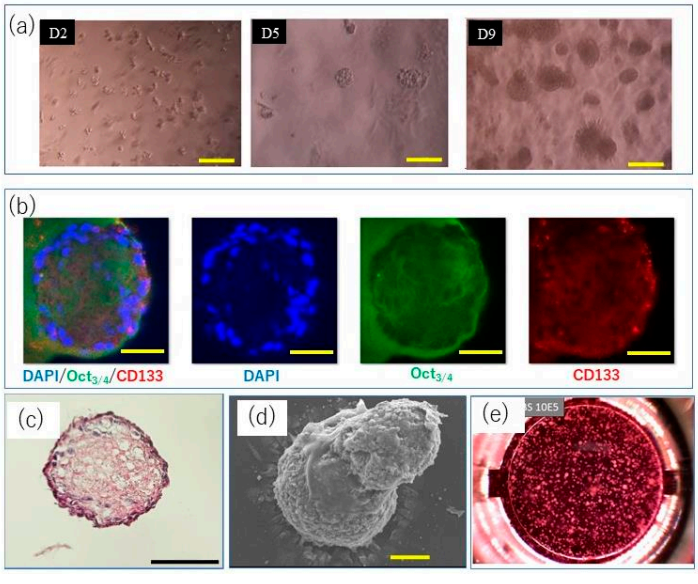
69　オルガノイドモデルを用いた肉腫肺転移メカニズム解明	松峯　昭彦

【目的】肉腫は、骨や軟部組織などの中胚葉由来の組織から発生する悪性腫瘍である。抗がん剤治療の導入により生命予後は改善したが、40%の症例は多発肺転移を来し、これらの症例に対する有効な治療薬の研究開発が進んでいない。肉腫は希少疾患であり、多数の臨床サンプルを用いた解析が困難であるが大きな問題であるが、単層培養では再現できない肉腫細胞を取り巻く微小環境の解析が、肉腫進展・転移の解明には必要である。近年、「自己複製能」と「多分化能」「薬剤抵抗性」などの性質を有する“がん幹細胞”の存在が明らかとなっている。肉腫においてもいくつかの報告はあるが、科学的根拠に根ざした報告は少ない。肉腫の発生・進展、転移のメカニズムを解明し、治療薬を開発するためには肉腫幹細胞の分離・同定が必要である。一方、多能性幹細胞や生検サンプルからの細胞を利用したオルガノイド研究が盛んになってきた。オルガノイドモデルは、細胞を 3 次元培養することにより得られる人為的に創出された組織体であり、解剖学的・機能的に生体に近い特徴を示す。2 次元単層培養の肉腫細胞株が、多様性に富む真の肉腫の姿を mimic していないことから、肉腫治療薬の開発のためには、肉腫の微小環境を再現した 3 次元肉腫オルガノイドモデルの確立が必要である。骨肉腫幹細胞から誘導した骨肉腫オルガノイドを用いて、骨肉腫の進展・肺転移成立のメカニズムを明らかにするとともに、治療薬の開発を行うことがこの研究の目的である。

【方法】生検の際に採取したヒト肉腫細胞とマウス骨肉腫細胞株を用いて、スフェロイド形成能を指標に幹細胞と考えられる細胞集団の同定を行い、同定した細胞集団における *Oct3/4*、*CD133*、*Nanog* など幹細胞マーカー遺伝子の発現の確認を real-time PCR および免疫染色で行った。そして、スフェロイドの形態の確認を行ったうえで、同定した骨肉腫幹細胞の骨分化刺激因子（IGF-2、BMP、FGF）での分化能を確認した。さらに骨肉腫幹細胞のマウスでの造腫瘍性を確認した。

【結果】マウス肉腫細胞株 LM8 から骨肉腫幹細胞と考えられる細胞集団を分離した。この細胞集団の遺伝子発現解析を行ったところ、*Oct3/4*、*CD133*、*Nanog* など幹細胞マーカー遺伝子が強く発現することが確認できた。また、ニッチ刺激因子（IGF-2、BMP、FGF）で刺激したところ、骨形成を伴いつつ骨肉腫様に分化することが明らかとなった。さらに、この骨肉腫幹細胞 100 細胞をマウス背部皮下に移植したところ、少ない細胞数にもかかわらず、腫瘤を形成することがわかった。以上のことから我々は、骨肉腫幹細胞を同定できたと考えている。骨肉腫幹細胞から誘導した骨肉腫 Organoid を用いて、骨肉腫の進展・肺転移成立のメカニズムを明らかにするとともに、治療薬の開発につなげたいと考えている。

