

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22501043

研究課題名(和文) 骨軟部肉腫に対する分化誘導療法の開発

研究課題名(英文) Induction of Differentiation for Bone and Soft Tissue Sarcoma

研究代表者

金森 昌彦 (KANAMORI, MASAHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：20204547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部腫瘍に対するCGHによる網羅的遺伝子の解析を行った。その中で、p53の近傍にあるHIC1を含む17p11-13の増幅が重要であると考えられた。またヒト肉腫株に対する3mM dbcAMPの効果として増殖抑制、形態変化とアポトーシス誘導が示され、CGHの結果からはSHGC17327とLLGL1の増幅、OCRL1の低下が認められた。骨肉腫に対する11種類のフラボノイドによるスクリーニングの結果、フラボノールおよびフラバノールによるアポトーシス変化が示された。特にカテキン類の中のガレート基をもつEGCGによるsub-G1の増加、Anexin V陽性、caspase-3の活性化が明確であった。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide screening of array-based comparative genomic hybridization (array CGH) was used to investigate bone and soft tissue tumors. Our results may provide several entry points for the identification of candidate genes associated with aggressive change. Especially, the locus 17p11-13 including HIC1 close to p53 was common high amplification in this series. When human MOS cells are treated with 3mM dbcAMP for 24 hours, apoptotic changes were showed. From the finding of array CGH, amplification of SHGC17327 and LLGL1 and loss of OCRL1 are detected in the treated MOS cells. We found the apoptotic changes of osteosarcoma cells in response to flavonol and flavanol in the screening examination of 11 flavonoids. In particular, ECG and EGCG induced sub-G1 increase, positivity of Anexin V, activation of caspase-3. ECG and EGCG with gallate-substrate provided the anti-proliferative effects that were stronger than any other catechins.

研究分野：腫瘍学分野

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学

キーワード：がん 分化誘導 アポトーシス誘導 骨肉腫 骨軟部腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の骨軟部肉腫治療における諸問題

現在の骨軟部肉腫の治療法は広範切除術や患肢再建術などの患肢温存療法による手術療法とアドリマイシン、シスプラチン、メソトレキセートなどによる化学療法や放射線療法が中心であるが、初診時から肺転移を認める症例や、化学療法が無効な症例での予後は依然として悪く、新たな治療のストラテジーが求められている。こうした中で新しいコンセプトをもった癌の治療法として、分化誘導療法やアポトーシス誘導療法などが注目を集めている。分化誘導療法とは、がん細胞を分化させ、細胞増殖抑制を誘導する方法で、殺細胞効果を目指した従来のがん治療法とは治療概念が大きく異なる。白血病に対する分化誘導療法としてレチノイン酸(ビタミンA)が臨床使用されているが、この考え方が応用できれば、現在難渋している骨肉腫の治療への貢献できることが期待される。アポトーシス誘導療法はがん細胞自らの死を誘導する方法で、様々ながん細胞や動物モデルで研究がなされている。既存の抗がん剤治療で、腫瘍の縮小効果が得られなければ肉腫細胞は肺転移を起こし患者は死に至るという現状を改善するために、骨軟部肉腫においてもこれらの新たな治療展開が必要である。

(2) これまでの我々の基礎研究の背景

我々は肉腫の肺転移の予防と治療のための基礎的研究として、当大学にて分離樹立したマウス RCT 肉腫高・低肺転移株 (Matsui et al, 1987) を用いた実験のほか、他施設から供与を受けた Dunn 骨肉腫などを用いて一連の転移抑制実験研究 (Kanamori et al, 1993, 1997, 2003) を続行してきた。これまでの肉腫転移に関する研究では、腫瘍の転移形成における基底膜分解酵素による細胞外マトリックス分解酵素産生能が、腫瘍細胞の性質のみで決定されるものではなく、細胞環境、特に宿主側の防御因子の一つである血管内皮細胞との関係について明らかにし、肺転移を規定する遺伝子変異についても報告した (Kanamori et al, 2007)。また、我々はこれまでに dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP) を用いた骨肉腫細胞の分化誘導の解析を進めており、「腫瘍細胞を分化させ良性への形質変換を誘導する、またはアポトーシス誘導ができないか」という基礎的研究も行ってきた。

