

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592197

研究課題名（和文） 骨肉腫におけるカートデュースン遺伝子の発現増強と増殖進展機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the elevated expression of cartducin gene in osteosarcoma and the mechanisms of tumor development

研究代表者

前田 隆史（MAEDA TAKASHI）

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：80324789

研究成果の概要（和文）：骨肉腫細胞におけるカートデュースン遺伝子および蛋白の発現を検討したところ、正常骨芽細胞では発現の見られないカートデュースンが、骨肉腫細胞では強く発現していることが明らかになった。続いて骨肉腫細胞に対するカートデュースンの作用を解析した結果、カートデュースンには骨肉腫細胞に対する直接的な増殖促進作用があることが判明した。一方、腫瘍細胞の遊走や浸潤には影響を及ぼさないことも明らかになった。さらに、カートデュースンは骨肉腫細胞の ERK1/2 キナーゼ経路を活性化することが分かった。以上の結果から、カートデュースンは ERK1/2 キナーゼシグナル伝達経路を介して骨肉腫の増殖進展に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Cartducin is expressed in human osteosarcomas. The mRNA level of Cartducin was increased in murine osteosarcoma cell lines compared with its level in normal murine osteoblastic cells. The protein level of Cartducin was also increased in these osteosarcoma cell lines. Stimulation of these osteosarcoma cells by Cartducin promoted tumor cell growth but not migration *in vitro*. Further, Cartducin stimulation led to the activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in these osteosarcoma cell lines. Our results suggest that Cartducin expression may play a role in osteosarcoma tumor growth associated with activation of the ERK1/2 signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学（含歯科放射線学）

キーワード：カートデュースン、骨肉腫細胞、増殖、遊走、浸潤、ERK1/2

1. 研究開始当初の背景

(1) 多分化能をもつマウス未分化間葉系細胞株において、トランスフォーミング成長因

子(TGF-beta)によって発現が誘導される新規遺伝子として代表者らがクローニングした遺伝子は246アミノ酸からなる分子量26-kDaの機能未知の分泌蛋白をコードし、代表

者らはその蛋白を、「軟骨から産生される分泌蛋白」という意味で“Cartducin”（カートデューシン）と命名していた。カートデューシン遺伝子はマウス胎仔では将来の脊椎骨、手指骨相当部の軟骨原基、メッケル軟骨などで強く発現しており、骨格発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆されていた。

(2) カートデューシンは、メタボリックシンドロームとの深い関わりを指摘されていたアディポネクチン（脂肪組織から分泌される分子量 30-kDa のホルモン）と構造上高いホモロジーをもっており、代表者らが、骨格発生過程におけるカートデューシンの生理作用について研究を進めた結果、カートデューシンは軟骨前駆細胞および軟骨細胞の増殖を促進することにより、軟骨内骨化および骨の成長を調節する新たな成長因子である可能性が明らかになっていた。

(3) カートデューシンには、このような内軟骨性骨形成促進因子という生理作用に加え、単球から産生され抗炎症作用があること、血清中に存在し脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌を促進する作用があること、血管が傷害を受けると傷害血管壁に発現が誘導されることなどが国外の研究者らによって報告されていた。カートデューシンは、軟骨細胞から産生・分泌される内軟骨性骨形成促進因子としてだけでなく、種々の生理作用を持つ新たな多機能因子として、その重要性が国外を中心に注目されていた。

(4) カートデューシン遺伝子は、小頭・下顎低形成などを主徴とする Cri-de-chat 症候群の染色体欠失領域に含まれるヒト第 5 染色体の短腕 13.1-13.2 領域 (5p13.1-13.2) に位置しており、同領域はまた、骨肉腫において染色体 DNA の異常増幅が指摘されている 5p13-14 にも含まれており骨系腫瘍との関わりが示唆されていた。実際に、正常骨芽細胞ではほとんど発現の見られないカートデューシン遺伝子が、骨肉腫細胞では強く発現していることを代表者らは予備実験で確認していた。しかしながら、骨肉腫におけるカートデューシン遺伝子の発現増強と、その病態学的な意義については不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 骨肉腫細胞から産生・分泌されたカートデューシンの骨肉腫細胞自身に対する作用、(2) カートデューシンに応答する骨肉腫細胞内シグナル伝達経路、(3)

