

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462321

研究課題名(和文) 骨軟部悪性腫瘍における核内受容体を介した腫瘍関連遺伝子発現の解析

研究課題名(英文) An Experimental study of tumor associated gene expression through nuclear receptors in musculoskeletal malignant tumors.

研究代表者

永澤 博幸 (Nagasawa, Hiroyuki)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：50375284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞の悪性腫瘍である滑膜肉腫細胞株に対する、脂溶性ビタミンの分化誘導効果について検討した。滑膜肉腫細胞株HS-SY-IIの培地にビタミンA活性代謝産物であるレチノイン酸あるいはビタミンK(メナキノン)を添加して培養、細胞分化に関わる各種遺伝子発現を検討した。これらの脂溶性ビタミン投与により、骨芽細胞あるいは軟骨細胞への分化が促進され、脂肪細胞への分化は抑制傾向にあり、その効果はメナキノンよりレチノイン酸の方が顕著であった。軟部肉腫における核内受容体を介した脂溶性ビタミンの分化誘導効果が明らかとなり、軟部肉腫での分化誘導療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of menaquinone (VK) and all-trans retinoic acid (ATRA) on the differentiation of the synovial sarcoma cell line HS-SY-II. Both VK and ATRA decreased mRNA expression of fatty acid binding protein 4 (FABP4) and inhibited the increase in mRNA expression of bone Gla protein (BGP). These effects of ATRA was slightly stronger than that of VK. However ATRA also increased mRNA expression of Runx2, PPAR, Sox9 and COLA2, glycerolphosphate dehydrogenase (GPDH) mRNA expression was decreased on day 8 and 14. Our results suggested that both VK and ATRA induced the differentiation to osteoblasts and inhibited the differentiation to adipocytes in synovial sarcoma cell line HS-SY-II which is a stem cell malignancy.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨軟部腫瘍 脂溶性ビタミン 核内受容体 肉腫 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K は代表的非コラーゲン性骨基質蛋白であるオステオカルシンの Gla 化に重要な役割を果たし、骨粗鬆症治療薬として用いられている。近年、ヒトにおけるビタミン K 受容体 (steroid xenobiotic receptor; SXR) 遺伝子がクローニングされ、SXR が骨芽細胞の分化を制御していることが明らかとなった。SXR は核内受容体であり、ビタミン A 受容体の一つであるレチノイド X 受容体 (retinoid X receptor) とヘテロ二量体を形成し、リガンド依存性に様々な標的遺伝子を制御している。一方でビタミン K は腫瘍制御分野でも注目されており、肝細胞癌をはじめとする悪性腫瘍に対する抗腫瘍活性の研究がなされているが、骨軟部悪性腫瘍での SXR 発現やビタミン K の効果、機序は未だ不明である。

我々は先行研究において骨芽細胞様細胞に対するビタミン A の効果や RXR 発現について研究し、ビタミン A 活性代謝産物であるレチノイン酸が同細胞の分化ならびに RXR 遺伝子発現を促進することを明らかにした。今回の研究では骨芽細胞様細胞に対するビタミン A の効果に関する研究で培った研究方法を応用し、悪性骨軟部腫瘍に対するビタミン K やレチノイン酸の抗腫瘍効果を明らかとすべく基礎的研究を行うこととした。

2. 研究の目的

ビタミン K の抗腫瘍効果については肝細胞癌をはじめとした癌腫に関しての基礎的、臨床的研究がなされているが、軟部肉腫や原発性悪性骨腫瘍に関する研究はほとんど行われていない。我々は軟部肉腫や原発性悪性骨腫瘍に対するビタミン K やビタミン A の抗腫瘍効果、特に腫瘍関連遺伝子、増殖や分化に関する遺伝子の発現を明らかとすべく、軟部肉腫細胞株を用いた *in vitro* 研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養手技

滑膜肉腫細胞株 HS-SY-II を 75 cm² のフラスコに 1.2 x 10⁴ 個/cm² で播種、37℃、5% CO₂ の環境下で培養した。培地は DMEM に 10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加して用いた。sub-confluent に達したところで、10⁻⁶ M の all-*trans* retinoic acid (ATRA) またはメナキノン (vitamin K₂, VK) を含む DMEM + 1% FBS 培地に交換した。ビタミン添加培地へ交換後 4, 8 日目に total RNA を抽出した。培地交換は 2 日毎に行った。

(2) リアルタイム PCR による標的遺伝子発現の検討

(1) で得られた total RNA より mRNA を抽出、逆転写酵素反応を行って得た cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。以下の遺伝子についてその発現量が、ビタミ

