

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23592201

研究課題名(和文)多中性骨肉腫樹立細胞株を用いた病態解明と転移抑制のための実験的研究

研究課題名(英文)A basic research for condition of disease elucidation and metastasis restraint using the cell line of multicenter osteosarcoma

研究代表者

山田 治基 (YAMADA, Harumoto)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：40146626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫の中で多発骨病変を来す特殊な病態として、治療抵抗性で予後不良な多中心性骨肉腫(HMOS)がある。本研究は樹立したHMOSの先行病変部と後発病変部由来の細胞株を用いて、骨転移に關与する諸因子とそれらを制御する治療薬開発の基盤研究である。骨肉腫細胞株(MNNG/HOS)とHMOSを比較したところ、CXCL12はHMOSで発現が顕著に増加していた。HMOSの先行病変部より後発病変部で発現が増加している因子は、MMP-2、MT1-MMP、IL-6、COL8A2などであった。ヒト型ファージ抗体ライブラリーを用いて、HMOSに特異的に反応する5種類のmonoclonal抗体をクローニングした。

研究成果の概要(英文)：The human multicentric osteosarcoma (HMOS) is the special condition of disease to cause a frequent occurrence bone lesion in osteosarcoma. HMOS is treatment-resistant, duration of survival very short for half a year from several months, and is poor prognosis. We established two cell strain derived from a lesion of precedence and the late departure lesion of HMOS. This study is a base study for the clinical applications of a therapeutic drug by analysis of factor in bone metastasis. We compared HMOS with the osteosarcoma cell line (MNNG/HOS), in this result, the expression of HMOS increased CXCL12 conspicuously. The expression factor which increased for the late departure lesion than the precedent lesion of HMOS was MMP-2, MT1-MMP, IL-6, COL8A2, CMKOR1, SOCS2, TRIB3. We reacted the human bacteriophage antibody library as an antigen in HMOS and was able to perform cloning of five monoclonal antibody which specifically reacted to HMOS.

研究分野：整形外科学

キーワード：多中心性骨肉腫 細胞株 骨転移 ケモカイン カドヘリン 抗体ライブラリー

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は小児原発性骨悪性腫瘍の中で最も多い疾患であり、近年、その治療成績は向上しているが、治療効果に乏しい予後不良群が存在する。その中で病早期や治療経過中に骨転移を来たしてくる症例は抗がん剤感受性も低く、骨肉腫症例のうち最も予後不良な患者群とされている。

本症の中で病早期より多発骨病変を来たす特殊な病態として多中心性骨肉腫 (Human Multicentric Osteosarcoma ; HMOS)がある。HMOS は骨肉腫の約 1%と少ないが、治療抵抗性で生存期間は数ヶ月～半年と非常に予後不良である。本症では通常、初診時に先行病変とされる比較的進行した病変とともに骨肉腫の好発部位である骨幹端に多発する病変を認める。本症の発症メカニズムについては真に多中心性発生であるとする説のほか、腫瘍細胞のもつ高度な骨親和性に基づく初期からの特殊な骨転移であるとする説がある。近年は後者の転移説が支持されているが、それを裏付ける基礎データは全く無いのが現状である。

我々は HMOS の先行病変部および後発病変部由来の 2 つの細胞株を新たに樹立することに成功し、この細胞株の細胞特性を明らかにするとともに、この細胞株が遠隔骨転移に関与する諸因子を既存の他の骨肉腫細胞株より非常に高度に発現していることを報告した (Yamamoto Y, Yamamoto N, Yamada H et al. *J Cancer Research and Clinical Oncology*, 2010)。上記の我々の細胞株を使用した研究により HMOS の病態が特殊な骨転移である可能性が示唆されたが、どのような因子に基づいて骨に特異的に転移するのか、また抗がん剤抵抗性で治療効果に乏しい原因という点については依然、未解明である。

本研究では我々が樹立した細胞株を用いて HMOS の病態についてのさらに詳細な基礎研究を遂行し、初期から高率に骨転移を来たす *in vivo* の実験系を確立し HMOS を含めた骨肉腫骨における転移制圧に向けて臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

### 2. 研究の目的

HMOS の病態において解明されていない基礎研究を遂行し、HMOS を含めた骨肉腫骨転移に関与する諸因子とそれらを制御する治療薬や治療法の臨床応用を展開するための基盤となる研究を行う。研究期間内において以下のことを明らかにすることを目的とする。

- 1) 免疫不全マウス (ヌードマウス) に樹立細胞株を移植し、*in vivo* における細胞動態について観察するとともに、マウス体内で骨転移した移植細胞 (骨親

和性転移細胞) を分離し、移植前の細胞株と骨転移関連候補遺伝子の発現の違いを評価する。

- 2) 骨転移関連候補遺伝子の中から樹立細胞株における骨転移に関与する遺伝子を同定する。
- 3) 癌疾患に対する治療用ヒト型ファージ抗体ライブラリー作製手法を応用して、HMOS に特異的なヒト型抗体の開発に取り組む。

### 3. 研究の方法

樹立した HMOS の先行病変部および後発病変部由来 (転移病変部) の 2 つの細胞株を用いて、以下のような研究を実施した。なお、対照としてヒト骨肉腫細胞株 (Human Osteosarcoma cell line ; MNNG/HOS TE85, Clone F-5) を使用した。

- 1) HMOS 細胞株を用いた *in vivo* における移植実験

免疫不全マウス (KSN-nu Slc) の背部皮下に HMOS を移植し、移植した細胞の動態、特に骨親和性の高い細胞亜株を作成し、元細胞である HMOS 細胞株との比較を行った。なお、移植した細胞を明確にするため、pAcGFP1-N1 vector (Takara bio) を用いて GFP 蛍光標識を行った。

- 2) HMOS 細胞株における骨転移関連候補遺伝子の検索

HMOS の先行病変部および後発病変部由来の 2 つの細胞株における骨転移関連候補遺伝子、およびその遺伝子に関連するタンパク質の発現比較を行う。具体的には、マイクロアレイ (OpArray, Operon Biotechnologies Inc.)、リアルタイム PCR、フローサイトメーター (FACS Calibur)、各種抗体を用いた細胞免疫染色を行い、先行病変部および後発病変部由来の細胞株における比較、および MNNG/HOS との発現比較を行った。

- 3) ヒト型ファージ抗体ライブラリー作製手法を用いた HMOS に特異的なヒト抗体の作製

HMOS を抗原としてヒト型ファージ抗体ライブラリーを反応させ、HMOS を認識する polyclonal 抗体の作製を行った。さらに得られた polyclonal 抗体を基に 100 種類程度の monoclonal 抗体を分離し、得られた抗体を用いて HMOS に特異的に反応する抗体を選択した。

#### 4. 研究成果

##### 1) HMOS 細胞株を用いた *in vivo* における移植実験

免疫不全マウス(KSN-nu Slc)の背部皮下に GFP で標識された HMOS を移植したところ、移植部位での細胞増殖、腫瘍を形成した。

GFP で標識された HMOS の一部は、骨転移巣における病変部を蛍光実体顕微鏡下にて確認することができたため、それらの細胞を分離し、HMOS 細胞株との比較を行ったが、明らかに変動している細胞亜株を樹立することはできなかった。

##### 2) HMOS 細胞株における骨転移関連候補遺伝子の検索

マイクロアレイのデータにおいて、先行病変部由来細胞と比べて、後発病変部由来細胞の方が 2 倍程度強く発現している遺伝子は 482 個あり、その中で 4 倍以上の発現差があるものは、IL-6, COL8A2, CMKOR1, SOCS2, TRIB3 などであった。

一方、腫瘍の転移に関連する因子について、先行病変部および後発病変部由来の細胞株間における比較をリアルタイム PCR にて行った。後発病変部の方が先行病変部由来の細胞株より遺伝子発現量が多かったのは、MMP-2, MT1-MMP であった。他方、先行病変部の方が後発病変部由来の細胞株より遺伝子発現量が多かったのは、MMP-9 であった。

