishikawa H, Ando Y, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 5
2. 論文標題 Meflin-positive cancer-associated fibroblasts enhance tumor response to immune checkpoint blockade.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance.	6. 最初と最後の頁 e202101230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101230	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 Ichihara R, Shiraki Y, Mizutani Y, Iida T, Miyai Y, Esaki N, Kato A, Mii S, Ando R, Hayashi M, Takami H, Fujii T, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 72
2. 論文標題 Matrix remodeling-associated protein 8 is a marker of a subset of cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 161-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13198	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 Hara A, Kato K, Ishihara T, Kobayashi H, Asai N, Mii S, Shiraki Y, Miyai Y, Ando R, Mizutani Y, Iida T, Takefuji M, Murohara T, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 26
2. 論文標題 Meflin defines mesenchymal stem cells and/or their early progenitors with multilineage differentiation capacity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 495-512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12855	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 Nakamichi E, Sakakura H, Mii S, Yamamoto N, Hibi H, Asai M, Takahashi M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Detection of serum/salivary exosomal Alix in patients with oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Dis.	6. 最初と最後の頁 439-447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13565	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 Kobayashi H, Gieniec KA, Wright JA, Wang T, Asai N, Mizutani Y, Iida T, Ando R, Suzuki N, Lannagan TR, Ng JQ, Hara A, Shiraki Y, Mii S (14番目/36人中), ..., Enomoto A, Takahashi M, Worthley DL, Woods SL.	4. 巻 160
2. 論文標題 The balance of stromal BMP signaling mediated by GREM1 and ISLR drives colorectal carcinogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology.	6. 最初と最後の頁 1224-1239.e30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.11.011	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 該当する

1. 著者名 Taki T, Shiraki Y, Enomoto A, Weng L, Chen C, Asai N, Murakumo Y, Yokoi K, Takahashi M, Mii S.	4. 巻 111
2. 論文標題 CD109 regulates in vivo tumor invasion in lung adenocarcinoma through TGF- signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 4616-4628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14673	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 Chen C, Enomoto A, Weng L, Taki T, Shiraki Y, Mii S, Ichihara R, Kanda M, Koike M, Kodera Y, Takahashi M.	4. 巻 111
2. 論文標題 Complex roles of the actin-binding protein Girdin/GIV in DNA damage-induced apoptosis of cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 4303-4317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14637	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 Esaki N, Enomoto A, Takagishi M, Mizutani Y, Iida T, Ushida K, Shiraki Y, Mii S, Takahashi M.	4. 巻 532
2. 論文標題 The Dap1e-CK1 complex regulates Dvl2 phosphorylation and canonical Wnt signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 406-413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.066	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 Ohara Y, Enomoto A, Tsuyuki Y, Sato K, Iida T, Kobayashi H, Mizutani Y, Miyai Y, Hara A, Mii S, Suzuki J, Yamashita K, Ito F, Motooka Y, Misawa N, Fukui T, Kawaguchi K, Yokoi K, Toyokuni S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Connective tissue growth factor produced by cancer-associated fibroblasts correlates with poor prognosis in epithelioid malignant pleural mesothelioma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 838-848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7669	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 Mii S, Enomoto A, Shiraki Y, Taki T, Murakumo Y, Takahashi M.	4. 巻 69
2. 論文標題 CD109: a multifunctional GPI-anchored protein with key roles in tumor progression and physiological homeostasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 249-259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12798	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 Mizutani Y, Kobayashi H, Iida T, Asai, Masamune A, Hara A, Esaki N, Ushida K, Mii S, Shiraki Y, Ando, Weng, Ishihara, Ponik SM, Conklin MW, Haga H, Nagasaka A, Miyata T, Matsuyama M, Kobayashi T, Fujii T, Yamada S, Yamaguchi J, Wang T, Woods SL, Worthley DL, Shimamura T, Fujishiro M, Hirooka Y, Enomoto A, Takahashi M.	4. 巻 79
2. 論文標題 Meflin-positive cancer-associated fibroblasts inhibit pancreatic carcinogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 5367-5381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-0454	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 該当する

1. 著者名 Hirabayashi S, Hayashi M, Nakayama G, Mii S, Hattori N, Tanabe H, Kanda M, Tanaka C, Kobayashi D, Yamada S, Koike M, Fujiwara M, Takahashi M, Kodera Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 The significance of molecular biomarkers on clinical survival outcome differs depending on colon cancer sidedness.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 201-211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13941	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 三井 伸二, 白木 之浩, 滝 哲郎, 榎本 篤, 高橋 雅英
2. 発表標題 悪性腫瘍におけるGPIアンカー型膜タンパク質CD109の発現と臨床的意義
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝 哲郎, 三井 伸二, 白木 之浩, 榎本 篤, 高橋 雅英
2. 発表標題 肺腺癌における癌関連タンパク質CD109の機能解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三井 伸二, 滝 哲郎, 白木 之浩, 榎本 篤, 高橋 雅英
2. 発表標題 CD109 regulates in vivo tumor invasion in lung adenocarcinoma through TGF- signaling
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三井 伸二, 白木 之浩, 下山 芳江, 榎本 篤, 高橋 雅英
2. 発表標題 骨組織および骨肉腫におけるGPIアンカー型膜タンパク質CD109の発現とその意義
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝 哲郎, 三井 伸二, 白木 之浩, 榎本 篤, 高橋 雅英
2. 発表標題 肺腺癌における癌関連タンパク質CD109の機能解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三井 伸二, 白木 之浩, 滝 哲郎, 榎本 篤, 高橋 雅英
2. 発表標題 骨肉腫におけるGPIアンカー型膜タンパク質CD109の発現とその意義
3. 学会等名 第16回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝 哲郎, 三井 伸二, 白木 之浩, 榎本 篤, 高橋 雅英
2. 発表標題 肺腺癌におけるGPIアンカー型膜タンパク質CD109の機能解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiji Nakamichi, Masato Asai, Hiroki Sakakura, Shinji Mii, Noriyuki Yamamoto, Hideharu Hibi, Masahide Takahashi
2. 発表標題 Exosome-associated protein Alix as a novel diagnostic marker for oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 American Society for Exosomes and Microvesicles 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

腫瘍病理学 分子病理学分野 https://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/
--

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	高橋 雅英 (Takahashi Masahide) (40183446)	藤田医科大学・その他部局等・教授 (33916)	

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
---------	---------