2. 研究の目的

今回の研究はこれまでの我々の基礎的研究の結果を踏まえて、二つの方向性を考えた。一つは染色体 DNA による網羅的遺伝子解析を行い、腫瘍の発生ならびに細胞分化の過程における新たな知見を得ること、もう一つは分化誘導治療開発の一環として野菜や果物などに多く含まれる様々なフラボノイド成分による細胞分化誘導・アポトーシス誘導の模索である。

(1) DNA 解析による網羅的遺伝子の解析

骨軟部腫瘍における染色体 DNA による網羅的遺伝子解析を array CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法を用いて行い、骨軟部腫瘍における DNA コピー数 (DCNAs) の変化を知ること、肉腫発生の原因をさぐることを目的とした。特に肉腫におけるがん抑制遺伝子として予想される TP16 (9p21)、RB (13q14.1)、ZFH/ATBF1 (16q22.3-23.1)、p53 (17p13.1)、NM23 (17q21.3) などが存在する遺伝子領域に注目して検討することとした。

(2) フラボノイド成分による細胞分化誘導・アポトーシス誘導の模索

我々のこれまでのマウス骨肉腫を用いた分化誘導研究において、特に dbcAMP による分化誘導効果が最も高く認められたことから、臨床応用に向けてのヒト骨軟部腫瘍における実験を行った。cAMP は腫瘍細胞内の生理活性物質であっても、個体レベルでの必要量を考えると薬剤供給の面からは不可能である。そこで臨床応用を考えるには細胞内にこれを増加させる野菜や果物などの食品や天然物質から検討した方がよい。その中でフラボノイド類の一部は分子構造的には 2-フェニルクロモン骨格を持つ化合物群を指す物質であり、細胞内 cAMP を増加させることが報告されており、表 1 に示す外因性の各種フラボノイド成分による分化誘導効果を in vitro にて検討することを目的とした。

表 1 本研究で実施したフラボノイド一覧

フラボノイド	物質名
イソフラボン	ゲニステイン
フラボノール	ケルセチン ケンフェロール ミリセチン
フラバノン	ヘスペレチン
アントシアニン	シアニジン
フラバノール	エピカテキン (EC) エピガロカテキン (EGC) エピカテキンガレート (ECG) エピガロカテキンガレート (EGCG)
フラボン	ルテオリン

3. 研究の方法

【準備した細胞】

当教室で分離樹立して SCID マウスに移植したヒト肉腫株 (MOS) および購入したヒト肉腫 (MG63、SaOS₂) の 3 細胞株と手術時に採取した 20 サンプルを準備した。ヒト肉腫細胞の材料採取ならびに保存に当たっては提供者の同意を得ることを原則とし、人権および利益の保護に関して十分配慮した (当大学の第 41 回倫理委員会承認番号 137)。マウス肉腫細胞株は当講座で凍結保存されており、その性質は培養系でも再現することが可能であった。

【基本的な細胞調整】

細胞培養では 10%FBS 添加 DMEM 培地にて 37 (5%CO₂) の条件下で培養した。マウ

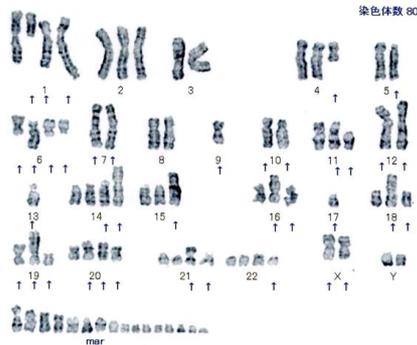


図3 MOS細胞の染色体分析

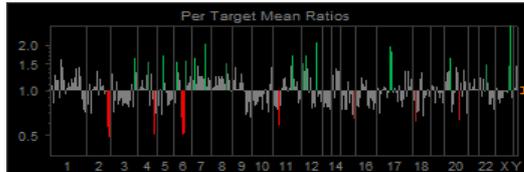


図4a MOSの対照群におけるDCNAs

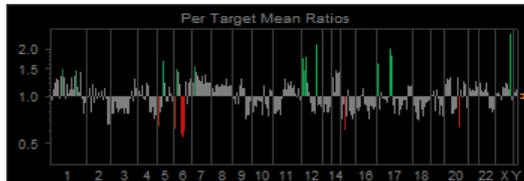


図4b dbcAMP添加によるDCNAsの変化

表3 主なDCNAsの変化の詳細

LOSS	location	Control	3mM Bt2cAMP 24 hr
HTR1B	6q13	0.623	0.65
D6S268	6q16.3-q21	0.566	0.57
SHGC17327	18ptel	0.65	0.75
STK6(STK15)	20q13.2-q13.3	0.596	0.687
GAIN			
DAB2	5q13	1.62	1.66
MDM2	12q14.3-q15	1.99	2.03
CCND2	12p13	1.79	1.7
TOP3A	17p12-17p11.2	1.78	1.85
OCRL1	Xq25	5.3	2.1
8M16/SP6	12ptel	1.46	1.57
LLGL1	17p12-17p11.2	1.83	2.1

