

令和元年6月20日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10866

研究課題名(和文) 骨肉腫細胞の微小環境との相互作用における液性因子の意義についての研究

研究課題名(英文) Interaction between human osteosarcoma cells and mesenchymal stem cells via IL-8 signaling in tumor microenvironment.

研究代表者

糸永 一郎 (Itonaga, Ichiro)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：10295181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫は最も発生頻度の高い代表的な原発性悪性骨腫瘍である。骨肉腫の増殖や浸潤・転移など悪性形質発現には、腫瘍自身の性質のみならず、周辺微小環境が大きく影響することが知られており、骨肉腫細胞が周辺細胞の性質を変化させ利用していると考えられている。この現象には細胞間の直接接触が重要とされているが、本研究において我々は、細胞接触が不要な液性因子による相互作用が大きな役割を担うという仮説に基づき、その分子機構について解析する。即ち本研究の目的は、骨肉腫の悪性形質発現における液性因子を介した微小環境内のsignal cross-talkの意義を解明することである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫細胞がより効率的に微小環境さらには遠隔転移先の状態を好腫瘍性に改変するために、液性因子が中心的に使われていると予想した。この相互作用が広範囲に拡散できる液性因子を介するものであれば、腫瘍拡大のための環境整備において格段に有利なはずであり、このような性質を獲得できた細胞が選択的に進展していく可能性が高いと思われる。本研究の仮説が実証されれば、骨肉腫の浸潤・転移における新たな分子機構が明らかとなるのみならず、このサイクルを遮断する新しい治療戦略の開発にも繋がると考えられ、本研究の意義は極めて大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma (OS) is the representative primary malignant bone tumor with the highest incidence. It is known that malignant phenotypes of OS, such as proliferation, invasion, and metastasis, are significantly influenced not only by characteristics of the tumor itself, but also by the surrounding microenvironment. In other words, OS is considered to utilize cells in the vicinity of the tumor by changing the characteristics of these cells. Direct intercellular contact is believed to be important for this phenomenon. In the present study, we hypothesized that an interaction mediated by a humoral factor, requiring no cellular contact, might play a significant role in the progression of OS.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 間葉系幹細胞 液性因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

代表的悪性骨腫瘍である骨肉腫の悪性形質の発現には、腫瘍細胞そのものの性質のみならず腫瘍の周辺微小環境が深く関与している。骨肉腫細胞には周辺環境を自身に最適なものに改変する性質があることが知られており、この働きが強ければより増殖・転移能も高くなると考えられている。腫瘍細胞と隣接する細胞は直接接触するために影響を受けやすい状態にあり、実際に腫瘍周囲の間葉系細胞(間葉系幹細胞や血管内皮細胞など)は腫瘍からの影響を受け、腫瘍増殖を援助しているということが様々な悪性腫瘍で示されている。これらの相互作用は、基本的に腫瘍細胞と直接接触する細胞との間で起こると考えられているが、もしこの相互作用が広範囲に拡散できる液性因子を介するものであれば、腫瘍拡大のための環境整備において格段に有利なはずであり、このような性質を獲得できた細胞が選択的に進展していく可能性が高いと思われる。そこで我々は、骨肉腫細胞がより効率的に微小環境さらには遠隔転移先の状態を好腫瘍性に改変するために、液性因子が中心的に使われているという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これらの発現変化を示す遺伝子の中から液性因子であるインターロイキンとケモカインに焦点を絞り、骨肉腫細胞と間葉系幹細胞および血管内皮細胞の間で signal cross-talk を形成している因子を同定し、その意義について検討することを目的とした。本研究の仮説が実証されれば、骨肉腫の浸潤・転移における新たな分子機構が明らかとなるのみならず、このサイクルを遮断する新しい治療戦略の開発にも繋がると考えられる。

### 3. 研究の方法

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は骨肉腫とその微小環境内における液性因子を介した signal cross-talk のメカニズム解明と臨床応用に展開するための基礎となる以下の研究を行った。網羅的解析により抽出した液性因子のリコンビナント蛋白質および中和抗体を用い、単独培養および共培養で signal cross-talk ループを形成している因子を特定する。同定した液性因子が細胞増殖に影響しているか、骨肉腫細胞にリコンビナント蛋白質および中和抗体を投与することで検証する。抗体の有無による浸潤能の変化を motility assay, invasion assay で評価する。の細胞群を使用し浸潤能に関わる因子の蛋白質発現を評価する。in vivo で転移能が変化するか観察する。単独培養、共培養、共培養に中和抗体投与群の細胞をマウスの尾静脈に投与し転移巣を比較した。

### 4. 研究成果

(1) 共培養モデルで上昇する液性因子の同定と作用解析結果。共培養モデルによるヒト骨肉腫細胞 MG63、ヒト間葉系幹細胞 hMSCs、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC における遺伝子発現変化の網羅的解析から抽出した液性因子のリコンビナント蛋白質を細胞株に投与し共培養状態が再現できるか、検討する。培養液から ELISA 法にて、また回収した細胞からウェスタンブロットにてその因子の蛋白質発現が上昇するか検索する。この実験により抽出した候補因子の中から求める活性を持った液性因子が同定した。その結果、すでに次のようなデータが得られた。MG63 において、単独培養と比較して hMSC と共培養した場合に 2 倍以上・1/2 以下の発現異常を示す microRNA を 2150 個、mRNA を 7378 個、同定した。hMSCs において、単独培養と比較して MG63 と共培養した場合に 2 倍以上・1/2 以下の発現異常を示す microRNA を 1881 個、mRNA を 6903 個、同定した。MG63 において、単独培養と比較して HUVEC と共培養した場合に 2 倍以上・1/2 以下の発現異常を示す microRNA を 3064 個、mRNA を 5307 個、同定した。HUVEC において、単独培養と比較して MG63 と共培養した場合に 2 倍以上・1/2 以下の発現異常を示す microRNA を 836 個、mRNA を 707 個、同定した。その中でも MG63 から放出され MSC が MG63 との共培養にて発現が急上昇し、さらに MG63 も共培養状態でさらに上昇していたのが interleukin-8 (IL-8) を同定した。我々はこの IL-8 が signal cross-talk を担う因子と同定した。

(2) IL-8 は MG63 と hMSC の autocrine, paracrine を誘導する。IL-8 のリガンドを投与するとそれぞれの細胞から IL-8 発現が上昇し、中和抗体を投与すると IL-8 の発現が低下した。

(3) 浸潤能にかかわる因子のタンパクおよびリン酸化の変化を解析した。anti-IL-8 抗体を投与した群は FAK, paxillin, Src, Akt のリン酸化が低下していた(図1)。

蛍光免疫染色を行った。anti-IL-8 抗体を投与した群は FAK, paxillin のリン酸化が低下していた(図2)。

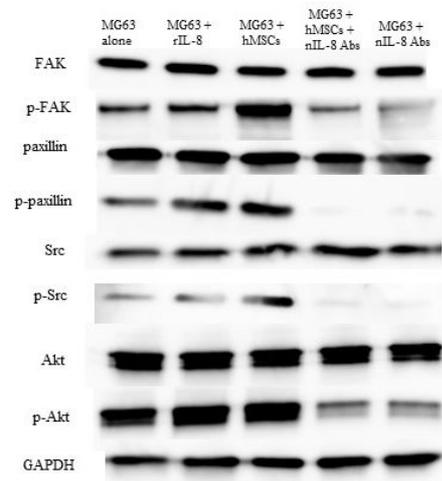


図1

(4) Growth に関する因子、とくに FAK の下流である Akt のリン酸化が rhIL-8 は 100ng/ml で増強し、nIL-8 Ab は 1000ng/ml で低下した。

(5) IL-8 は細胞の浸潤能を上昇させる。rhIL-8 は 100ng/ml より有意に motility up が増加し、nIL-8 Ab は 1000ng/ml より motility が低下した。

(6) Growth は rhIL-8 が 100ng/ml で増強し、nIL-8 Ab が 1000ng/ml で低下した。

(7) 転移能に与える影響の検証を行った。共培養状態で中和抗体を投与した骨肉腫細胞株の motility assay, invasion assay を行い、浸潤能を評価した。また同様のモデルで転移・浸潤能に関わる因子、FAK, RhoA, Rac, paxillin, Src をウェスタンブロットにより蛋白質発現量およびリン酸化のレベルを定量した。中和抗体使用群でこれらの蛋白質発現およびリン酸化が低下して

