

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591919
 研究課題名（和文）骨軟部肉腫幹細胞をターゲットとした分子標的治療法開発研究
 研究課題名（英文）Molecular target therapy for musculoskeletal sarcoma-initiating cells

研究代表者
 瀬戸口啓夫（SETOGUCHI TAKAO）
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任准教授
 研究者番号：40423727

研究成果の概要（和文）：

横紋筋肉腫の治療を目指してヒト横紋筋肉腫細胞株から横紋筋肉腫細胞において Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) 陽性細胞ががん幹細胞様の性質を持つ Rhabdomyosarcoma-initiating cells (RIC)であることを見だし、解析を行った。FGFR3 陽性 RIC の維持には bFGF が必須で EGF は RIC の増殖を誘導することを明らかとした。また骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの腫瘍増殖・腫瘍転移における機能解析を行った結果、Hedgehog シグナルは骨肉腫・横紋筋肉腫の増殖を誘導しており、分子標的治療ターゲットとなることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Rhabdomyosarcoma cell lines included small populations of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)-positive cells. FGFR3-positive KYM-1 and RD cells were more strongly tumorigenic than FGFR3-negative cells. Our findings suggest that rhabdomyosarcoma cell lines include a minor subpopulation of FGFR3-positive sarcoma-initiating cells, which can be maintained indefinitely in culture and which is crucial for their malignancy. In addition, We found that inhibition of Hedgehog pathway prevents osteosarcoma and rhabdomyosarcoma growth. Our findings suggest that inhibition of Hedgehog pathway may represent an effective therapeutic approach for patients with osteosarcoma and rhabdomyosarcoma.

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：7305-2

キーワード：骨肉腫、横紋筋肉腫、腫瘍幹細胞、Hedgehog, Sarcoma-initiating cell

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、腫瘍の再発や転移のメカニ

ズムの一端を担っていることが示唆されており、がん幹細胞を標的とした治療法の開発は不可欠である。がん幹細胞を標的とした治療の確立にはがん幹細胞の単離精製が必要であるため、我々は骨軟部悪性腫瘍細胞において、腫瘍幹細胞の同定と機能解析を行った。

2. 研究の目的

横紋筋肉腫細胞において Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)陽性細胞ががん幹細胞様の性質を持つことを見いだした。そのため、その維持・増殖機構の研究を行い、腫瘍幹細胞に対する分子標的治療の研究を行った。

一方で Hedgehog シグナルは正常な幹細胞やがん幹細胞の維持・増殖に関与していることが報告されているので骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの細胞増殖・転移に関する機能解析を行った。

3. 研究の方法

骨軟部肉腫細胞株を表面マーカーを用いて腫瘍形成能力が高い FGFR3 陽性 Sarcoma-initiating cell の分離方法を開発し、遺伝子発現や Sarcoma-initiating cell の維持・増殖に関与する因子を検討した。また骨軟部肉腫における Hedgehog シグナルの機能を調べるために骨軟部肉腫細胞での Hedgehog シグナル関連遺伝子の発現や機能をノックダウンや強制発現により検討を行った。

4. 研究成果

ヒト横紋筋肉腫細胞株である KYM-1 と RD から FGFR3 陽性で腫瘍形成能力が有意に高い Rhabdomyosarcoma-initiating cells (RICs)の分離を可能とした。驚いたことに

この FGFR3 陽性の RICs は 1 個の細胞をヌードマウスの皮下に移植した際にも腫瘍形成能力を示した。また RICs は定量的 PCR で未分化細胞マーカーを高発現しており、幹細胞様の性質を持っていることが明らかとなった。また bFGF は RICs の維持・増殖に必須の因子であった。一方 CNTF には RICs を減少する作用があった。

