

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10435

研究課題名(和文) RAGEにより誘導される骨肉腫幹細胞モデルの確立とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of osteosarcoma stem cell model induced by RAGE and elucidation of its molecular mechanism

研究代表者

武内 章彦 (Takeuchi, Akihiko)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70512218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：後期糖化産物受容体(Receptor for advanced glycation end-products: RAGE)を強制発現させた骨肉腫細胞(HOS-RAGE)はコントロール(HOS-mock)に対して幹細胞マーカー(Nanog, Sox2)を強く発現し、増殖能、遊走能が高かった。網羅的な遺伝子解析で、MYCの発現が更新し、さらに網羅的なmiRNAの解析ではある特定のmiRNAの発現が抑制されていた。それは他の癌腫においてSOX2, NANOG, N-MYCを制御することが報告されており、RAGEがある特定のmiRNAを抑制することで幹細胞の性質を生み出している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：RAGE (receptor for advanced glycation end-products) overexpressing cells in osteosarcoma (HOS-RAGE) showed the high cell proliferation and migration ability compared to the control (HOS-mock). HOS-RAGE strongly expressed the stem cell marker (NANOG and SOX2). Microarray analysis of gene expression profiling showed the upregulation of MYC (oncogene). Microarray analysis of miRNA expression profiling showed the downregulation of a certain miRNA. It has been reported that a certain miRNA regulated the expression of pluripotency genes such as SOX2, NANOG and N-MYC in other cancers. Our results suggest the RAGE could suppress the expression of a certain miRNA and may promote the cancer stem-like cell characteristics in osteosarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに肉腫の転移にかかわる分子として、後期糖化産物受容体 (Receptor for advanced glycation end-products: RAGE) に注目して研究を行ってきた。軟骨系腫瘍 (内軟骨腫・軟骨肉腫) における RAGE、HMGB1 及び、esRAGE (RAGE のスプライズバリエーション) 発現が軟骨肉腫の組織学的悪性度、臨床経過と有意に相関することを見出し報告した (Takeuchi A ら、Cancer 2007)。さらに、RAGE 遺伝子をヒト線維肉腫細胞に遺伝子導入することで、細胞の遊走能、浸潤能、転移能が有意に増加し、それが RAGE シグナル遮断薬である低分子ヘパリン処理により抑制されることを見出した (Takeuchi A ら、Cancer Sci. 2013)。さらに、平成 23-25 年度に若手 B 研究により RAGE 遺伝子を導入して RAGE を強制発現させたヒト骨肉腫細胞では、CD133、CD24、CD44、CXCR4 などの幹細胞マーカーが出現し、腫瘍塊形成能、薬剤耐性などの肉腫幹細胞の性質を有することを見出した。本研究では RAGE 強制発現により誘導される骨肉腫幹細胞様細胞モデルの確立と発生誘導の分子メカニズムの解明および機能的に働く分子の同定、さらにそれを標的とした新たな治療戦略創出へと繋げることを目的とした。

2. 研究の目的

申請者らが樹立した RAGE 過剰発現ヒト骨肉腫細胞株 (HOS-RAGE 細胞株) を用いて、肉腫幹細胞発生誘導に関わる遺伝子を同定し、その遺伝子の抑制により肉腫幹細胞の形質が失われるか、あるいは親株の HOS 細胞、コントロール細胞 (HOS-mock 細胞株) にその候補遺伝子を導入することで肉腫幹細胞の形質を示すかを解析する。併せて、HOS-RAGE 細胞株で特異的に発現している miRNA も網羅的に解析する。骨肉腫幹細胞様細胞で特異的に発現している遺伝子あるいは miRNA を解析する

ことで、新たな病態解明および治療ターゲットの創出を行う。

3. 研究の方法

平成 23-25 年度に若手 B 研究により樹立した RAGE 過剰発現ヒト骨肉腫細胞株 (HOS-RAGE 細胞株) と対称の mock 導入ヒト骨肉腫細胞株 (HOS-mock 細胞株) を用いて以下の assay を計画した。

1. 網羅的遺伝子解析

HOS-RAGE 細胞株と HOS-mock 細胞株を Ultra Low Attachment Culture Dish で培養し、HOS-RAGE 細胞株は spheroid から RNA を精製した。HOS-mock 細胞株は spheroid を形成せず、接着細胞から RNA を精製した。これらを Affimetrix genechip pathway 解析を施行した。