マウス骨肉腫細胞株 LM8 の肉腫幹細胞の Characterization



69. オルガノイドモデルを用いた肉腫肺転移メカニズム解明

松峯　昭彦

福井大学 学術研究院 医学系部門 器官制御医学講座 整形外科学分野

Key words：肉腫，肉腫幹細胞，オルガノイドモデル，肺転移

緒　言

肉腫は、骨や軟部組織などの中胚葉由来の組織から発生する悪性腫瘍である。抗がん剤治療の導入により生命予後は改善したが、40％の症例は多発肺転移を来し、現在においても有効な治療薬の研究開発が進んでいない［1］。希少疾患である肉腫の進展・肺転移に対する有効な肉腫治療薬の研究開発が進まない理由として、1. 肉腫は希少疾患であるうえに、さらに 200 種類以上の異なった組織型が存在するため、多数の臨床サンプルを用いた解析が困難 2. 実際の肉腫には、空間的・時間的な腫瘍内 heterogeneity が存在し、単層培養での抗腫瘍効果を指標に開発され た治療薬は、実際の肉腫には低い治療効果しか認めないことが多い 3. 単層培養では再現できない肉腫細胞間、肉腫細胞－間質細胞間、肉腫細胞－基質間のコミュニケーションの解析が、肉腫進展の解明には重要であることなどが挙げられる［2］。したがって、治療薬開発のためには、実際の肉腫を試験管内で再現し、解析できるような研究モデルを構築することが課題である。

近年、「自己複製能」と「多分化能」「薬剤抵抗性」などの性質を有する“がん幹細胞”の存在が明らかとなっている。肉腫幹細胞は、肉腫薬物療法の重要な標的となり得ることから、side population 法や ALDH、CD133、CD117/Stro-1、CD271 などをマーカーとした分離が試みられているが［3］、これらの分離方法、マーカー遺伝子は、他の癌腫で行われてきたものを肉腫に応用しただけであり、科学的根拠に根ざした肉腫幹細胞の分離方法ではない。肉腫の発生・進展、転移のメカニズムを解明し、治療薬を開発するためには肉腫幹細胞の分離・同定が必要である。

一方、多能性幹細胞や生検サンプルからの細胞を利用したオルガノイド研究が盛んになってきた。オルガノイドモデルは、細胞を 3 次元培養することにより得られる人為的に創出された器官に類似した組織体であり、解剖学的・機能的に生体に近い特徴を示すことから、これまで解析が困難であった様々な生命現象に迫ることが可能であり、肉腫の進展・分化を解明するためには、最適のモデルと考えられる［4］。さらには、2 次元単層培養の肉腫細胞株が、多様性に富む真の肉腫の姿を mimic していないことから、肉腫治療薬の開発のためには、肉腫の微小環境を再現した 3 次元肉腫オルガノイドモデルの確立が必要である。

そこで、この研究では以下の手順で研究を進めることとした。1. 骨肉腫幹細胞と思われる細胞集団の同定、2. 骨肉腫幹細胞候補細胞の *in vitro* での characterization、3. 幹細胞の候補細胞の *in vivo* での characterization、4. 骨肉腫幹細胞候補細胞を一細胞遺伝子発現解析することによる、肉腫幹細胞を決定づけるマーカーの同定［5］を計画した。

その結果、マトリジェル内でスフェロイドを形成する細胞集団を同定し、これらは *Oct3/4*、*CD133*、*Nanog* など幹細胞マーカー遺伝子が高発現していることが確認できた。また、この幹細胞を骨分化刺激因子で刺激したところ骨に分化する能力を有していることも確認できた。さらに約 100 細胞からなるスフェロイドをマウス背部皮下に移植したところ、約 1 ヶ月で背部に 1 cm 程度の腫瘤を形成したことから、我々の分離した細胞塊は肉腫幹細胞の特性を強く有していると考えられる。現在、一細胞遺伝子発現解析することによる、肉腫幹細胞を決定づけるマーカーの同定を行っており、いくつかのマーカー候補をすでに同定している。骨肉腫幹細胞から誘導した骨肉腫 Organoid を用いて、骨肉腫の進展・肺転移成立のメカニズムを明らかにするとともに、治療薬の開発につなげたいと考えている。

