

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：94416

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15560

研究課題名(和文) 転移先臓器を標的とした骨軟部腫瘍の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel target therapy for metastatic organ of malignant soft tissue tumor

研究代表者

伊藤 和幸 (Itoh, Kazuyuki)

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院(附属研究所)・研究所・所長

研究者番号：20301806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部悪性腫瘍の予後は肺転移により左右され、転移成立過程における転移巣での生着、Spheroidの役割が注目されている。申請者は、近赤外線を用いたマクロ顕微鏡を開発、Spheroidの周囲や深部までの動きを3次元的に連続観察記録する事が可能とし以下の事を明らかにした。Spheroidの周囲に多数のfilopodia(糸状突起)を認め、Rho family GTPaseの一つであるCdc42が、またSpheroid周囲のbuddingや内部の構造変化を認め、Rho-ROCKが制御している。今後は、浸潤転移を抑制する薬剤に関してSpheroidの動態に対する影響を検討し、臨床応用に結びつけたい。

研究成果の概要(英文)：Prognosis of malignant soft tissue tumor clinically depended on the lung metastasis. Recently, critical roles of spheroid formation and dynamics during metastasis formation was emphasized. We herein newly developed macro-microscopy with near-infrared light. Employing this system, we could analyze the marginal zones and also intra regions of malignant soft tissue tumor spheroid with time-lapse recording. Numerous filopodias were observed surrounding spheroid with Cdc42-dependent fashion and budding (sprouting) formation were observed occasionally with Rho-Rho-kinase (ROCK) dependent manner. We are currently analyzing this spheroid dynamics with several compounds, which already confirmed showing the inhibitory effects for the same soft tissue tumor in vitro and also in vivo Xenograft model.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肺転移 スフェロイド

## 1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍を含む悪性腫瘍の転移は複雑な一連の過程を経て成立するが、最近の臨床病理学的な解析により、腫瘍細胞は非常に早期から血中に CTC (circulating tumor cells) として観察されること、転移の成立には転移先での腫瘍の増殖が最も critical で、骨髄由来の種々の細胞 (macrophage, 血管前駆細胞等) が補助的な役割を演じていることなどが大きくクローズアップされてきている。しかしながら従来の CTC の研究は、血中の CTC を腫瘍細胞特異的なカラム等を用いて capture する方法で、定量的な解析が可能ということで臨床応用 (Cell Search Systems, Veridex 社) されているが、生きた細胞と死んだ細胞の分離が困難な点、又得られた CTC が 2-100 cells/ml と著しく少なく、生物学的な評価が非常に困難であるなどの欠点が多い。

## 2. 研究の目的

我々は、H25-26 年度の挑戦的萌芽研究 (課題番号 25670661) を行う過程で、我々の研究室で樹立したマウス骨肉腫高肺転移株 (LM8) を同種同所移植後、CTC を生きたままで培養することに世界で初めて成功、CTC を原発巣の LM8 と比較し CTC の方が高い anti-anoikis 活性を有し浮遊培養条件下でも増殖することを報告した。さらに肺という原発巣と異なる環境下における腫瘍細胞の増殖に stiffness の異なる条件下での 3 次元増殖に VEGF が重要な役割をする事を見いだした。本研究の目的は、転移先を標的とした新規抗転移治療の臨床応用への道筋を開くことである。研究当初は、上記目的にて分離した CTC の解析を行っていたが、CTC を培養すると、その性質が変化すること、又分離した CTC の量が極めて微量で、培養増殖させること無く解析する事が極めて困難である事が判明した。そこで、流血中や転移巣での増殖制御に的を絞って、実際の生体内での増殖に関与する 3 次元的な Spheroid の動態の解析を行うことにして、研究の目的を変更して以下の研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

我々は、H25-26 年度並びに H27-28 年度 (H29 年度延長) の挑戦的萌芽研究 (課題番号 25670661, 15K15560) を行う過程で、新規に近赤外線を用いたマクロ顕微鏡 (倍率 ~ 20 倍) を開発、Spheroid の内部や周囲の動きを 3 次元的に連続観察記録することが可能となった。

Spheroid の作成には、我々が以前患者検体より樹立報告した、極めて幹細胞性の高い滑膜肉腫細胞株 (Yamato-SS) を用い、細胞接着を完全に阻害する為、HEMA (hydroxyethyl methacrylate) coat した plastic culture dish で 20% FCS 存在培養液中で、約 1 週間

培養し、直径 100-200  $\mu\text{m}$  (細胞数 10000 ~ 50000 個程度) の Spheroid を効率よく再現性良く作成できるようになった。Spheroid に各種薬剤を 2 時間処理し、その後、glass bottom dish に移し顕微鏡ステージ上の培養観察装置内に置き、マクロ顕微鏡下で、37°C 90%  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  のやや hypoxia の条件下で培養を行いながら、近赤外線を用いたマクロ顕微鏡で動画を撮影した。(20 秒毎、30 分) 得られた動画を下記の観察項目に準じて解析を行った。