2. 幹細胞マーカー発現の解析

上記 1 で精製した RNA を用いて、Nanog, SOX2 といった幹細胞マーカーの発現をリアルタイム PCR で解析した。

3. 細胞増殖能の解析

HOS-RAGE 細胞株と HOS-mock 細胞株の細胞増殖能を 24、48、72 時間後に細胞数をカウントし解析した。

4. 細胞遊走能の解析

細胞遊走能を wound scratch 法により HOS-RAGE 細胞株と HOS-mock 細胞株で wound closure area を確認した。

5. 網羅的 miRNA の解析

上記 1 と同様に RNA を精製。これらを NEXTflex Small RNA-Seq kit v3 を使用し、イルミナ社のプロトコールに従って 149-156bp のライブラリーを作成。Multiplex 法によるシーケンス解析を行い、その後バイオインフォマティクス解析をしクラスタリング解析およびヒートマップの作成を施行した。

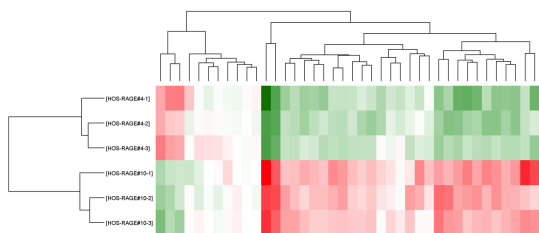
6. 網羅的解析で抽出した特定の miRNA の発現の解析

HOS-RAGE 細胞株と HOS-mock 細胞株における特定の miRNA の発現の解析をリアルタイム PCR による解析を行った。

4. 研究成果

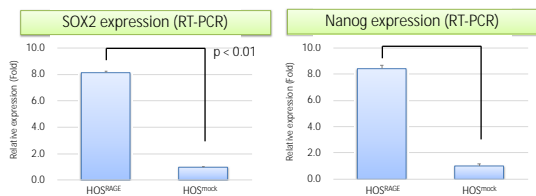
1. 網羅的遺伝子解析

通常培養で解析した結果とは異なり、特定の癌遺伝子の高発現をみとめた。その中で、癌遺伝子である MYC の発現が亢進するという興味深い結果を得た。



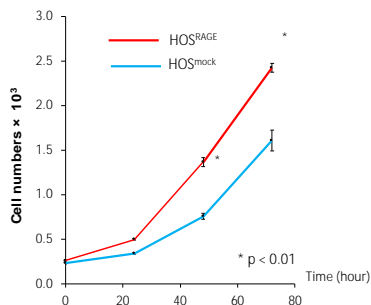
2. 幹細胞マーカー発現の解析

HOS-RAGE 細胞株では、有意に HOS-mock 細胞株よりも Nanog, SOX2 の発現が高かった。



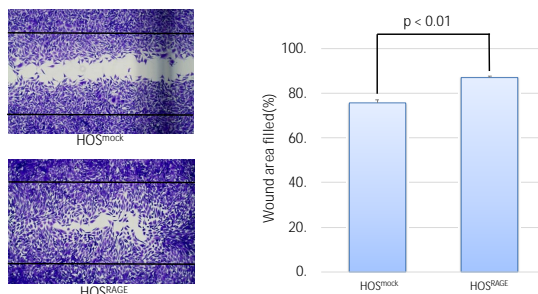
3. 細胞増殖能の解析

HOS-RAGE 細胞株と HOS-mock 細胞株の細胞増殖能を比較すると、24, 48, 72 時間後それぞれにおいて HOS-RAGE 細胞株が有意に細胞増殖能が高かった。



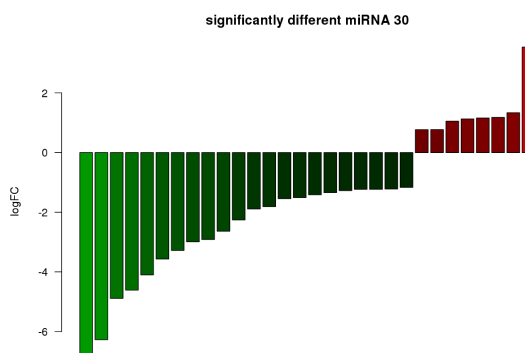
4. 細胞遊走能の解析

HOS-RAGE 細胞株は HOS-mock 細胞株よりも有意に wound closure area が大きく遊走能が高かった。



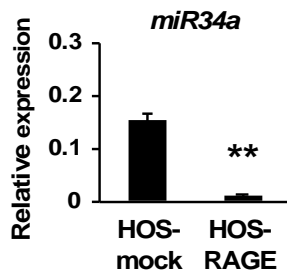
5. 網羅的 miRNA の解析

その結果有意に増加する miRNA と低下する miRNA を 30 個見いだすことができた。平成 27 年度に網羅的遺伝子解析で見出した遺伝子と関連性があるものもピックアップされており、さらに、他の癌腫で幹細胞での発現が報告されているものもピックアップされた。その中で、miR-34a の発現が HOS-RAGE 細胞株において有意に低下していることに注目した。