図3にはMOS細胞の染色体を示し、図4にはCGH法でのdbcAMPによる変化を示す。全染色体領域の分析結果からは *DAB2*, *MDM2*, *CCND2*, *TOP3A*, *OCRL1*, *8M16/SP6*, *LLGL1* のDCNAsの増幅が見られ、*HTR1B*, *D6S268*, *SHGC17327*, *STK6* の低下が認められた(表3)。また総染色体数も大きく変化し、核の断片化に伴うと考えられる所見と考えられた。

さらに稀少例の報告として、仙骨に発生した巨大な神経性腫瘍(Giant invasive sacral schwannoma: GISS)のサンプルを分析して、染色体の数的異常として、[-14,+18,+22]を見出し、症例報告も行った(原著論文2)。

(2) ヒト軟部腫瘍に対する染色体DNA解析について(原著論文1, 4, 5)

稀な多形型平滑筋肉腫のarray CGH法を施行した結果では転移病変でのDCNAsの

化が認められた(図5)。



図5a 原発巣におけるDCNAsの変化



図5b 転移巣におけるDCNAsの変化

8ptel, 17ptel, 17q11.2の増幅および2ptel, 7ptel, 7qtel, 10p15, 12p12-13.1, 13q14.2-14.3, 15q25-26, Yq11の低下が確認されるなど新しい知見を得た(原著論文1)。

また、今回の期間中に収集した軟部肉腫のうち、CD99陽性軟部肉腫ではadd(1)(q23), t(1;16)(p21;p11.2), inv(5)(q11.2;q15)が確認でき(原著論文4) 大腿部に発生したextraskelatal myxoid chondrosarcomaではt(9;17)を証明することができた(原著論文5)。

(3) フラボノイドによる分化誘導実験(学会報告(1, 4, 6, 7, 9))

次にMG63骨肉腫細胞株を用いてフラボノイド11種類(表1)を用い、抗腫瘍効果を検討した。形態学的変化、MTT(CCK-8)アッセイによる増殖能の変化、アルカリフォスファターゼ、蛋白量、DNA量、LDHの定量および分化誘導効果とアポトーシス変化について確認した。その結果、有意な細胞形態変化が認められたものはフラボノール(ケルセチン、ケンフェロール、ミリセチン)、フラボン(ルテオリン)、フラバノール(ECG, EGCG)、イソフラボン(ゲニステイン)の7種類であった。フラボノールでは細胞の多角形化と細胞突起の伸長が認められ、フラバノール、フラボン、イソフラボンではその変化が顕著であった。これらの細胞ではヘキスト33342による蛍光染色で核の断片化が確認された。

フラボノール群では10μMケルセチン、50μMケンフェロール、30μMのミリセチンの添加によりCCK-8アッセイにて有意な細胞増殖抑制が認められ、時間用量依存性であった(図6)。一方、細胞内ALP活性はルテオリンで抑制され(図7)、ケンフェロール(20μM以上)(図8)、ケルセチン(40μM)で上昇を認めた。しかし、各化合物においてLDHによる細胞毒性評価、蛋白量測定では有意差はなく、ケンフェロールおよびケルセチンでは骨肉腫細胞に対する増殖抑制作用とALP誘導作用が分化誘導効果として確認された。

