

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18401

研究課題名(和文) 脊索腫の骨破壊機序の解明と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms for bone destruction in chordoma.

研究代表者

佐藤 瑞仁 (SATO, Mizuto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70836759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脊索腫の骨破壊部の斜台検体を用いたマイクロCT撮影の結果、骨破壊部の骨は、骨内に複数の小孔を認め、その小孔周囲の骨密度は低かった。免疫染色では、骨の小孔内に腫瘍細胞を認め、その腫瘍細胞がCathepsin KやMMP-13などのタンパク分解酵素を発現していた。また、ヒト脊索腫細胞株を用いた細胞内小器官のpH測定では、担空胞細胞の小胞がリソソームに類似した酸性の細胞内小器官であることが確認された。以上より、腫瘍細胞自体がタンパク分解酵素と酸を分泌し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。さらに、MMP-13発現強度と脊索腫周囲の軟骨基質、軟骨基質と臨床経過との関連性を示唆する所見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊索腫は斜台や仙骨に生じる骨破壊性の腫瘍であり、あらゆる集学的治療を行っても根治することは困難な難治性疾患である。骨破壊によって生じる脳神経麻痺が患者の日常生活動作に大きく影響するため、骨破壊の機序を解明することは新規治療の開発には必須である。本研究では脊索腫腫瘍細胞がタンパク分解酵素を発現していること、およびヒト脊索腫細胞株の担空胞細胞内に多数の酸性顆粒の存在が確認された。以上のことから、腫瘍細胞自体が酸とタンパク分解酵素を分泌し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。今後、さらに症例数を蓄積し、骨破壊に直接的に寄与する機序を同定し、これらをターゲットとした新たな治療法の開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Although chordomas tend to grow slowly, patients develop severe symptoms such as cranial nerve palsies and brain stem compression, that make successful surgical treatment difficult, and become resistant to radiochemotherapy. In the present study, micro-CT scanning demonstrated that bone density was lower in the clivus with invaded chordoma, suggesting acidic microenvironment in chordoma. Histopathological analysis revealed that Cathepsin K and MMP-13 were expressed in chordoma cells. The expression of MMP-13 may be associated with the poor clinical course of the patients with chordoma. However, it was difficult to establish chordoma mouse model, because the growth speed of chordoma cells implanted into the calvaria and sacrum was slow. In vitro and in vivo analyses using human chordoma cells are indispensable. Further analyses should be conducted using human chordoma cells to evaluate tumor biology, including bone destruction.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脊索腫 骨破壊 破骨細胞 骨芽細胞 リモデリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊索腫は遺残脊索から発生する腫瘍で、腫瘍周囲の骨を破壊しながら局所浸潤するため、臨床的に悪性度の高い腫瘍である。斜台及び仙骨は好発部位であり、特に斜台部脊索腫において、周囲には外転神経をはじめとする様々な脳神経や内頸動脈などの重要な構造物が存在するため、手術難易度は高く外科的手術での完治は難しい。残存腫瘍に対しては重粒子線治療を含めた放射線治療が行われるが、効果は限定的であり[Takahashi S. Acta Neurochir (Wien). 2009]、再発は必至の難治性腫瘍である。確立した化学療法も存在せず、5年生存率は50%とされ[Sundaresan N. J Neurosurg. 1979]、新たな治療法の開発は急務である。患者の日常生活動作を最も損なう原因は海綿静脈洞周囲の骨破壊に伴う眼球運動障害や嚥下機能障害である。そのため、骨破壊メカニズムを解明することで、新たな治療戦略を提言できる可能性がある。一般的に溶骨型の転移性骨腫瘍や軟骨肉腫においては、破骨細胞により骨破壊が起こる[Mundy GR. Nat Rev Cancer. 2002; Jesse EO. J Orthop Res. 2014]。破骨細胞の骨破壊のメカニズムとしては、酸性環境を作り出すことによるリン酸カルシウムなどの無機質の溶解と、MMP-9やCathepsin Kなどのタンパク質分解酵素の分泌によるI型コラーゲンの分解が挙げられる[Yokota K. Jpn J Clin Immunol. 2017]。一方、脊索腫における骨破壊の機序は、過去に腫瘍細胞自身の分泌するMMP-1, 2, 9やCathepsin Kなどのタンパク質分解酵素の関与を報告したものがあがる[Naka T. Human pathol. 2008; Naka T. Histopathol. 2009]、未だ定説はなく、解明すべき学術的問いである。

2. 研究の目的

現在までに解明された脊索腫の骨破壊機序はなく、申請者は予備実験にて、破骨細胞以外の骨破壊機序が存在する可能性を確認している。本研究において、脊索腫における骨破壊の機序を解明し、それを標的とした新たな治療戦略を提言することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マイクロCT・X線位相トモグラフィー

申請者は、予備実験としてヒト脊索腫の浸潤した斜台を用いたマイクロCT撮影・三次元画像解析を行い、腫瘍浸潤部の骨構造・骨密度を評価した。腫瘍浸潤部の骨は、非腫瘍浸潤部の骨と比較して、骨内に多数の小孔を認め、その小孔の周囲の骨密度は低く、脊索腫において骨密度を低下させる酸性環境の存在が示唆された。しかし、現段階では予備実験として2例の検討しか行っていない。そこで本研究では、このマイクロCT撮影・三次元画像解析をさらに症例数を増やし実施することで、得られた所見の再現性を確認する。脊索腫は100万人当たり年間1例未満しか発症しない極めて稀な腫瘍であるが、申請者らのグループは国内外からの脊索腫の患者を治療する機会があり、新規の10例での解析を目標とする。