方　法

1. 細胞および細胞培養

細胞はヒト骨肉腫細胞株である HOS、SaOS2、マウス骨肉腫細胞株 LM8、そして 38 歳男性、左上腕骨に発生した骨肉腫（初診時肺転移あり）からの初代培養細胞株を用いた。初代細胞は生検組織を実験用ハサミで細片化した後、ディスパーゼで高所処理して細胞を回収した。スフェロイドの形成は、マトリジェル基底膜マトリックス (Corning 社) を用いた。培養細胞株は 10%牡牛血清添加 DMEM を、初代培養細胞は、20%牡牛血清添加 DMEM を用いて 37℃、5%CO_2下で培養を行った。

2. 培養細胞の固定、HE 染色、蛍光免疫染色

培養細胞 2% PFA／0.1% TritonX-100 で 15 分間固定した後、EH 染色または免疫蛍光染色を行った。スフェロイド内部構造の観察は、15%および 30% Sucrose 処理した後、凍結組織包埋剤 (OCT コンパウンド) に包埋後、クライオスタットにて薄切することにより行った。細胞の免疫染色、ウエスタンブロッティングに使用した抗体を列挙する。Anti-VEGF Receptor 1 抗体 [Y103] (ab32152) (Abcam)、VEGF Receptor 2 (55B11) Rabbit mAb #2479 (Cell Signaling Technology)、PDGF Receptor β (28E1) Rabbit mAb #3169 (Cell Signaling Technology)、Oct-3/4 抗体 (C-10)：sc-5279 (Santa Cruz Biotechnology)、Anti-Nanog 抗体 (ab80892) (Abcam)、Anti-CD133 抗体 (ab19898) (Abcam)。

3. 電子顕微鏡解析

スフェロイドを Glutaraldehyde、osmium tetroxide で固定後、エタノールで脱水、isoamyl acetate、liquid carbon dioxide 処理し、gold palladium で metal coating した後、Transmission Electron microscope H7650 (Hitachi) にて観察した。

4. 細胞の分化誘導

形成されたスフェロイドにニッチ刺激因子（IGF-2、BMP、FGF など）を添加することにより、分化誘導を確認した。

5. アリザリンレッド染色

石灰化した骨結節の染色は、カルシウムに対し結合する色素・アリザリンレッド S を成分とする染色キット（石灰化染色キット：コスモ・バイオ株式会社）を用いた。

6. マウスへの骨肉腫幹細胞移植実験

マウスは C3H マウスを用いた。C3H マウスにマウス骨肉腫細胞株から誘導されたスフェロイド 1 つ（細胞数は約 100）を背部皮下に移植した。

7. 1 細胞遺伝子発現解析

LM8 からスフェロイドを 200 個単離し、1 細胞遺伝子発現解析（scRNA-seq）を行った。scRNA-seq のライブラリー調製は Chromium（10x Genomics）を用いた。

結果および考察

1. 骨肉腫幹細胞の単離

まず、左上腕骨に発生した 38 歳男性の骨肉腫患者の生検組織から作製した初代骨肉腫培養細胞から骨肉腫幹細胞を単離することを試みたが、当初培養骨肉腫細胞の培地内での増殖が不安定であったため、マウス骨肉腫細胞株（LM8）を用いて、マトリジェル内で 3 次元培養を行うことで幹細胞単離を試みた。LM8 を 10%FBS 添加培地で培養し、これを 24 穴プレート上のマトリジェルに植え替え、37℃で 3 次元培養を行った。5,000 細胞/well の濃度で細胞培養を開始した場合には、約 5 個のスフェロイドが形成されることから、LM8 のうち 0.1%程度の細胞が 3 次元培養可能となる幹細胞の特性を持っていると考えられた（図 1a)。また、このスフェロイドにおける幹細胞マーカー遺伝子の発現を Real-time PCR で確認したところ、親株に対して *Oct3/4*、*CD133*、*Nanog* など幹細胞マーカー遺伝子が高発現していることが確認できた。また、これらの遺伝子のタンパクレベルでの発現を免疫蛍光浅色で確認したところ、Oct3/4、CD133、Nanog が強く発現していることを、確認できた（図 1b)。さらに、このスフェロイドの凍結切片を