## 4. 研究成果

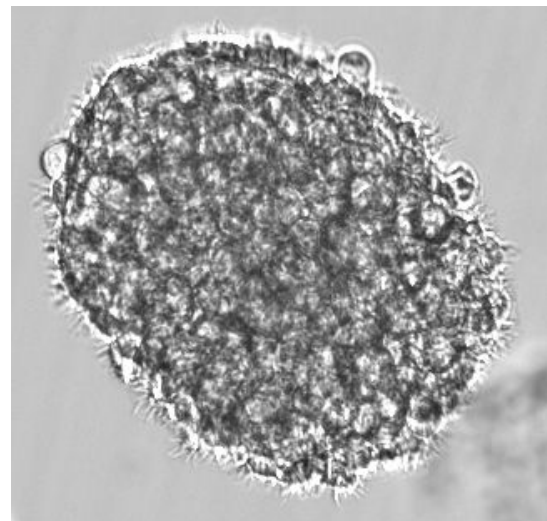
今回この装置を活用して、骨軟部悪性腫瘍 spheroid の動態における種々の因子の関与を検討した。Spheroid 動態の検察項目としては、

1. Spheroid 周囲の budding (sprouting),
2. Spheroid 周囲に存在する filopodia (糸状突起) の長さ、運動、
3. Spheroid 内部の構造変化に分けて解析を行った。

Fig.1

滑膜肉腫細胞より得られた Spheroid の近赤外線顕微鏡透過像 (静止画像)

3 次元培養した Spheroid の表面には、多数の突出する部分 (budding (sprouting)) や filopodia (糸状突起) が存在し、又近赤外線を用いることで内部の様子を観察すること



が出来た。

1. ROCK inhibitor (Y-27632) の効果  
既に我々が Rho-ROCK 系を抑制する事を報告している水溶性の薬剤 Y-27632 20  $\mu\text{m}$  M の前処理にて、30 分間で Spheroid 周囲での budding の回数が減少した。(Fig.2)

Filopodia の長さや運動に変化は認めなかった。

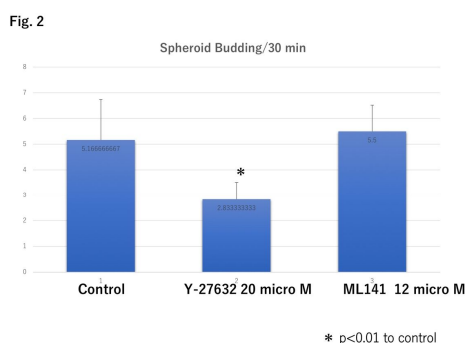
2. Cdc42 inhibitor (ML141) の効果

Cdc42 の活性を阻害する事が報告されている水溶性の薬剤 ML141 3-12 micro M の前処理にて、130 分間で filopodia の長さや運動の減弱が認められた。budding には大きな変化は認められなかった。

以上の事より、budding には Rho-ROCK 系が、filopodia formation には、Cdc42 が中心的な役割を演じている事が、明らかとなった。

Fig.2

滑膜肉腫細胞より得られた Spheroid の近赤外線顕微鏡透過動画より、計測された Spheroid 周囲の budding に対する各種薬剤の影響 (30 分間の budding の回数)



今後の研究 ( ) は下記発表論文番号

本研究で得られた成果を元に、既に in vitro さらに nude mice を用いた in vivo 動物実験で、本研究に用いた Yamato SS 細胞の増殖抑制を報告している trabectedin (1) や pazopanib (Wakamatu et al, Cancer Science 2014) を用いて、これら薬剤の Spheroid 動態に与える影響を観察する。また一方、共同研究者の京都薬科大学芦原教授の研究室で精製された Cdc42 発現量を低下させることで、骨肉腫転移を抑制できる沈丁花の薬物成分 (2) についても同様に、Spheroid の動態に関する影響を検討し、これら薬剤の作用点の解析と、悪性骨軟部腫瘍治療 (臨床応用) への足がかりにしたい。

## 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 9 件)

1) Yasui, H., Imura, Y., Outani, H., Hamada, K., Nakai, T., Yamada, S., Takenaka, S., Sasagawa, S., Araki, N., Ito, K., Myoui, A., Yoshikawa, H. and Naka, N.: Trabectedin is a Promising Anti-tumor

Agent for Synovial Sarcoma: Journal of Chemotherapy: Jan 29: 1-8 (2016)

2) Fukuda, H., Chisaki, Y., Takada, T., Toda, Y., Murata, H., Ito, K., Yano, Y., Takata, K., and Ashihara, E.: Daphnetin Inhibits Invasion and Migration of LM8 Murine Osteosarcoma Cells by Decreasing RhoA and Cdc42 Expression: Biochem. Biophys. Res. Commun.: 471:63-67 (2016)