ン K や ATRA によりどのように変化するか検討した。

SYT-SSX (滑膜肉腫で高発現する融合遺伝子)、FABP4 (成熟脂肪細胞への分化の指標として)、BGP (成熟骨芽細胞への分化の指標として)。

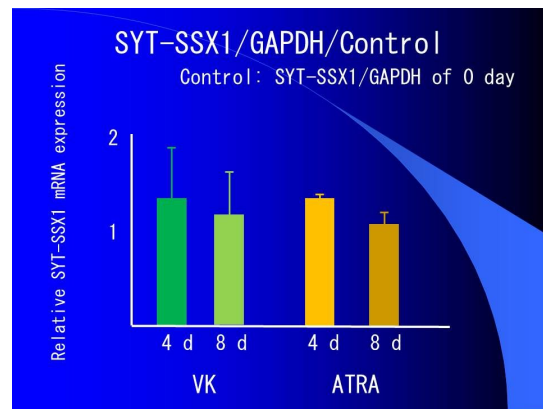
(3) 上記 (1) (2) より得られた結果 (滑膜肉腫細胞株への脂溶性ビタミン投与により、骨芽細胞系への分化が促進され、脂肪細胞系への分化が抑制された。この効果はビタミン K より ATRA の方が強い傾向にあった) より、ATRA のみを投与して以下の遺伝子発現をリアルタイム PCR で検討した。

Runx2 (骨芽細胞分化の初期段階で発現する)、BGP、PPAR (脂肪細胞分化の初期段階で発現する)、GPDH (成熟脂肪細胞で発現する)、Sox2 (軟骨細胞分化の初期段階で発現する)、COLA2 (成熟軟骨細胞で発現する)。

4. 研究成果

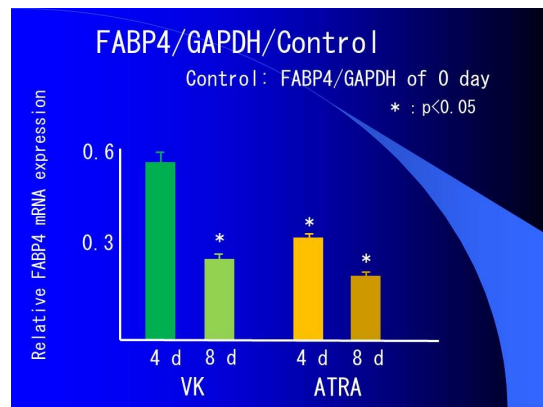
(1) SYT-SSX 遺伝子発現

ビタミン K および ATRA 投与下であっても、SYT-SSX 融合遺伝子の発現には変化を認めなかった。



(2) FABP4 遺伝子発現

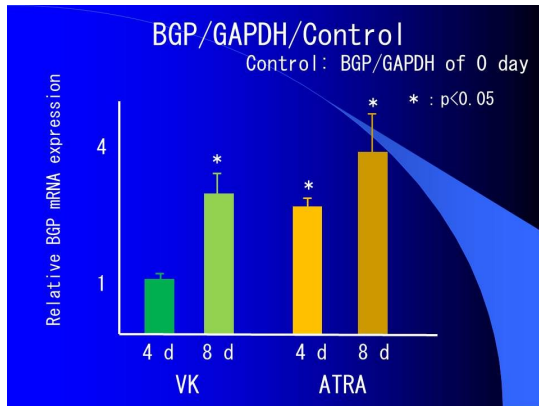
ATRA 4 日群で FABP4/GAPDH/Co=0.31, 8 日群で 0.19, VK 4 日群で 0.567, 8 日群で 0.245 と、発現が抑制された。



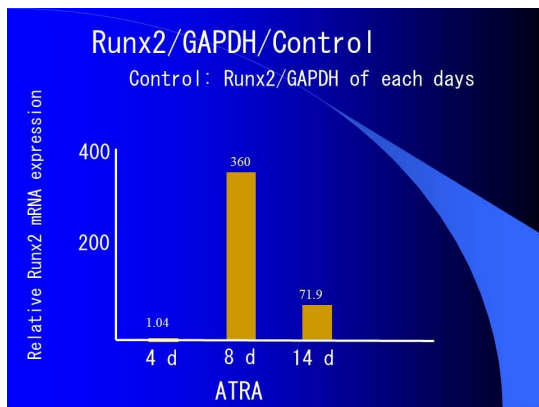
(3) BGP 遺伝子発現

ATRA 4 日群で BGP/GAPDH/Co=2.42, 8 日群で 3.85, VK 4 日群で 1.22, 8 日群で 2.75 であり、VK 8 日群、ATRA 4, 8 日群で発現が促進さ

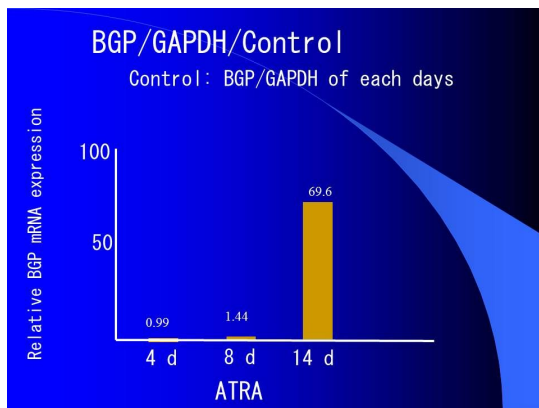
れた。



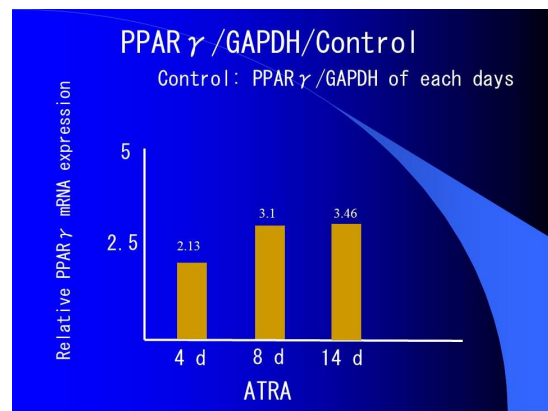
(4)Runx2 遺伝子発現
ATRA 8 日群で Runx2/GAPDH/Co=360 , 8 日群で 71.9 と , 著明な発現促進を認めた。