6. 網羅的解析で抽出した特定の miRNA の発現の解析

HOS-RAGE 細胞株の miR-34a の発現は、HOS-mock 細胞株よりも有意に低かった。miR-34a は他の癌腫において SOX2, NANOG, N-MYC といった多能性遺伝子を制御することやがん抑制遺伝子である p53 によって転写活性化されることが報告されており、これまでの解析で見出した SOX2, NANOG, MYC の発現に関わっている可能性が示唆された。RAGE が miR-34a の発現抑制にどのように関わっているかさらなる解析を進めている。



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 14 件)

1. Higuchi T, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Abe K, Taniguchi Y, Tsuchiya H. Treatment outcomes of the simple bone cyst: A comparative study of 2 surgical techniques using artificial bone substitutes. *Medicine (Baltimore)*. 2018 May;97(18):e0572. doi: 10.1097/MD.00000000000010572. (査読有)
2. Higuchi T, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Igarashi K, Abe K, Taniguchi Y, Aiba H, Tsuchiya H. Calcium Phosphate Cement in the Surgical Management of Benign Bone Tumors. *Anticancer Res*. 2018 May;38(5):3031-3035. (査読有)
3. El-Far AHAM, Munesue S, Harashima A, Sato A, Shindo M, Nakajima S, Inada M, Tanaka M, Takeuchi A, Tsuchiya H, Yamamoto H, Shaheen HME, El-Sayed YS, Kawano S, Tanuma SI, Yamamoto Y. In vitro anticancer effects of a RAGE inhibitor discovered using a structure-based drug design system. *Oncol Lett*. 2018 Apr;15(4):4627-4634. doi: 10.3892/ol.2018.7902. (査読有)
4. Higuchi T, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Abe K, Taniguchi Y, Araki Y, Tada K, Tsuchiya H. Successful joint preservation of distal radius osteosarcoma by en bloc tumor excision and reconstruction using a tumor bearing frozen autograft: a case report. *BMC Surg*. 2018 Mar 1;18(1):12. doi:10.1186/s12893-018-0346-y. (査読有)
5. Takeuchi A, Suwanpramote P, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Higuchi T, Abe K, Tsuchiya H. Mid-to long-term clinical outcome of giant cell tumor of bone treated with calcium phosphate cement following thorough curettage and phenolization. *J Surg Oncol*. 2018 Jan 8. doi: 10.1002/jso.24971. (査読有)
6. Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takeuchi A, Hayashi K, Yamamoto N, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H. Phase 1/2 study of immunotherapy with dendritic cells pulsed with autologous tumor lysate in patients with refractory bone and soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2017 May 1;123(9):1576-1584. doi:10.1002/cncr.30606. (査読有)
7. Rosario M, Takeuchi A, Yamamoto N, Hayashi K, Miwa S, Higuchi T, Abe K, Taniguchi Y, Aiba H, Tanzawa Y, Murakami H, Tsuchiya H. Pathogenesis of Osteosclerotic Change Following Treatment with an Antibody Against RANKL for Giant Cell Tumour of the Bone. *Anticancer Res*. 2017 Feb;37(2):749-754. (査読有)
8. Higashida H, Furuhashi K, Yamauchi AM,