産生・分泌されたカートデューシンの骨肉腫内の血管系細胞に対する作用、を明らかにして骨肉腫の増殖進展機構における新たな多機能因子であるカートデューシンの役割を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 試薬：マウス組換えカートデューシン蛋白は、大腸菌株 BL21(DE3)を用いて N 末端にヒスチジンを付加した蛋白として作製した。抗マウスカートデューシン抗体は R&D 社から購入した。抗 ERK1/2 抗体は Sigma-Aldrich 社から購入した。抗リン酸化型 ERK1/2 抗体は Cell Signaling 社から購入した。MEK1/2 の阻害剤である U0126 は Calbiochem 社から購入した。

(2) 細胞株および細胞培養：マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1、マウス骨肉腫細胞株 NHOS および LM8 は理化学研究所より供与された。マウス血管平滑筋細胞株 p53LMAC はヒューマンサイエンス研究資源バンクより供与された。MC3T3-E1 細胞は 10%FCS を含む α MEM 培地で 37 °C で培養した。NHOS 細胞は 10%FCS を含む RPMI1640 培地で培養した。LM8 細胞は 10%FCS を含む MEM 培地で 37 °C で培養した。p53LMAC 細胞は 10%FCS を含む DMEM 培地で 37 °C で培養した。シグナル伝達経路の活性化を調べる実験では、NHOS および LM8 細胞を無血清培地で 24 時間培養した後、5 μ g/ml のカートデューシン蛋白を添加し、5-60 分後に細胞を溶解して蛋白を回収した。ERK1/2 阻害剤を用いた実験では、カートデューシン蛋白を添加する 1 時間前に各細胞を阻害剤で前処理した。

(3) RT-PCR：各細胞より QIAGEN 社の Rneasy キットを用いて total RNA を抽出した。2 μ g の total RNA を QIAGEN 社の Omniscript キットを用いて逆転写して cDNA を合成した。カートデューシン特異的なプライマーを用いて RT-PCR を 27 サイクル行った。

(4) ウェスタンブロット：プロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤を含む細胞溶解バッファーで蛋白を回収した。SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写し、室温で 30 分ブロッキングした。上記の抗体を 1 次抗体として用いて 4 °C で一晚反応させた。シグナルの検出はアルカリフォスファターゼ結合 2 次抗体を用いて行った。

(5) DNA 合成能の測定：増殖期にある各細胞を飢餓培地で 24 時間培養後、各濃度のカートデューシン蛋白を添加しさらに 24 時間培養した。培養終了 3 時間前に BrdU を添加し、

細胞への取り込みを測定した。

(6) 遊走能の測定：ポイデンチャンバー法を用いて行った。各細胞の浮遊液を上部チャンバーへ満たして2時間後、各濃度のカートデューシン蛋白を含む無血清培地を下部チャンバーに加え5時間培養した。8- μ mのポアを通過して下部チャンバーへ移動した細胞の数をエタノールで固定後にヘマトキシリンで染色してカウントした。

(7) 統計解析：Student's *t*-testを用いて、 $P < 0.05$ を有意とみなした。

4. 研究成果

(1) 本研究において、骨肉腫の増殖進展機構におけるカートデューシンの役割を解明するために、マウス骨肉腫細胞株 NHOS および LM8 をモデルとして使用した。これらはマウスの骨肉腫から樹立された細胞株である。一方、対照となる正常骨芽細胞として、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を使用した。

(2) はじめに、これらの細胞株におけるカートデューシンの発現を遺伝子レベルおよび蛋白質レベルで解析した。マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 ではカートデューシンの発現が両レベルでほとんどみられなかったのに対して、マウス骨肉腫細胞株 NHOS および LM8 ではカートデューシンの発現が両レベルで強くみられた (図1)。

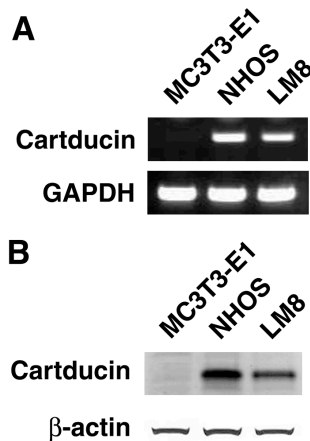


図1 マウス骨肉腫細胞におけるカートデューシンの発現：(A) RT-PCR法による解析 (B) ウェスタンブロット法による解析

したがって、骨肉腫細胞においてカートデューシン遺伝子および蛋白の発現増強が明らかになった。

(3) 骨肉腫細胞におけるカートデューシンの

発現増強の病態学的役割を明らかにするため、NHOS および LM8 細胞の増殖に対するカートデューシン蛋白の影響を解析した。組換えカートデューシン蛋白の刺激はこれらの骨肉腫細胞の DNA 合成を濃度依存的に促進した (図2)。