作製して内部構造を確認したところ、細胞はスフェロイドの外層 1～2 層に存在し、内部には結合組織が満たされていることがわかった（図 1c）。さらに、電子顕微鏡での SEM 像では球形のスフェロイドを観察することができた（図 1d）。さらに、このスフェロイドに骨分化刺激因子（IGF-2、BMP、FGF）を投与したところ、アリザリンレッド染色で強く染色されることがわかった。以上のことから、我々が分離した骨肉腫細胞スフェロイドは、骨肉腫幹細胞の性質を有していると考えられた。

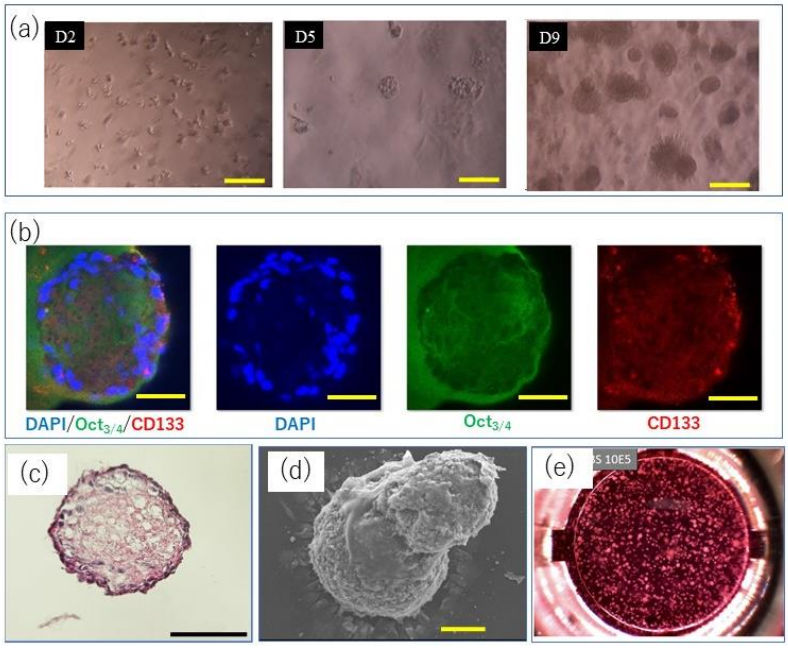


図 1. マウス骨肉腫細胞株 LM8 の肉腫幹細胞の characterization

a) マトリジェル内で肉腫細胞株を培養すると 0.1%の細胞が sheroid を形成。スケールバー：200μm。

b) sheroid を形成する細胞は OCT3/4 や CD133 などの幹細胞マーカーを発現。スケールバー：100μm。

c) spheroid の割面。中心部には細胞はない。スケールバー：100μm。

d) sheroid の電鍵像。スケールバー：100μm。

e) 分化誘導するとアリザリンレッド染色で染色される石灰化結節を産生する。

2. 骨肉腫幹細胞のマウス皮下への移植実験

癌幹細胞はマウス皮下に移植した際の造腫瘍性を検証するために、スフェロイド 1 つ分の約 100 細胞をマウス背部皮下に移植したところ、3 週間ですべてのマウスで腫瘤を形成することが明らかとなった（図 2）。

3. 1 細胞遺伝子発現解析

スフェロイドを形成する細胞集団は、肉腫幹細胞の可能性が高いが、スフェロイドを形成する細胞集団は、スフェロイドになった時点で heterogeneity を生じていうる可能性がある。そこで、スフェロイドを形成する細胞の 1 細胞遺伝子発現解析（scRNA-seq）を現在行っている。scRNA-seq は、肉腫を構成する多様な細胞を機能的に分類し、肉腫幹細胞に特異的に発現するマーカーを同定し、肉腫幹細を分離・抽出することが可能である。現在、肉腫幹細胞を特徴付ける 5 つの候補遺伝子を抽出した。他の肉腫細胞株やヒト肉腫での再現性を検証中である。