(2) 病理組織学的解析

腫瘍組織内における破骨細胞の存在を過去のヒト脊索腫標本50例で、TRAP染色および他の破骨細胞マーカーを用いて確認する。また骨基質の主成分であるI型コラーゲンを分解するタンパク質分解酵素の腫瘍細胞における発現を免疫染色にて評価する。申請者は、現時点までに、腫瘍細胞におけるCathepsin K、MMP-13の発現を確認しているが、本研究ではそれ以外のタンパク質分解酵素(MMP-1, 2, 8, 9など)の発現も評価する。さらに申請者が、予備実験で見出した脊索腫における酸性環境を作り出す要因となりうる、プロトンポンプV-ATPaseの腫瘍組織での発現を解析する。

(3) in vitroでの検討

脊索腫の腫瘍細胞は多様性が高いことが特徴であり、細胞内小胞をもたない紡錘形細胞と細胞質内に小胞をもつ担空胞細胞が存在する。主に増殖するのは紡錘形細胞であり、担空胞細胞とその細胞内小胞の機能は知られていない。本研究ではマイクロCTにおける解析から、酸の関与を疑ったため、脊索腫腫瘍細胞が酸を分泌している可能性を追究する。まず、pHインジケータを用いて紡錘形細胞、担空胞細胞を含む脊索腫細胞株(JHC7細胞)の細胞質のpH測定を行う。次に、細胞内小器官内のpHを測定するために、JHC7細胞にリソセンサーを用いた解析を行う。担空胞細胞の小胞がリソソームに類似した酸性の細胞内小器官であり、脊索腫内の酸性環境を生み出す元である可能性を検討する。さらに、担空胞細胞内の小胞は、非常に多様性があり、それぞれの小胞によって挙動が異なる可能性がある。そこで生細胞イメージングによるタイムラプス撮影を行うことで、細胞内における小胞の挙動と小胞内のpHの関連を解析する。

(4) 動物モデルでの検証

脊索腫患者から樹立した初代培養細胞及び、既存の脊索腫細胞株のJHC7細胞を、NOD/SCIDマウスの頭蓋冠へ移植する。その後、6カ月までマイクロCTにより骨破壊を検証するとともに、1カ月ごとに病理標本を作製し、移植細胞の生着、及び頭蓋冠の骨組織への浸潤を観察する。進行性の骨破壊を呈した細胞株には、ffLuc(Venus 蛍光タンパク質とLuc2 ホタルルシフェラーゼの融合遺伝子)発現レンチウイルスベクターを感染させ、セルソーターにより、ffLucが安定高発現する細胞株を単離する。その後同様にモデルマウスを作製し、1~3により得られた骨破壊機序の

仮説に基づく阻害薬(現段階ではタンパク質分解酵素阻害薬や、抗 V-ATPase 抗体が考えられる)を投与し、その後 IVIS 生体イメージングで腫瘍の増減を観察し、治療効果を検討する。

4. 研究成果

マイクロ CT 撮影 5 例の結果、脊索腫による骨破壊部の骨は、非病変部位の骨と比較して、骨内に複数の小孔を認め、やはりその小孔周囲の骨密度は低く、脊索腫において何らかの酸性環境が存在することが推察された。

免疫染色では、骨の小孔内に腫瘍細胞を認め、その腫瘍細胞が Cathepsin K や MMP-13 などのタンパク分解酵素を発現していることが明らかとなった。また、ヒト脊索腫細胞株を用いた *in vitro* における細胞内小器官の pH 測定では、chordoma に特徴的な担空胞細胞の小胞がリソソームに類似した酸性の細胞内小器官であることが確認された。以上のことから、腫瘍細胞自体がタンパク分解酵素と酸を分泌し、骨破壊に関与している可能性が示唆された。さらに、ヒト脊索腫検体における MMP-13 発現強度と脊索腫周囲の軟骨基質との関連性、軟骨基質と臨床経過との関連性を示唆する所見を得た。

脊索腫患者から樹立した初代培養細胞及び、既存の脊索腫細胞株の JHC7 細胞を、NOD/SCID マウスの頭蓋冠へ移植した。しかし、非常に増殖の遅い両細胞の頭蓋冠への生着率は低く、安定したモデル樹立は困難であった。そのため仙骨などへの移植や、マトリゲル等へ包埋して移植する方法も検討したが、やはり生着率は低く課題は残った。

今後、さらに骨破壊に直接的に寄与する機構を同定し、これらの機序をターゲットとした新たな治療法の開発につなげたい。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yumiko Oishi, Tamura Ryota, Takahashi Satoshi, Morimoto Yukina, Sato Mizuto, Horikoshi Tomo, Hassaan Shady, Yoshida Kazunari, Toda Masahiro	4. 巻 134
2. 論文標題 A Comparative Study Between Traditional Microscopic Surgeries and Endoscopic Endonasal Surgery for Skull Base Chordomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e1099 ~ e1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.11.113	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 Morimoto Y, Tamura R, Ohara K, Kosugi K, Oishi Y, Kuranari Y, Yoshida K, Toda M.	4. 巻 Aug;144(1)
2. 論文標題 Prognostic significance of VEGF receptors expression on the tumor cells in skull base chordoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurooncol.	6. 最初と最後の頁 65-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03221-z	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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