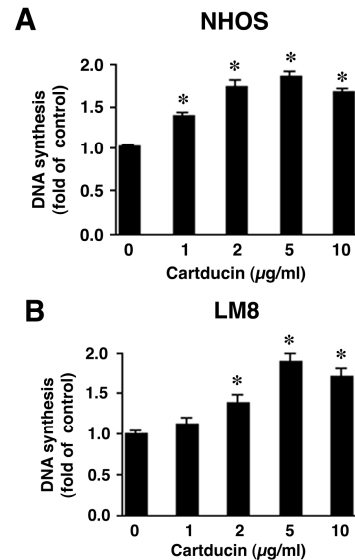


図2 カートデューシン蛋白のマウス骨肉腫細胞の増殖に対する影響：(A) カートデューシン蛋白は濃度依存的に NHOS 細胞の DNA 合成を約 1.8 倍に促進した。(B) カートデューシン蛋白は濃度依存的に LM8 細胞の DNA 合成を約 1.9 倍に促進した。* $P < 0.05$

つづいて、NHOS および LM8 細胞の遊走、浸潤に対するカートデューシン蛋白の影響を解析した。予想に反して、組換えカートデューシン蛋白の刺激はこれらの骨肉腫細胞の遊走、浸潤には影響を与えなかった。これらの結果から、骨肉腫細胞におけるカートデューシンの発現増強は、骨肉腫の腫瘍増大に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(4) カートデューシンの受容体は未だ同定されておらず、また腫瘍細胞内のカートデューシン刺激に反応するシグナル伝達経路も不明である。そこで、カートデューシンが骨肉腫細胞の増殖を促進させるメカニズムを解明するためにカートデューシン刺激に反応する骨肉腫細胞内のシグナル伝達経路を解析した。細胞増殖因子に反応することが知られている3種類の MAP キナーゼ経路および PI3K/Akt キナーゼ経路についてマウス骨肉腫細胞株 NHOS および LM8 を用いて調べたところ、MAP キナーゼ経路の一つである ERK1/2 キナーゼ経路がカートデューシン

の刺激に応答して活性化された (図3)。一方、JNK1/2, p38 MAPK および Akt は活性化されなかった。

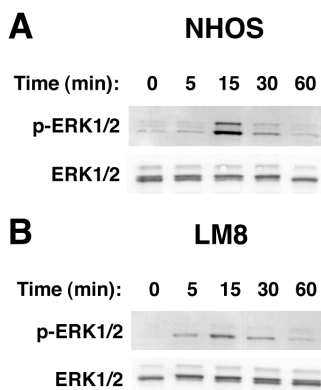


図3 マウス骨肉腫細胞においてカートデューシン蛋白の刺激に応答して活性化される細胞内シグナル伝達経路：ウェスタンブロット法により、5 $\mu\text{g/ml}$ のカートデューシンの刺激に応答して、NHOS (A) および LM8 (B) 細胞内で ERK1/2 がリン酸化され活性化された。

実際、ERK1/2 キナーゼ経路の阻害剤である U0126 で前処理すると、NHOS および LM8 細胞をカートデューシンで刺激しても DNA 合成は促進されなかった。これらの結果から、カートデューシンによる骨肉腫細胞の増殖促進作用には細胞内 ERK1/2 キナーゼ経路が必須であることが明らかになった。

(5) カートデューシンが血管内皮細胞の増殖と遊走を促進することは知られていたが、血管平滑筋細胞に対する作用は不明であった。そこで、マウス血管平滑筋細胞株 p53LMAC の増殖に対するカートデューシン蛋白の影響を解析した。組換えカートデューシン蛋白の刺激は p53LMAC 細胞の DNA 合成を濃度依存的に促進した (図4)。しかしながら、p53LMAC 細胞の遊走には影響を与えなかった。これらの結果から、カートデューシンは血管系の細胞に対して血管新生を促進する方向に作用することが判明した。