3) Nishimura, Y., Hyuga, S., Takiguchi, S., Hyuga, M., Ito, K. and Hanawa, T.: Ephedrae stimulates hepatocyte growth factor-induced MET endocytosis and downregulation via early/late endocytic pathway in a gefitinib-resistant human lung cancer cell line: Int J Oncology: 48:1895-1906 (2016)

4) Imura, Y., Nakai, T., Yamada, S., Outani, H., Takenaka, S., Hamada, K., Araki, N., Ito, K., Yoshikawa, H., and Naka, N.: Functional and therapeutic relevance of hepatocyte growth factor/c-MET signaling in synovial sarcoma: Cancer Science: 107(12): 1867-1876 (2016)

5) Yamada, S., Imura, Y., Nakai, T., Nakai, S., Yasuda, N., Kaneko, K., Outani, H., Takenaka, S., Hamada, K., Myoui, A., Araki, N., Ueda, T., Ito, K., Yoshikawa, H., and Naka, N.: Therapeutic potential of TAS-115 via c-MET and PDGFR signal inhibition for synovial sarcoma: BMC Cancer 17:334 (2017)

6) Nakai, T., Imura, Y., Tamiya, Y., Yamada, S., Nakai, S., Yasuda, N., Kaneko, K., Outani, H., Takenaka, S., Hamada, K., Myoui, A., Araki, N., Ueda, T., Ito, K., Yoshikawa, H., and Naka, N.: Trabectedin is a promising antitumor agent potentially inducing melanocytic differentiation for clear cell sarcoma: Cancer Medicine 9:2121-2130 (2017)

7) Silva, N., Akazawa, T., Wijewardana, V., Inoue, N., Oyama, M., Ohta, A., Tachibana, Y., Wijesekera D., Kuwamura, M., Nishizawa, Y., Ito, K., Izawa, T., Hatoya S., Hasegawa, T., Yamate, J., Inaba, T. and Sugiura, K.: Development of effective tumor immunotherapy using a novel dendritic cell-targeting Toll-like receptor ligand: PLOS ONE 12(11):e0188738. doi: 10.1371 (2017)

8) Nakagawa, H., Sasagawa, S., and Ito, K.: Sodium butyrate induces senescence and

inhibits the invasiveness of glioblastoma cells: *Oncology Letters* 15(2): 1495-1502 (2018)

9) Nakagawa, H., Yui, Y., Sasagawa, S., and Itoh, K.: Evidence for intrathecal sodium butyrate as a novel option for leptomeningeal metastasis: *J Neurooncology* doi: 10.1007/s11060-018-2852-2. [Epub ahead of print] (2018)

〔学会発表〕(計 7件)

1) 西村行生、日向須美子、日向昌司、伊藤和幸、花輪嘉彦、麻黄は肺癌細胞において HGF 刺激後の MET endocytosis 及びその分解を促進する、第 24 回日本がん転移学会学術集会、2015 年 7 月 23 日、シテイプラザホテル 大阪(大阪市)

2) 伊藤和幸 日本がん転移学会と共に(会長講演) 第 24 回日本がん転移学会学術集会、2015 年 7 月 23 日、シテイプラザホテル 大阪(大阪市)

3) 伊村慶紀、中井隆彰、山田修太郎、王谷英建、濱田健一郎、金子恵子、名井陽、荒木信人、伊藤和幸、吉川秀樹、中紀文、滑膜肉腫に対する選択的 c-MET 阻害薬 (INC280) の感受性を予知するバイオマーカーの探索 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会場、名古屋市(愛知県)

4) 日向須美子、日向昌司、西村行生、伊藤和幸、小田口浩、花輪嘉彦、MET 過剰発現非小細胞肺癌の増殖に対する麻黄及びエルロチニブの併用効果 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日、パシフィコ横浜、横浜(神奈川県)

5) 笹川覚、由井理洋、中川秀光、伊藤和幸、骨軟部腫瘍における Twist1 による転移能調節 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜、横浜(神奈川県)

6) 中井隆彰、伊村慶紀、中井翔、安田直弘、山田修太郎、金子恵子、王谷英建、竹中聡、濱田健一郎、名井陽、荒木信人、上田孝文、伊藤和幸、吉川秀樹、中紀文、透明細胞肉腫に対する trabectedin (Yondelis; ET-743) の抗腫瘍効果 第 50 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2017 年 7 月 13 日、京王プラザホテル、東京(東京都)

7) 中井翔、中井隆彰、安田直弘、山田修太郎、金子恵子、王谷英建、竹中聡、濱田健一郎、名井陽、荒木信人、上田孝文、伊藤和幸、吉川秀樹、中紀文、透明細胞肉腫に対する

eribulin mesilate の抗腫瘍効果 第 50 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2017 年 7 月 13 日、京王プラザホテル、東京(東京都)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 和幸 (Itoh, Kazuyuki)  
医療法人徳洲会野崎徳洲会病院 (附属研究所)・研究所・所長  
研究者番号：20301806

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )