



SPRR1A is a potential therapeutic target for osteosarcoma: in vitro and in vivo evaluations using generated artificial osteosarcoma cancer stem cell-like cells

宮本, 智弘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2025-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9070号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496351>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

SPRR1A is a potential therapeutic target for osteosarcoma:
in vitro and *in vivo* evaluations using generated
artificial osteosarcoma cancer stem cell-like cells

骨肉腫において *SPRR1A* は潜在的な治療標的である；

人工骨肉腫幹細胞様細胞を用いた *in vitro* および *in vivo* での評価

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 整形外科学 黒田 良祐 教授)

宮本 智弘

はじめに

骨肉腫は10歳代に好発する骨原発悪性腫瘍であり本邦では年間発生200例以下のまれな悪性腫瘍である。1970年代以降、化学療法と広範切除にて治療成績は大幅に向上したが、その傾向は近年あまり変化がない。この骨肉腫の治療抵抗性、再発、転移には癌幹細胞(Cancer stem cells, CSCs)が関与していると言われている。このCSCsに対する治療法の探索は悪性腫瘍患者の予後改善のために極めて重要であるが、CSCsは細胞集団のごく一部であり、研究のために収集することは非常に困難である。そこで我々は先行研究にて既存の骨肉腫細胞株MG-63にOCT3/4, KLF4, SOX2を遺伝子導入することで、CSCsの特性を併せ持つ人工骨肉腫幹細胞MG-OKSを作成することに成功した。

このMG-OKSに対して網羅的遺伝子解析を施行したところ、間葉系腫瘍である骨肉腫において上皮に関連した遺伝子発現が上昇しているという結果が得られた。発現上昇を認めた遺伝子のうち、本研究ではsmall proline-rich protein 1A (SPRR1A)に着目した。SPRR1Aは正常な皮膚や食道などに存在し、バリア機能を持つヒト上皮角化肥厚膜の構成成分としての機能や、扁平上皮細胞の分化マーカーとしての役割が知られている。SPRR1Aの発現と悪性腫瘍との関連については、過去の報告において大腸がんや膵管腺癌の予後因子となる可能性について言及されている。癌本来の系統では発現しない分子の発現が不良な予後と関連しているといった報告もあり、このSPRR1Aの発現の上昇は骨肉腫の予後不良に関連する可能性があるという仮説を立て研究を開始した。

対象と方法

実験計画としてまず実験対象となるMG-OKSを作成し、Lipofection法を用いてSPRR1AのsiRNAを導入する(siMG-OKS)。同様の手順でscramble siRNAを導入したコントロール群を作成し(scMG-OKS)、これら3群を比較してSPRR1Aの機能を評価する。まずin vitroにおいて、SPRR1Aの発現に関してはRT-qPCRにて遺伝子発現を、Western blotにてタンパク発現を確認し、細胞形態を位相差顕微鏡にて観察した。さらに細胞増殖能をWST-8 assay、細胞浸潤能をscratch assayにて評価した。また次世代シーケンスを用いてSPRR1Aのknockdownによる遺伝子発現の変化を評価した。次にin vivoにて腫瘍形成能について評価した。作成した3群をヌードマウスの背部皮下に200万細胞ずつ移植し、4週間後に形成された腫瘍を回収、腫瘍体積および組織学的評価としてKi-67の発現を検討した。

結果

SPRR1Aの発現に関してsiMG-OKS群はMG-OKS群、scMG-OKS群と比較し、qRT-PCRにて遺伝子発現、Western blotにてタンパク発現の有意な低下を認めた($P < 0.05$)。細胞形態

に関して、MG-OKS の特徴として見られた細胞突起形成の伸張が siMG-OKS においては減少を認めた。細胞増殖能を WST-8 assay にて評価し、siMG-OKS 群は他 2 群と比較して有意な細胞増殖能の低下を認めた ($P < 0.05$)。細胞浸潤能に関して scratch assay を用いて評価したところ、siMG-OKS 群は他 2 群と比較して有意な細胞浸潤能の低下を認めた ($P < 0.05$)。続いて各群の細胞に対して次世代シーケンスを施行したところ、siMG-OKS 群において Focal adhesion kinase (FAK) を含む細胞接着に関わる遺伝子の発現低下や、cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) や cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B) など細胞周期に関わる遺伝子発現の変化を認めた。また siMG-OKS 群において発現の低下を認めた遺伝子のパスウェイ解析からは 'Focal Adhesion PI3K-Akt-mTOR signaling pathway' を含む 11 のパスウェイが同定された。

In vivo において、3 群をそれぞれヌードマウスの背部皮下に移植し 4 週後に回収された腫瘍体積に関して、siMG-OKS 群では他 2 群と比較して有意な腫瘍体積の減少を認めた ($P < 0.05$)。各群から得られた腫瘍の切片を作成し、Ki-67 の蛍光免疫染色を施行した。画像解析ソフトを用いて Ki-67 の蛍光を定量化し各群を比較したところ、siMG-OKS 群は他 2 群と比較して有意に Ki-67 の発現の低下を認めた ($P < 0.05$)。

考察

CSCs は骨肉腫の治療抵抗性に関わる重要な一因であるとされているが、細胞集団のごく一部であるため研究対象とするための回収が非常に困難である。そのため我々は先行研究にて人工的に骨肉腫幹細胞様細胞を作成することでこの課題に対応し、これらの細胞において SPRR1A の発現が上昇していることを明らかにした。過去に骨肉腫と SPRR1A の関連を調べた報告は無く、その関連についてはいまだ不明である。本研究において SPRR1A を knock down することによって細胞突起形成の減少、細胞接着に関わる遺伝子の低下、細胞遊走能の低下を認めた。細胞の接着、遊走は複雑なプロセスから成り立っており、いくつかの腫瘍では FAK によって制御されていると言われている。過去の研究によると、乳癌細胞における Focal adhesion の阻害は細胞外マトリックスへの接着の減少、突起形成の減少、遊走能の低下をもたらすと報告されている。本研究の結果からは、FAK など Focal adhesion に関連する遺伝子発現の低下により細胞突起形成の減少、細胞遊走能の低下が誘導されたことが示唆された。そして SPRR1A の knock down によって生じた細胞増殖能の低下について、過去の報告では乳腺上皮細胞において細胞接着能の低下により FAK が不活性化されると、CDKN1B の分解が抑制されることで CDK2 が阻害され G1 期停止を引き起こすとされている。本研究の次世代シーケンスにおいても同様の遺伝子変化を認めており、細胞接着能の低下が細胞増殖能の低下につながった可能性が示唆された。免疫組織学的評価では siMG-OKS において Ki-67 の発現低下が見られた。過去の報告では骨肉腫において Ki-67 の高発現は骨肉腫患者の 5 年生存率の低下、遠隔転移の増加と関連するとされており、SPRR1A の発現抑制は骨肉腫の悪

性度の低下につながる可能性が示唆された。

本研究の limitation として、遺伝子導入は Lipofection 法を用いているため siRNA を介した knockdown は一過性である事、本研究で得られた結果がオフターゲット効果による影響の可能性が排除できない事、使用された細胞株が先行研究にて樹立された 1 種類に限定されている事、本研究で変動のあった遺伝子について臨床検体を用いた評価が行えていない事、臨床の間では転移という病態が重要であるが本研究では転移との関連などについて評価できていない事が挙げられ、これらの limitation を解決することが今後の研究課題となる。本研究は CSCs を対象とした研究の新たな取り組みであり、骨肉腫と SPRR1A の関連について言及した初めての研究となっている。さらに研究を進める事で骨肉腫の新たな治療法の開発に寄与する可能性が示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3449 号	氏 名	宮本智弘
論文題目 Title of Dissertation	<p><i>SPRR1A</i> is a potential therapeutic target for osteosarcoma: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluations using generated artificial osteosarcoma cancer stem cell-like cells</p> <p>骨肉腫において <i>SPRR1A</i> は潜在的な治療標的である； 人工骨肉腫幹細胞様細胞を用いた <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での評価</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 野津 寛之 Chief Examiner</p> <p>副 査 堀江 真史 Vice-examiner</p> <p>副 査 勝 = 郁夫 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

背景

近年、骨肉腫の治療抵抗性、再発、転移には癌幹細胞 (Cancer stem cells; CSCs) が関与しているとされている。しかしこの CSCs は細胞集団のごく一部であり、研究のために収集することは非常に困難である。そこで研究者らは先行研究にて既存の骨肉腫細胞株 MG-63 に OCT3/4、KLF4、SOX2 を遺伝子導入することで CSCs の特性を併せ持つ人工骨肉腫幹細胞 MG-OKS を作成することに成功した。この MG-OKS に対して網羅的遺伝子解析を施行したところ間葉系腫瘍である骨肉腫において、上皮に関連した遺伝子発現が上昇しているという結果が得られた。その遺伝子の中から過去の報告で悪性腫瘍との関連が報告されている small proline-rich protein 1A (SPRR1A) に着目し、骨肉腫との関連性について検討した。

方法

先行研究と同様の方法にてヒト骨肉腫細胞株 MG-63 に OCT3/4・KLF4・SOX2 を導入し、人工骨肉腫幹細胞である MG-OKS を作成した。この作製した細胞に Lipofection 法を用いて SPRR1A の siRNA

を導入する (siMG-OKS)。同様の手順で scramble siRNA を導入したコントロール群を作成し (scMG-OKS)、これら 3 群を比較して SPRR1A の機能を評価する。まず in vitro において、SPRR1A の発現について qRT-PCR で遺伝子発現、Western blot でタンパク発現を確認し、細胞形態を位相差顕微鏡にて確認した。さらに細胞増殖能を WST-8 assay、細胞遊走能を scratch assay にて評価した。また次世代シーケンスを用いて SPRR1A の knockdown による遺伝子発現の変化を評価した。次に in vivo にて腫瘍形成能を確認した。作成した 3 群をそれぞれヌードマウス背部皮下に移植し、4 週間後に形成された腫瘍の体積および組織学的評価として Ki-67 の発現を評価した。

結果

In vitro では siMG-OKS 群は他 2 群と比較して qRT-PCR にて遺伝子発現、Western blot にてタンパク発現の有意な低下を認めた ($P < 0.05$)。細胞形態に関して、MG-OKS の特徴として見られた細胞突起形成の伸張が siMG-OKS において減少を認めた。細胞増殖能を WST-8 assay にて評価し、siMG-OKS にて有意な増殖能の低下を認めた ($P < 0.05$)。Scratch assay で評価した細胞遊走能は siMG-OKS 群において有意な遊走能の低下を認めた ($P < 0.05$)。次世代シーケンスにおいては siMG-OKS 群において細胞接着に関わる遺伝子発現の低下や細胞周期に関わる遺伝子発現の変化を認めた。

In vivo では各群をヌードマウスに移植し 4 週後に回収された腫瘍に関して、siMG-OKS 群では他 2 群と比較して有意な腫瘍体積の減少を認めた ($P < 0.05$)。組織学的検討では siMG-OKS において有意に Ki-67 の発現低下を認めた ($P < 0.05$)。

考察

CSCs は骨肉腫の治療抵抗性に関わる重要な一因であるとされているが、細胞集団のごく一部であるため研究対象とするための回収が非常に困難である。そのため研究者らは先行研究にて人工的に骨肉腫幹細胞様細胞を作成することでこの課題に対応し、これらの細胞において SPRR1A の発現が上昇していることを明らかにした。SPRR1A の発現と悪性腫瘍との関連については、過去の報告において大腸がんや膵管腺癌の予後因子となる可能性について言及されているが骨肉腫との関連を調べた報告は無くその関連については不明である。今回研究者らは人工骨肉腫幹細胞に対して SPRR1A を knock down する事により in vitro では細胞増殖能と細胞遊走能、細胞突起形成の低下が見られ、in vivo では腫瘍体積の減少、腫瘍切片における Ki-67 の発現低下が見られることを初めて報告した。

結論

本研究は、人工骨肉腫幹細胞において上昇していた SPRR1A と骨肉腫の悪性度との関連性を研究したものであるが、人工骨肉腫幹細胞を用いた初めての研究である。SPRR1A を knock down することで細胞接着能が低下し、それに伴う細胞増殖能の抑制が腫瘍形成能の低下につながる事が示唆され、SPRR1A は骨肉腫において新たな治療標的になる可能性があると考えられた。SPRR1A が骨肉腫の新たな治療標的になる可能性について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。

これまでにない意義深い知見を見出した研究である。

本研究者自身も本病態に精通し、研究内容の重要性を理解している。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。