骨肉腫や横紋筋肉腫などのヒト骨軟部腫瘍の細胞株・患者腫瘍組織において Hedgehog 関連遺伝子が高発現していることを見いだした。また luciferase assay にて Hedgehog 下流の転写因子である GLI の転写が骨肉腫で亢進していることを見出した。薬剤や RNAi を用いて Hedgehog シグナルを阻害すると横紋筋肉腫および骨肉腫の増殖が *in vitro*, *in vivo* において抑制された。Hedgehog シグナル下流の転写因子である GLI2 を骨軟部肉腫の起源細胞のひとつであると考えられている間葉系幹細胞で強制発現させると間葉系幹細胞の増殖が促進した。これらの結果より、Hedgehog シグナルは骨軟部肉腫の増殖・腫瘍化に関与していることが示唆された。また、Hedgehog シグナルをノックダウンすることで骨肉腫細胞の浸潤・移動能が低下した。逆に Hedgehog シグナルを強制発現させると間葉系幹細胞の浸潤・移動能が更新した。さらに、Hedgehog シグナルをノックダウンした骨肉腫細胞を移植したマウスでは肺転移巣が減少した。現在、Hedgehog シグナルをノックダウンもしくは強制発現することで骨軟部肉腫における Sarcoma-initiating cell の維持・増殖・転移への機能解析を行っている。また、低分子化合物による Hedgehog シグナル制御による Sarcoma-initiating cell の維持・増殖への制御機構の解析を行っている。

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 Role of GOLPH3 and GOLPH3L in the proliferation of human rhabdomyosarcoma
Kunigou O., Nagao H., Kawabata N., Ishidou Y., Nagano S., Maeda S., Komiya S., and Setoguchi T.

Oncology Reports. 2011;5:1337-42 査読有
doi: 10.3892/or.2011.1413.

② Pharmacological inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth.

Kawabata N, Ijiri K, Ishidou Y, Yamamoto T, Nagao H, Nagano S., Maeda S, Komiya S., Setoguchi T.

Int J Oncol. 2011; 399: 899-906 査読有
doi: 10.3892/ijo.2011.1076.

③ Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma

Nagao H., Ijiri K., Hirotsu M., Ishidou Y., Yamamoto T., Nagano S., Takizawa T., Nakashima K., Komiya S., and Setoguchi T.

The Journal of Pathology. 2011; 224: 169-79
査読有
doi: 10.1002/path.2880

④ Suppression of Osteosarcoma Cell Invasion by Chemotherapy Is Mediated by Urokinase Plasminogen Activator Activity via Up-Regulation of EGR1.

Matsunoshita Y, Ijiri K, Ishidou Y, Nagano S., Yamamoto T, Nagao H, Komiya S., Setoguchi T.
PLoS ONE. 2011; 6(1):e16234. 査読有

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016234>

⑤ Upregulation of Notch pathway molecules in oral squamous cell carcinoma.

Hijioka H, Setoguchi T., Miyawaki A, Gao H, Ishida T, Komiya S., and Nakamura N.

Int J Oncol. 2010; (36): 817-822 査読有
<http://www.spandidos-publications.com/ijo/36/4/817>

⑥ Knock down of over-expressed EZH2 and BMI-1 do not prevent osteosarcoma growth

Sasaki H., Setoguchi T., Matsunoshita Y., Gao H., Hirotsu M., Komiya S.

Oncology Reports. 2010; (23):677-84
査読有

<http://www.spandidos-publications.com/or/23/3/677>

⑦ Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma

Hirotsu M., Setoguchi T., Sasaki H. §, Matsunoshita Y., Gao H., Nagao H., Kunigou O., Komiya S.

Molecular Cancer. 2010; (9):5 査読有
<http://www.molecular-cancer.com/content/9/1/5>

⑧ Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells.

Hirotsu M, Setoguchi T., Matsunoshita Y, Sasaki H, Nagao H, Gao H, Sugimura K, Komiya S.

British Journal of Cancer. 2009; (101):2030-37
査読有
<http://www.nature.com/bjc/journal/v101/n12/full/6605407a.html>

〔学会発表〕（計 1 件）

①瀬戸口啓夫、永尾宗子、廣津匡隆、永野
聡、小宮節郎

ヒト骨肉腫における **GLI2** の機能解析

日本整形外科学会基礎学術集会

2011 年 10 月 21 日 群馬県 前橋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸口啓夫 (Setoguchi Takao)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任
准教授

研究者番号：40423727

(2) 研究分担者

永野 聡 (Nagano Satoshi)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50373139

(3) 研究分担者

小宮節郎 (Komiya Setsuro)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30178371