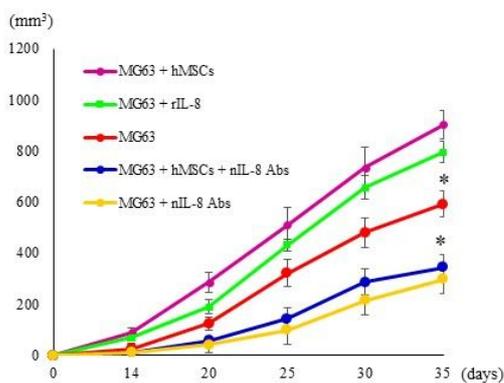


図3

を持って転移能が低下していた (図3)。

(9) in vivo の切片を IHC で FAK リン酸化を確認した。IL-8 中和抗体使用群は FAK リン酸化が有意に低下していた (図4)。

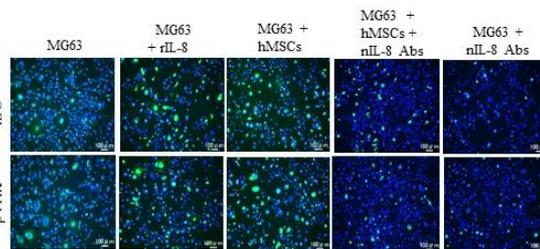


図2

いることを示す。rhIL-8 は 100ng/ml でリン酸化が上昇し、nIL-8 Ab は 1000ng/ml でリン酸化が低下した。

(8) in vivo で転移能が変化するか観察した。単独培養、共培養、共培養に中和抗体投与群の細胞をマウスの尾静脈に投与し転移巣を比較した。共培養後の MG63 と比較し中和抗体反応後 MG63 は有意差

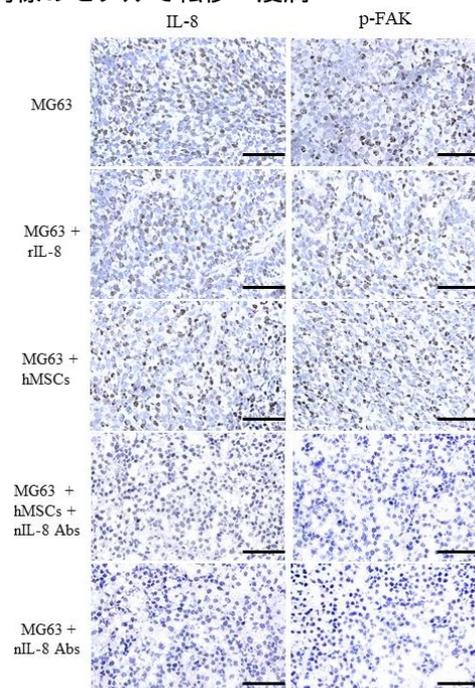


図4

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Tanaka K, Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Tsumura H. Surrogacy of intermediate endpoints for overall survival in randomized controlled trials of first-line treatment for advanced soft tissue sarcoma in the pre- and post-pazopanib era: a meta-analytic evaluation. BMC Cancer. 2019 11;19(1):56. doi: 10.1186/s12885-019-5268-2. (査読あり)

(2) Tanaka K, Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Tsumura H. A meta-analysis of randomized controlled trials that compare standard doxorubicin with other first-line chemotherapies for advanced/metastatic soft tissue sarcomas. PLoS One. 2019;14(1):e0210671. doi: 10.1371/journal.pone.0210671. (査読あり)

(3) Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H. Interaction between human osteosarcoma and mesenchymal stem cells via an interleukin-8 signaling loop in the tumor microenvironment. Cell Commun Signal. 2018;16(1):13. doi: 10.1186/s12964-018-0225-2. (査読あり)

(4) Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H. MicroRNA-181c prevents apoptosis by targeting of FAS receptor in Ewing's sarcoma cells. Cancer Cell Int. 2018;18:37. doi: 10.1186/s12935-018-0536-9. eCollection 2018. (査読あり)

(5) Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H. MicroRNA-20b promotes cell proliferation via targeting of TGF- receptor II and upregulates MYC expression in Ewing's sarcoma cells. Int J Oncol. 2017 51(6):1842-1850. doi: 10.3892/ijo.2017.4155. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1); 糸永一郎、薬物治療中に気胸が生じた骨・軟部腫瘍の2症例、第51回日本整形外科学

会 骨・軟部腫瘍学術集会 2018年7月12日～13日(静岡県)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

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

取得状況(計 件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：池田 真一

ローマ字氏名：IKEDA SHINICHI

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：70444883

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。