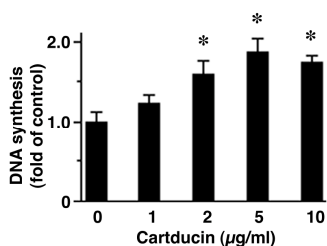


図4 カートデューシン蛋白のマウス血管平滑筋細胞の増殖に対する影響：カートデューシン蛋白は濃度依存的に p53LMAC 細胞の DNA 合成を約 1.9 倍に促進した。* $P < 0.05$

(6) 本研究の結果から、骨肉腫におけるカートデューシンの発現増強は、直接的に骨肉腫内の腫瘍細胞の増殖を促進する作用と、血管新生を介して間接的に腫瘍細胞の増殖を促進する作用の両メカニズムによって骨肉腫の増大進展に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

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8件)

① Yokohama-Tamaki T, Maeda T and Shibata S. Functional analysis of CTRP3/cartducin to Meckel's cartilage and developing condylar cartilage in fetal mouse mandible. *J. Anat.*, 218: 517-533, 2011. (査読有)

② Maeda T and Wakisaka S. CTRP3/cartducin is induced by transforming growth factor-beta1 and promotes vascular smooth muscle cell proliferation. *Cell Biol. Int.*, 34: 261-266, 2010. (査読有)

③ Akiyama H, Furukawa S, Wakisaka S and Maeda T. Elevated expression of CTRP3/cartducin contributes to promotion of osteosarcoma cell proliferation. *Oncol. Rep.*, 21: 1477-1481, 2009. (査読有)

④ Yamazaki H, Inoue T, Yoshida K, Kotsuma T, Yoshioka Y, Koizumi M, Furukawa S, Kakimoto N, Shimizutani K and Nishimura T. Assessment of influence of smoking, drinking, leukoplakia and dental irritation on local control of early oral tongue carcinoma treated with brachytherapy: age and dental factors are potential prognostic factors. *Tumori*, 95: 461-466, 2009. (査読有)

⑤ Uchiyama Y, Murakami S, Kakimoto N, Nakatani A, Kishino M, Hamada Y and Furukawa S. Diagnostic imaging findings for mandibular metastasis from gastric adenocarcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 107: 49-53, 2009. (査読有)

⑥ Shimamoto H, Kakimoto N, Fujino K, Hamada S, Shimosegawa E, Murakami S, Furukawa S and Hatakezawa J. Metallic artifacts caused by dental metal prostheses on

caused by dental metal prostheses on PET images: a PET/CT phantom study using different PET/CT scanners. *Ann. Nucl. Med.*, 23: 443-449, 2009. (査読有)

⑦ Abe M, Maeda T and Wakisaka S. Retinoic acid affects craniofacial patterning by changing Fgf8 expression in the pharyngeal ectoderm. *Dev. Growth Differ.*, 50: 717-729, 2008. (査読有)

⑧ Shimamoto S, Tatsumi M, Kakimoto N, Hamada S, Shimosegawa E, Murakami S, Furukawa S and Hatakezawa J. (18)F-FDG accumulation in the oral cavity is associated with periodontal disease and apical periodontitis: an initial demonstration on PET/CT. *Ann. Nucl. Med.*, 22: 587-593, 2008. (査読有)

[学会発表] (計3件)

① Yokohama-Tamaki T, Maeda T and Shibata S : Function of cartducin in mandibular condylar cartilage formation, 2nd Meeting of International Association for Dental Research (IADR) Pan Asian Pacific Federation (PAPF), Wuhan, China, September 22-24, 2009.

② 前田隆史、脇坂 聡 : 骨肉腫細胞における C1qTNF ファミリー分泌蛋白 CTRP3/cartducin の発現増強と増殖促進作用、第51回歯科基礎医学会(新潟)、2009年9月11日

③ 田巻玉器、前田隆史、柴田俊一 : マウス下顎頭軟骨の発生過程における Cartducin の発現と機能解析、第50回歯科基礎医学会(東京)、2008年9月24日

[その他]

ホームページ等

<http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/list.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 隆史 (MAEDA TAKASHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号 : 80324789

(2)研究分担者

古川 惣平 (FURUKAWA SOUHEI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号 : 80173524