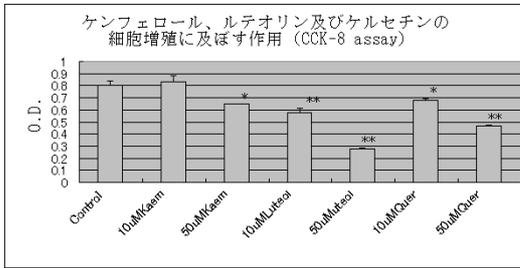


図 6 フラボノイド添加による細胞増殖

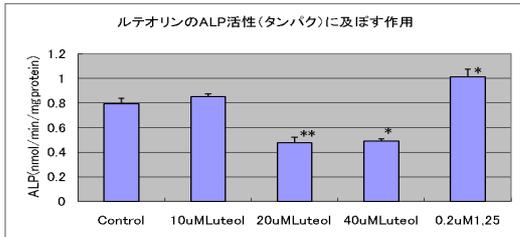


図 7 ルテオリン添加による ALP の減少

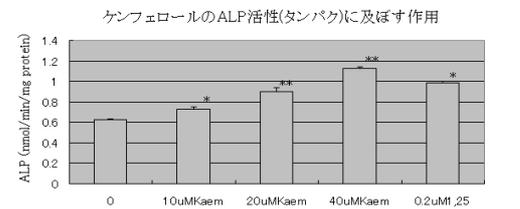


図 8 ケンフェロールによる ALP の増加

フラバノールでは CCK-8 アッセイにて濃度を 50 μ M、75 μ M のカテキン類で 48 時間培養すると、EC 両濃度、EGC 50 μ M では増殖抑制が見られなかったが、ECG 50 μ M ではコントロール群と比較して増殖抑制が認められた ($p < 0.05$) (図 9)。また ECG 75 μ M、ECG 75 μ M では明確になった ($p < 0.01$)。ヘキスト 33342 染色による所見でも核の萎縮・顆粒状の変化が見られ、PC-buffer 法による細胞周期の検討では DNA 合成期の減少とともに、sub-G1 の増加が認められた。また Annexin-V と PE を用いた 2-color 解析とカスパーゼ 3 の所見でもアポトーシスの変化が認められた (図 10)。

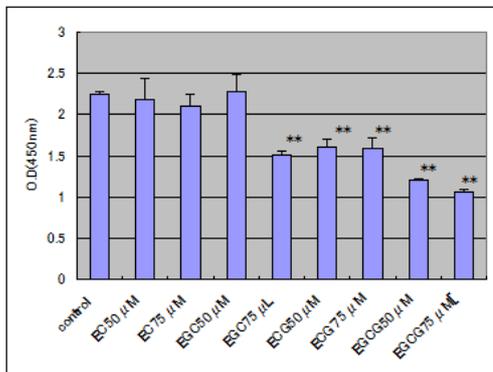


図 9 フラバノールによる細胞増殖抑制

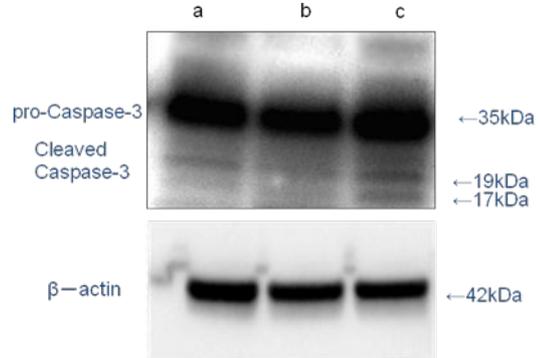


図 10 Western blot によるカスパーゼ 3 の変化 (a: control, b: 75 mM ECG, c: 75 mM EGCG を示す)

さらにフラボノイドを含むアカメガシワ、および大棗抽出成分による分化誘導実験およびアポトーシス誘導実験も施行した。アカメガシワから抽出した成分である Mallotophenone (MP)、Mallotojaponin (MJ)、Mallotochromene (MC)、Mallotolerin (ML) を用いて、骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果について検討した。形態学的にはすべての化合物で細胞の紡錘形変化がみられ、特に 3.0 μ mol の MJ では無添加群の 43% まで増殖抑制効果が認められた。分化誘導の陽性対照として用いた 0.2 μ M の 1,25(OH)₂D₃ (活性型ビタミン D₃) 添加と類似の効果を示したが、ALP が誘導されたのは MP のみであった。細胞内蛋白量は低下し、LDH 測定による細胞障害率に関しては、MJ で有意な増加がみられた。

以上より今回の実験に用いたフラボノイド 11 種類中 7 種類において骨肉腫細胞に対するアポトーシスおよび分化誘導効果を持つ可能性が示唆された。その作用は特にフラバノール (ケンフェロールおよびケルセチン) とガレート基のついたフラバノール (ECG と EGCG) に顕著な効果があった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Kanamori M., Yasuda T., Suzuki K., Hori T.: DNA copy number alterations in a case of pleomorphic leiomyosarcoma. *Oncol. Lett.*, 査読あり, 7 巻, 2014, 1847-1850