4. 今後の展開

本研究では、まず、マウス肉腫細胞株 LM8 から骨肉腫幹細胞をマトリジェル内でスフェロイドを形成することを指標に分離した。この骨肉腫細胞株の遺伝子発現解析を行ったところ、*Oct3/4*、*CD133*、*Nanog* など幹細胞マーカー遺伝子が強く発現することが確認できた。また、この骨肉腫スフェロイドにニッチ刺激因子（IGF-2、BMP、FGF）で刺激したところ、骨形成を伴いつつ骨肉腫様に分化することが明らかとなった。さらに、この骨肉腫幹細胞 100 細胞をマウス背部皮下に移植したところ、少ない細胞数にもかかわらず、腫瘤を形成することがわかった。以上のことから我々は、骨肉腫幹細胞を同定できたと考えている。

実際の患者から得られた臨床検体から肉腫幹細胞を分別し、さらにそこからオルガノイドを作製することにより、肉腫の進展・遠隔転移のメカニズムを解明するとともに治療薬の開発を続けることが究極の目標である。現在、培養細胞株でのみオルガノイドの作製は可能となったが、臨床検体での作製はまだ研究途上である。また、球形に増大したオルガノイドの中心部には細胞成分を認めないことから、実際の骨肉腫に近いオルガノイド作製のためには血管内皮細胞や mesenchymal stem cell、免疫担当細胞など微小環境を構築する細胞群が必要かもしれない［6］。さらに研究を進めていく予定である。



図 1. マウス骨肉腫細胞株 LM8 の肉腫幹細胞の移植実験
スフェロイド 1 つ分の 100 細胞をマウス背部皮下に移植したところ、
3 週間ですべのマウスで腫瘤を形成した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、福井大学学術研究院医学系部門分子遺伝学の菅井学教授、同薬理学の青木耕史教授、同整形外科学の李修成（外国人研究者）である。

文　献

1） Gómez J, Tsagozis P. Multidisciplinary treatment of soft tissue sarcomas: An update. World J Clin Oncol. 2020 Apr 24;11(4):180-189. doi:10.5306/wjco.v11.i4.180. Review. PubMed PMID: 32355640

2） Potter JW, Jones KB, Barrott JJ. Sarcoma-The standard-bearer in cancer discovery. Crit Rev Oncol Hematol. 2018 Jun;126:1-5. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.03.007. Epub 2018 Mar 29. Review. PubMed PMID: 29759550; PubMed Central PMCID: PMC5961738.

3） Brown HK, Tellez-Gabriel M, Heymann D. Cancer stem cells in osteosarcoma.Cancer Lett. 2017 Feb 1;386:189-195. doi: 10.1016/j.canlet.2016.11.019. Epub 2016 Nov 25. Review. PubMed PMID: 27894960.

4） Colella G, Fazioli F, Gallo M, De Chiara A, Apice G, Ruosi C, Cimmino A, de Nigris F. Sarcoma Spheroids and Organoids-Promising Tools in the Era of Personalized Medicine. Int J Mol Sci. 2018 Feb 21;19(2). pii: E615. doi:10.3390/ijms19020615. Review. PubMed PMID: 29466296; PubMed Central PMCID: PMC5855837.

5） Yi K, Ju YS. Patterns and mechanisms of structural variations in human cancer. Exp Mol Med. 2018 Aug 7;50(8):98. doi: 10.1038/s12276-018-0112-3. Review. PubMed PMID: 30089796; PubMed Central PMCID: PMC6082854.

6） Fong EL, Lamhamedi-Cherradi SE, Burdett E, Ramamoorthy V, Lazar AJ, Kasper FK, Farach-Carson MC, Vishwamitra D, Demicco EG, Menegaz BA, Amin HM, Mikos AG, Ludwig JA. Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr 16;110(16):6500-5. doi: 10.1073/pnas.1221403110. Epub 2013 Apr 1. PubMed PMID: 23576741; PubMed Central PMCID: PMC3631678.