また、MNNG/HOS と比較したところ、CXCR4 の発現は HMOS 細胞株と比較して 10 倍以上遺伝子発現量が MNNG/HOS は多かったのに対し、CXCL12 の発現は HMOS 細胞株の方が 10000 倍近く MNNG/HOS より高いというユニークな結果が得られた。

さらに骨転移に関連する因子であるカドヘリンファミリーのカドヘリン 11(CDH11)、E-カドヘリン、N-カドヘリンなどのタンパク質発現レベルの比較を FACS で行った。結果として HMOS 細胞株と MNNG/HOS のタンパク質発現レベルでの優位な違いはなかった。

MNNG/HOS と比較して HMOS は転移様式も特徴的である。HMOS は、MNNG/HOS と比べて、癌細胞としても幼若な細胞としての位置づけであることも推定されたことから、現在も引き続き詳細な検討を進めている。

##### 3) ヒト型ファージ抗体ライブラリー作製手法を用いた HMOS に特異的なヒト抗体の作製

HMOS を抗原としてヒト型ファ-

ージ抗体ライブラリーを反応させて作製した polyclonal 抗体は、肺癌、前立腺癌、髄膜腫などの腫瘍細胞との反応性よりも HMOS との反応強度は高いことを FACS による解析で確認できた。

そこで、この polyclonal 抗体を基に 100 種類程度の monoclonal 抗体を分離し、FACS を用いて HMOS に特異的に反応し、MNNG/HOS には反応しない抗体(5 種類)のクローニングに成功した。なお、monoclonal 抗体の選定実験において、FACS 以外にも抗体の反応強度を蛍光強度で定量的に測定できる蛍光プレートリーダーを用いたハイスループット測定法を開発した。

今後、HMOS を特異的に認識する 5 種類の monoclonal 抗体が認識している HMOS のタンパク質の同定について、本学に設置されている超高分解能フーリエ変換型質量分析装置(Orbitrap Fusion)を用いて解析していく。

これまでの研究成果をまとめた論文を作成中である。HMOS に対する治療用ヒト抗体開発を最終目標として、今後も研究を継続していく。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Yamamoto H, Yamamoto N, Shiomi K, Hashimoto N. Pro-insulin-like growth factor-II ameliorates age-related inefficient regenerative response by orchestrating self-reinforcement mechanism of muscle regeneration. *Stem Cells* 33, 2456-2468, 2015 査読有
- 2) Oishi T., Uezumi A., Kanaji A. Yamamoto N., Yamaguchi A., Yamada H., Tsuchida K. Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. *PLoS One* 8, e56641-e56650, 2013. 査読有
- 3) Yamamoto Y., Yamamoto N., Tajima K., Ohno A., Washimi Y., Ishimura D., Washimi O., Yamada H. Characterization of human multicentric osteosarcoma using newly established cells derived from multicentric osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 137, 423-433, 2011. 査読有
- 4) Yamamoto Y., Takakuwa Y., Kuroda M., Nakashima H., Washimi Y., Ishimura D., Yamada H. A p53 gene mutation in malignant fibrous histiocytoma associated with bone infarction. *Tohoku J Exp Med* 225, 215-220, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 石村大輔,山本康洋,鷺見雄希,下山哲生,高桑康成,浦野 誠,溝口良順,黒田 誠,左上腕軟部悪性腫瘍の1例.  
第71回東海骨軟部腫瘍研究会,2011年,愛知.
- 2) 林 卓馬,山本康洋,石村大輔,山田治基.第 、 、 総指伸筋腱に発生した腱内ガングリオンの1例.  
第120回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会,2013年,和歌山.

〔図書〕(計1件)

- 1) 山本直樹(日本組織培養学会 編集).  
細胞培養実習テキスト.細胞培養基盤技術.株式会社じほう,東京,2011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~seikei/>  
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~kyoriken/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 治基(YAMADA Harumoto)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号:40146626

(2)研究分担者

山本 直樹(YAMAMOTO Naoki)  
藤田保健衛生大学・共同利用研究施設・  
准教授  
研究者番号:00267957

(3)連携研究者

黒澤 良和(KUROSAWA Yoshikazu)  
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・  
教授  
研究者番号:10109259