Kanamori M., Yasuda T., Hori T., Suzuki K.: Giant invasive sacral schwannoma showing chromosomal numerical aberrations [-14,+18,+22]. *Asian Spine J.*, 査読あり, 7 巻, 2013, 227-231

Kanamori M., Sano A., Yasuda T., Hori T., and Suzuki K.: Array-based comparative genomic hybridization for genomic-wide screening of DNA copy number alterations in aggressive bone tumors. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 査読あり, 31 巻, 2012, 100

Kanamori M., Suzuki K., Yasuda T., Hori

T. : CD-99 positive tissue sarcoma with chromosomal translocation between 1 and 16 and inversion of chromosome 5. *Oncol. Lett.*, 査読あり, 3 巻, 2012, 1213-1215
Yasuda T., Hori T., Suzuki K., Kanamori M., Nogami S., Yahara Y., and Kimura T. : Extraskelletal myxoid chondrosarcoma of the thigh with a t(9;17) translocation. *Oncol. Lett.*, 査読あり, 3 巻, 2012, 621-624

[学会報告] (計 12 件)

Kanamori M., Miyahara T., Suzuki K., et al: The effects of flavonol and flavone on cultured MG-63 osteosarcoma cells. International Society of Limb Salvage 17th General Meeting, 2013, 9, 11-13, Bologna.

Kanamori M., Yasuda T., Suzuki K., et al: DNA copy number alterations in a case of pleomorphic leiomyosarcoma. International Society of Limb Salvage 17th General Meeting, 2013 9, 11-13, Bologna.

Kanamori M., Yasuda T., Hori T., et al: A case of pleomorphic leiomyosarcoma analyzed by CGH. 第 46 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2013, 7, 11-12, 東京.

金森昌彦, 宮原龍郎, 三橋陽平ほか: 培養 MG63 骨肉腫細胞に対するエピカテキンの抗腫瘍効果. 第 45 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2012, 7, 14-15, 東京.

Kanamori M., Yasuda T., Hori T., et al: Cellular schwannoma with giant cystic formation in the sacrum, showing chromosomal numerical aberrations [-14, +18, +22]. 第 45 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2012, 7, 14-15, 東京.

金森昌彦, 畑島 郁, 宮原龍郎ほか: MG-63 培養骨肉腫細胞に対するフラボノールの抗腫瘍効果. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 9, 19-21, 札幌.

畑島 郁, 三橋陽平, 宮原龍郎ほか: カテキンによる骨肉腫細胞 MG-63 のアポトーシス誘導. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 9, 19-21, 札幌.

安田剛敏, 西尾 淳, 金森昌彦ほか: 軟骨粘液線維腫の染色体異常と FISH 法による分子細胞遺伝子学的分析. 第 84 回日本整形外科学会学術集会, 2011, 5, 12-15, 横浜.

金森昌彦, 宮原龍郎, 安田剛敏ほか: MG63 培養骨肉腫細胞に対するフラボノールの効果. 第 44 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2011, 7, 14-15, 京都.

金森昌彦, 安田剛敏, 堀 岳史ほか: 特異な核型異常を呈した滑膜肉腫の 1 例. 第 117 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会, 2011, 10, 28-29, 山口.

[図 書] (計 1 件)

Hogendoorn P. C. W., Kanamori M.:

[Chapter 24], Myogenic, lipogenic and epithelial tumours. –Adamantinoma, WHO classification of tumours of soft tissue and bone (4th edition). eds. Fletcher C. D. M., Bridge J. A., Hogendoorn P. C. W., Mertens F., pp343-345, WHO-International agency for research on cancer, Lyon, 2013.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

金森 昌彦 (KANAMORI, Masahiko)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号 : 20204547

(2) 研究分担者

安田 剛敏 (YASUDA, Taketoshi)
富山大学・附属病院・講師
研究者番号 : 20377302

(3) 連携研究者

堀 岳史 (HORI, Takeshi)
飯山赤十字病院・医師

鈴木 賀代 (SUZUKI, Kayo)
富山大学附属病院・医員
研究者番号 : 20456388

宮原 龍郎 (MIYAHARA, Tatsuro)
富山大学医学部人間科学 1 講座・協力研究員

川口 誠 (KAWAGUCHI, Makoto)
上越労災病院病理学部門・医師

野上 重治 (NOGAMI, Shigeharu)
高岡市民病院整形外科・医師

佐野 明美 (SANO, Akimi)
富山大学医学部整形外科・技官

Julia A. Bridge
University of Nebraska Medical Center,
Nebraska, USA・Professor