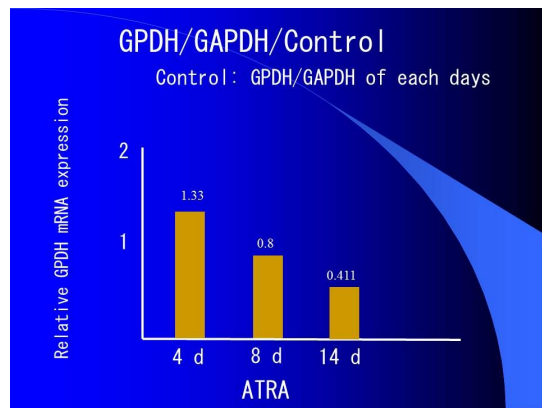
(5)BGP 遺伝子発現
ATRA 14 日群で BGP/GAPDH/Co=69.6 と , 培養後期において著明な発現促進を認めた。



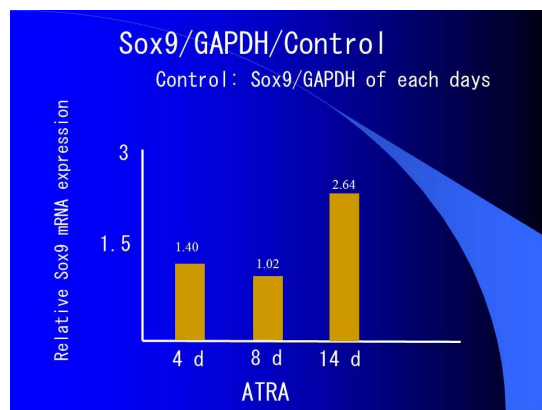
(6)PPAR 遺伝子発現
ATRA 4 日群で PPAR /GAPDH/Co=2.13 , 8 日群で 3.1 , 14 日群で 3.46 と , 発現が促進される傾向にあった。



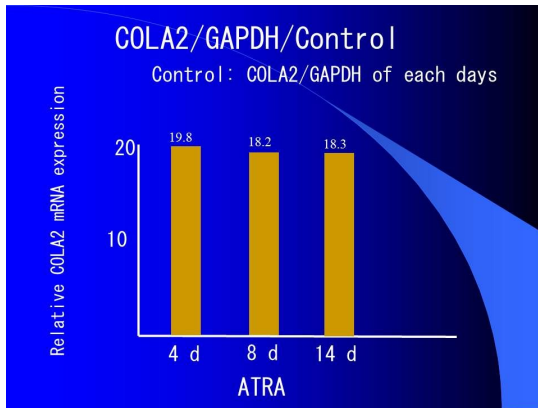
(7)GPDH 遺伝子発現
ATRA 4 日群で GPDH/GAPDH/Co=1.33 , 8 日群で 0.8 , 14 日群で 0.411 と , ATRA 投与期間が長くなるにつれて発現が抑制される傾向にあった。



(8)Sox9 遺伝子発現
ATRA 4 日群で Sox9/GAPDH/Co=1.40 , 8 日群で 1.02 であったが , 14 日群で 2.64 と , 培養後期において発現が促進される傾向にあった。



(8)COLA2 遺伝子発現
ATRA 4 日群で COLA2/GAPDH/Co=19.8 , 8 日群で 18.2 , 14 日群で 18.3 と , 発現が促進された。



(9)まとめ

未分化幹細胞の悪性腫瘍である滑膜肉腫細胞株においては、脂溶性ビタミンである VK や ATRA の投与により、骨芽細胞系への分化が促進され、成熟脂肪細胞への分化は抑制された。また、この効果は VK よりも ATRA の方が強い傾向にあった。ATRA 投与による各種遺伝子発現を検討したところ、軟骨細胞系への分化も促進される傾向にあった。これらの分化は脂溶性ビタミンをリガンドとする核内受容体の関与が示唆され、未分化肉腫の分化誘導療法への可能性が示唆された。

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)

〔その他〕

〔招待講演〕

永澤博幸:脂肪細胞分化と脂肪腫・脂肪肉腫・第 13 回秋田県骨軟部腫瘍セミナー(日本整形外科学会教育研修講演), 2016 年 2 月, 秋田市

6. 研究組織

(1)研究代表者

永澤 博幸 (NAGASAWA HIROYUKI)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号: 5037284

(2)研究分担者

岡田 恭司 (OKADA KYOJI)
秋田大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 10185431