

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860293

研究課題名(和文)細胞融合の制御機構と腫瘍性多核巨細胞の形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analyses of mechanisms of regulation of cell fusion and formation of tumor-associated multinucleated giant cells

研究代表者

三井 伸二(Mii, Shinji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80646505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト検体および我々の作製したCD109ノックアウトマウスを用いて免疫組織化学的検討を行い、ヒトおよびマウスの骨に存在する破骨細胞や、ヒト骨肉腫・骨巨細胞腫などで出現する破骨型多核巨細胞においてCD109が高発現することを示した。
また、マウスより得た初代培養骨芽細胞および破骨前駆細胞の共培養により、CD109が欠損することで破骨細胞の多核化が阻害されることが明らかとなった。
以上のことからCD109が破骨細胞の多核化および破骨型多核巨細胞の形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, immunohistochemical analysis revealed CD109 expression in human and murine osteoclasts in bones and osteoclast-like multinucleated giant cells in human osteosarcoma and giant cell tumor.
In addition, we performed co-culture experiments using primary osteoblasts and pre-osteoclasts isolated from either wild-type or CD109-deficient mice. In this in vitro co-culture experiments, CD109-deficient pre-osteoclasts failed to multinucleate by cell fusion.
These findings suggest that CD109 plays a role in cell fusion of osteoclasts and in formation of osteoclast-like multinucleated giant cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：CD109 破骨細胞 間葉系間質細胞 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

細胞融合は、生理的および病的な状況のいずれでも認められる重要な生命現象であるが、腫瘍組織における細胞融合のメカニズムとその役割については不明な点が多い。

2-マクログロブリン/C3,C4,C5 ファミリーに属する GPI アンカー型膜タンパク質 CD109 は、肺・口腔・食道・子宮頸部の扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌等で発現が増強していることが明らかとなっており、癌関連遺伝子と考えられている。また、ケラチノサイト細胞株において、CD109 は TGF- β シグナルを負に制御するとの報告もあり、TGF- β の共受容体とされている。

加えて、我々が作製した CD109 ノックアウトマウスの解析により、生体内において CD109 は表皮ケラチノサイトの分化において重要な役割を果たすことを示唆する結果が得られている。

しかし、非上皮性組織における CD109 についての報告は少なく、その発現および機能には不明な点が多い。一方、質量分析法により、CD109 と、組織球の融合を制御する CD81 の結合を示唆するデータが得られていたことから、本研究では、非上皮性組織の中でも、細胞融合により生じることが知られている骨組織中の破骨細胞や、骨肉腫および骨巨細胞腫で認められる破骨型多核巨細胞における CD109 の役割に着目し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、CD109 が生体内において細胞融合の制御に与える影響を明らかにするとともに、癌関連遺伝子としての CD109 が腫瘍における多核巨細胞の形成にどのように関与しているかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 野生型マウスと CD109 ノックアウトマウスそれぞれの骨組織を用いて、形態学的、生化学的、免疫組織化学的解析を行い、CD109 の有無が骨組織における破骨細胞および骨芽細胞の形態にどのような影響を与えるか調べるとともに、各々の細胞における CD109 の発現を観察する。

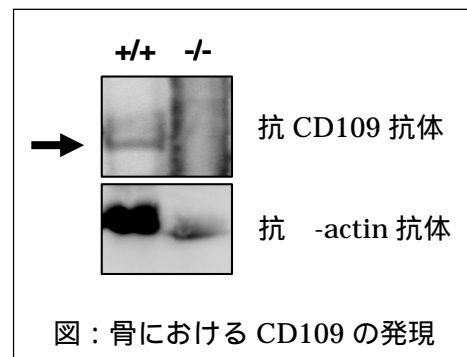
また、多核巨細胞を認める種々のヒト組織検体を用いた免疫組織化学的解析により、それらの腫瘍における CD109 の発現分布を解析する。

- (2) 野生型マウスと CD109 ノックアウトマウスより初代培養骨髄単核球および骨

芽細胞を回収し、それぞれにおける CD109 の発現の有無を確認する。また、これらのマウス初代培養細胞に加え、ヒト骨肉腫由来細胞株(MG-63, U-2 OS など)やヒトおよびマウス間葉系間質細胞由来細胞株(UE7T-13, C3H10T1/2 など)を用いて、CD81 との関係を含めた細胞融合における CD109 の機能や、骨肉腫を含む多核巨細胞を惹起する腫瘍における CD109 の役割について、*in vitro* で検討する。

4. 研究成果

- (1) 野生型マウスおよび CD109 ノックアウトマウスの粉碎骨を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ CD109 の発現が確認された(図:矢印)。



続いて、ヒト検体あるいは野生型および CD109 ノックアウトマウスの骨組織を用いて免疫組織化学的解析を行ったところ、ヒトおよびマウスの骨に存在する破骨細胞が CD109 陽性であっただけでなく、骨芽細胞も CD109 陽性であることが明らかとなった。なお、CD109 ノックアウトマウスの骨組織においても野生型とほぼ同様の破骨細胞が観察された一方で、骨芽細胞は CD109 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ、立方型をした幼若なものが多く観察され、CD109 が骨芽細胞の分化に関与する可能性が示唆された。

さらにヒト骨肉腫・骨巨細胞腫などで出現する破骨型多核巨細胞において CD109 が高発現することを免疫組織化学的に確認した。一方、結核、サルコイドーシス、異物肉芽腫、巨細胞性心筋炎で認められる非腫瘍性の多核巨細胞では CD109 の発現を認めないか、弱い発現を認めるのみであった。

以上のことから、CD109 は細胞融合により生じる多核巨細胞の中でも骨組織における破骨細胞と、腫瘍組織中の破骨型多核巨細胞に特異的に発現している可能性を示唆する結果が得られた。

- (2) 野生型マウスおよび CD109 ノックアウト

トマウスそれぞれから初代培養骨髄単核球および骨芽細胞を得ることに成功した。続いて、ウエスタンブロッティングにより骨髄単核球を分化させた破骨前駆細胞と骨芽細胞のいずれにおいてもCD109が発現していることを明らかにした。

次に、これらの初代培養細胞を用いた共培養を行ったところ、破骨前駆細胞あるいは骨芽細胞のいずれかがCD109ノックアウトマウス由来である場合に、破骨前駆細胞の細胞融合および多核化が阻害されることが明らかとなり、CD109が破骨細胞の細胞融合に関与していることが示唆された。ただし、(1)で述べたように、CD109ノックアウトマウスの骨組織において多核の破骨細胞が観察されており、細胞レベルと個体レベルで異なった結果が得られた原因について、今後さらなる解析が必要と考えられた。

上記の初代培養細胞に加えて、骨組織由来の各種細胞株を用いてCD109の機能解析を行っていくために、まずCD109を高発現する細胞株を検索した。骨芽細胞系細胞株としてMG-63およびU-2OSなどを、間葉系間質細胞由来細胞株としてUE7T-13およびC3H10T1/2を、破骨細胞系細胞株としてRAW264.7を用いて検討を行ったところ、特にMG-63でCD109が高発現していることが明らかとなった。

間葉系間質細胞における分化のモデル細胞として知られるマウス由来のC3H10T1/2を用いて骨芽細胞への分化誘導実験を行ったところ、誘導初期に最もCD109の発現が増強することが明らかとなり、*in vitro*でもCD109が間質細胞から骨芽細胞への分化に関与している可能性が示唆された。ヒト由来細胞株においても、より未分化な間葉系細胞株であるUE7T-13におけるCD109の発現は骨肉腫細胞株に比べると弱く、分化あるいは腫瘍化にともなってCD109の発現が増強している可能性が考えられた。

質量分析法の結果から、CD109がCD81と結合している可能性を考え、免疫沈降法により検討した結果、これらが共沈することが明らかとなった。

また、CD109の発現が高かったMG-63を用いて、RNA干渉法によりCD109のノックダウンを行った後、TGF- β を投与し、ウエスタンブロッティングによりSMAD2のリン酸化を経時的に観察することで、TGF- β シグナルとCD109の関連について検討した。これまでのところMG-63細胞株を用いた検討においては、CD109の多寡とTGF- β シグナルの間に明らかな関係は認められてお

らず、今後CD109がその他のシグナル経路に与える影響を検討する必要があると考えられた。

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)

(雑誌論文)(計 11 件)

Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, Maruyama S, Ishikawa Y, Nishiyama T, Kiyoi H, Kato T, Ando K, Weng L, Mii S, Asai M, Mizutani Y, Watanabe O, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M. Identification of Meflin as a potential marker for mesenchymal stromal cells. *Sci Rep*. 査読有 6:22288, 2016.
DOI: 10.1038/srep22288

Sakakura H, Mii S, Hagiwara S, Kato T, Yamamoto N, Hibi H, Takahashi M, Murakumo Y. CD109 is a component of exosome secreted from cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 469: 816-822, 2016.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.12.063

Kimura M, Mii S, Sugimoto S, Saida K, Morinaga S, Umemura M. Low-grade cribriform cystadenocarcinoma arising from a minor salivary gland: A case report. *J Oral Sci*. 査読有 58: 145-149, 2016.
DOI: 10.2334/josnusd.58.145

Zhang JM, Murakumo Y, Hagiwara S, Jiang P, Mii S, Kalyoncu E, Saito S, Suzuki C, Sakurai Y, Numata Y, Yamamoto T, Takahashi M. CD109 attenuates TGF- β 1 signaling and enhances EGF signaling in SK-MG-1 human glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 459: 252-258, 2015.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.093

Omori K, Asai M, Kuga D, Ushida K, Izuchi T, Mii S, Enomoto A, Asai N, Nagino M, Takahashi M. Girdin is phosphorylated on tyrosine 1798 when associated with structures required for migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 458: 934-940, 2015.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.065

Yamamura Y, Asai N, Enomoto A, Kato T, Mii S, Kondo Y, Ushida K, Niimi K, Tsunoda N, Nagino M, Ichihara S,

Furukawa K, Maeda K, Murohara T, Takahashi M. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. *Cancer Res.* 査読有 75: 813-823, 2015. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1317

Miyachi H, Mii S, Enomoto A, Murakumo Y, Kato T, Asai N, Komori K, Takahashi M. Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein grafts and efficacy of atelocollagen-mediated application of small interfering RNA for vein graft failure. *J Vasc Surg.* 査読有 60: 479-489, 2014. DOI: 10.1016/j.jvs.2013.06.080

Kato T, Enomoto A, Watanabe T, Haga H, Ishida S, Kondo Y, Furukawa K, Urano T, Mii S, Weng L, Ishida-Takagishi M, Asai M, Asai N, Kaibuchi K, Murakumo Y, Takahashi M. TRIM27/MRTF-B-Dependent Integrin $\beta 1$ Expression Defines Leading Cells in Cancer Cell Collectives. *Cell Rep.* 査読有 7: 1156-1167, 2014. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.03.068

Niimi K, Murakumo Y, Watanabe N, Kato T, Mii S, Enomoto A, Asai M, Asai N, Yamamoto E, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Takahashi M. Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma cells. *Cancer Sci.* 査読有 105: 545-552, 2014. DOI: 10.1111/cas.12390

Sakakura H, Murakumo Y, Mii S, Hagiwara S, Kato T, Asai M, Hoshino A, Yamamoto N, Sobue S, Ichihara M, Ueda M, Takahashi M. Detection of a soluble form of CD109 in serum of CD109 transgenic and tumor xenografted mice. *PLoS One.* 査読有 9:e83385, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0083385