- Deguchi K, Harashima A, Munesue S, Lopatina O, Gerasimenko M, Salmina AB, Zhang JS, Kodama H, Kuroda H, Tsuji C, Suto S, Yamamoto H, Yamamoto Y. Intestinal transepithelial permeability of oxytocin into the blood is dependent on the receptor for advanced glycation end products in mice. *Sci Rep*. 2017 Aug 11;7(1):7883. doi:10.1038/s41598-017-07949-4. (査読有)
9. Takeuchi A, Tsuchiya H, Ishii T, Nishida Y, Abe S, Matsumine A, Kawai A, Yoshimura K, Ueda T. Clinical outcome of recurrent giant cell tumor of the extremity in the era before molecular target therapy: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 Jul 22;17:306. doi: 10.1186/s12891-016-1163-z. (査読有)
10. Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Miwa S, Munesue S, Yamamoto Y, Tsuchiya H. Clinical relevance of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in myxoid liposarcoma. *BMC Cancer*. 2016 Jul 11;16:442. doi: 10.1186/s12885-016-2524-6. (査読有)
11. Takeuchi A, Yamamoto N, Hayashi K, Miwa S, Takahira M, Fukui K, Oikawa T, Tsuchiya H. Tenosynovial giant cell tumors in unusual locations detected by positron emission tomography imaging confused with malignant tumors: report of two cases. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 Apr 26;17:180. doi: 10.1186/s12891-016-1050-7. (査読有)
12. Abouzed TK, Munesue S, Harashima A, Masuo Y, Kato Y, Khailo K, Yamamoto H, Yamamoto Y. Preventive Effect of Salicylate and Pyridoxamine on Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*. 2016;2016:1786789. doi: 10.1155/2016/1786789. (査読有)
13. Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Ninomiya I, Munesue S, Harashima A, Harada S, Yamamoto H, Ohta T. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer*. 2016 Oct;19(4):1052-65. doi: 10.1007/s10120-015-0579-8. (査読有)
14. Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Watanabe K, Miwa S, Tsuchiya H. Successful correction of tibial bone deformity through multiple surgical procedures, liquid nitrogen-pretreated bone tumor autograft, three-dimensional external fixation, and internal fixation in a patient with primary osteosarcoma: a case report. *BMC Surg*. 2015 Dec 7;15:124. doi: 10.1186/s12893-015-0112-3. (査読有)
- [学会発表](計5件)
1. 武内章彦, 山本憲男, 林 克洋, 樋口貴史, 阿部健作, 谷口裕太, 相羽 久輝, 荒木 麗博, 土屋弘行 びまん型腱滑膜巨細胞腫に対するザルトプロフェンの新規薬物療法を目指したパイロットスタディ 第50回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会(東京)2017年7月13-14日
2. 武内章彦, 山本憲男, 林 克洋, 樋口貴

史, 阿部健作, 谷口裕太, 相羽 久輝, 荒木 麗博, 土屋弘行 小児膝関節周囲骨肉腫に対する関節温存再建術後の骨端の成長 第 50 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会(東京)2017年7月13-14日

3. 武内章彦, 山本憲男, 村上英樹, 林 克洋, 樋口貴史, 阿部健作, 谷口裕太, 相羽 久輝, 荒木 麗博, 土屋弘行 骨巨細胞腫に対するデノスマブ投与後の骨形成のメカニズムに関する解析 第 32 回日本整形外科基礎学術集会(那覇)2017年10月26-27日

4. 武内章彦, 山本憲男, 林 克洋, 三輪真嗣, 稲谷弘幸, 樋口貴史, 阿部健作, 谷口裕太, 土屋弘行 軟部腫瘍切除術における術中エコーガイドの有用性と展望 第 49 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会(東京)2016年7月14-15日

5. 武内章彦, 山本憲男, 林 克洋, 三輪真嗣, 稲谷弘幸, 青木 裕, 樋口貴史, 阿部健作, 棟居聖一, 山本靖彦, 土屋弘行 粘液型脂肪肉腫における PPAR の発現と予後との関連の解析 第 30 回日本整形外科基礎学術集会(富山)2015年10月22-23日

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: Drug for preventing, treating or preventing metastasis of giant cell tumor that occurs in bone or soft parts, chondrosarcoma, or osteosarcoma, local injection for arterial embolization, and artificial bone

発明者: 武内章彦、土屋弘行

権利者: 日本ケミファ

種類: 特許

番号: W02015046388A1

出願年月日: 2015年4月2日

国内外の別: 国外

取得状況(計1件)

名称: 骨・軟部に発生する巨細胞性腫瘍または軟骨肉腫の予防または治療剤

発明者: 武内章彦、土屋弘行

権利者: 日本ケミファ

種類: 特許

番号: 5865995

取得年月日: 2016年1月8日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 章彦 (TAKEUCHI Akihiko)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 70512218

(2) 研究分担者

山本 靖彦 (YAMAMOTO Yasuhiko)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 20313637

(3) 連携研究者

棟居 聖一 (MUNESUE Seiichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 10399040

原島 愛 (HARASHIMA Ai)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 50705522