Watanabe N, Mii S, Asai N, Asai M, Niimi K, Ushida K, Kato T, Enomoto A, Ishii H, Takahashi M, Murakumo Y. The REV7 subunit of DNA polymerase ζ is essential for primordial germ cell maintenance in the mouse. *J Biol Chem.* 査読有 288: 10459-10471, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M112.421966

[学会発表](計 12 件)

Masaki Sunagawa, Shinji Mii, Masato Nagino, Masahide Takahashi,

CD109-deficiency suppresses chemically induced H-ras mutation and tumorigenesis in mouse skin. Tenth AACR/JCA Joint Conference, 2016 年 2 月 18 日, マウイ (アメリカ合衆国)

砂川 真輝 三井 伸二 榑野 正人,高橋 雅英,皮膚腫瘍形成における CD109 の役割の検討 . 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日,名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

三井 伸二,星野 昭芳,山口 朗,高橋 雅英, CD109 タンパク質の欠損により骨芽細胞および破骨細胞の異常を伴う骨減少症が生じる . 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日,名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

砂川 真輝 三井 伸二 榑野 正人,高橋 雅英,皮膚腫瘍形成における CD109 の役割の検討 . 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日,名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

三井 伸二,CD109 タンパク質の欠損により骨芽細胞および破骨細胞の異常を伴う骨減少症が生じる .2014 年度 新学術領域研究 修飾シグナル病 第 3 回若手ワークショップ, 2014 年 9 月 30 日,ホテルあかね (神奈川県湯河原町)

村雲 芳樹,三井 伸二,高橋 雅英,CD109 は神経膠芽腫細胞株において細胞依存的に TGF- β 1、EGF シグナルを制御する . 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日,パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

砂川 真輝 三井 伸二 榑野 正人,高橋 雅英,皮膚腫瘍形成における CD109 の役割の検討 . 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 26 日,パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

村雲 芳樹,三井 伸二,高橋 雅英,CD109 は神経膠芽腫細胞株 SK-MG-1 にて TGF- β 1 シグナル抑制的、EGF シグナル促進的に働く . 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24 日,ANA クラウンプラザホテル広島 (広島県広島市)

三井 伸二 坂倉 寛紀 村雲 芳樹,浅井 真人,浅井 直也,市原 正智,高橋 雅英,遺伝子改変マウスを用いた癌関連タンパク質 CD109 の機能解析および新規腫瘍マーカーへの応用可能性, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 25 日,広島国

際会議場（広島県広島市）

村雲 芳樹, 三井 伸二, 浅井 直也, 新美 薫, 加藤 琢哉, 榎本 篤, 高橋 雅英, DNA 修復蛋白 Rev7 はマウスの始原生殖細胞の維持のために必須である. 2013 年 10 月 3 日, 第 72 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

三井 伸二, 遺伝子改変マウスを用いた癌関連タンパク質 CD109 の機能解析および新規腫瘍マーカーへの応用可能性. 平成 25 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」がん若手研究者ワークショップ, 2013 年 9 月 6 日, 蓼科グランドホテル滝の湯 (長野県茅野市)

三井 伸二, 坂倉 寛紀, 村雲 芳樹, 市原正智, 高橋 雅英, TGF- 関連タンパク質 CD109 の新規腫瘍マーカーとしての可能性についての検討. 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 7 日, ロイトン札幌 (北海道札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

宮園浩平, 秋山徹, 宮島篤, 宮澤恵二編, 三井伸二, 高橋雅英他 91 名著 (著者多数のため省略), 羊土社, 膨大なデータを徹底整理するサイトカイン・増殖因子キーワード事典. 2015, 420(275-279)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 伸二 (MII, Shinji)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80646505

(2) 研究分担者

なし