

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：94416  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K18482  
研究課題名（和文）腫瘍外環境の物理特性から見た骨肉腫転移メカニズムの解明と新規転移抑制療法の開発

研究課題名（英文）Influence of ECM stiffness in osteosarcoma metastasis

研究代表者  
熊井 準（Kumai, Jun）  
医療法人徳洲会野崎徳洲会病院（附属研究所）・研究所・研究員

研究者番号：20826549  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍の転移抑制は、模索の段階である。申請者は、転移過程の最終関門となりうる生着段階に着目し、転移形成において転移先硬度への転移細胞の適応性が影響すると仮説を立てた。骨肉腫では、軟らかい環境へはコラーゲン線維量に依存し増殖することを報告した論文に参画した。一方で、上皮系がんにおいて高転移能をもつ細胞ほど軟らかい環境で培養を繰り返すと徐々に細胞増殖・伸展活性が増強し、転移能の低下に伴いそれらの活性は低下する。この現象には、転移能と軟らかい環境への適応性には相関関係が存在し、本研究において軟らかい環境への適応分子メカニズムを調査中である。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、これまで有効な治療法が存在しない骨肉腫の肺転移に対して繊維化抑制薬の有効性を示したことである。これは、骨肉腫罹患者の予後の向上に大きく貢献できると考えている。さらに、進行形の軟らかい環境へのがん細胞の適応性と転移の関連を明らかにすることで、骨肉腫だけでなく多様な癌の転移に幅広く対応でき、まだ模索段階である転移治療の礎になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Suppression of tumor metastasis is a stage of exploration. The applicant focused on the engraftment stage, which could be the final barrier to the metastatic process, and hypothesized that the adaptability of metastatic cells to ECM stiffness of metastatic sites affects metastatic formation. Participated in a paper reporting that osteosarcoma proliferates in a soft environment depending on the amount of collagen fibers. On the other hand, in epithelial cancer, cells with higher metastatic potential gradually increase their cell proliferation / spreading activity when they are repeatedly cultured in a soft environment, and their activity decreases as the metastatic potential decreases. There is a correlation between this phenomenon and its adaptability to soft environments, and we are investigating the molecular mechanism of adaptation to soft environments.

研究分野：細胞外マトリックス

キーワード：がん転移 細胞外マトリックス メカノトランスダクション メカノセンシング

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍外環境は、細胞外マトリックス(ECM)、サイトカイン等の液性因子などの様々な要因が、多層的に絡み合い腫瘍細胞の様々な生物学的機能を誘導する。近年、原子間力顕微鏡などの工学的技術医学応用により、腫瘍外環境における代表的な物理特性である ECM の硬度が上皮系腫瘍(がん)の悪性化に関連することが明らかにされ、さらに腫瘍細胞の薬剤耐性化にも影響を与えることが報告された。このようにインテグリンなど接着斑を構成する因子が細胞外環境の硬さや空間構造を感知し(メカノセンシング)、細胞内へ情報伝達し遺伝子発現などの細胞動態をコントロールする機構(メカノトランスダクション)が、遺伝子変異など細胞内要因と同様に重要であることが明らかになった。

がん転移抑制は、がん患者の予後を改善する重要なポイントである。しかし、多くのがん種で根治が難しい状態が続いている。がん転移は、原発巣から転移巣への複数のステップを経て成立するが、その過程でがん細胞は様々な細胞外環境に適応する必要がある。がん細胞の適応性に関して近年、直腸がん細胞が幹細胞性を増強させて軟らかい環境に適応することが報告され、肺など転移先臓器の軟らかい環境に対するがん細胞の適応性に注目が集まっている。しかしながら、軟らかい環境でのがん細胞のメカノセンシング機構や、その硬さに適応するメカノトランスダクション機構は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、安価に細胞接着面の硬度を自在に調節可能で、硬度という純粋な物理的特性が腫瘍細胞に与える影響を観測可能な系を構築すること。さらに、その系を用いて軟らかい環境へのメカノセンシング機構、メカノトランスダクション機構を乳がんをモデルとして解明し、肺転移への影響を明らかにすることを目指す。これまでのメカノセンシング機構、メカノトランスダクション機構は、硬い環境に対するものが中心である。本研究は、軟らかい環境に対するメカノセンシング機構、メカノトランスダクション機構を対象としており、独創的な研究成果が期待される。さらに、軟らかい環境への適応メカニズムは、軟らかい環境への適応というこれまでにない重要な視点を取り入れ、有効な抗肺転移療法が確立されていないがん治療における現状を打破する革新的なアプローチである。本研究では、がんの肺転移を対象とするが、この適応メカニズムの解明は培養環境硬度の重要性が指摘されている再生医療分野など様々な分野へ幅広い展開が見込めるため発展性の高い研究課題である。

## 3. 研究の方法

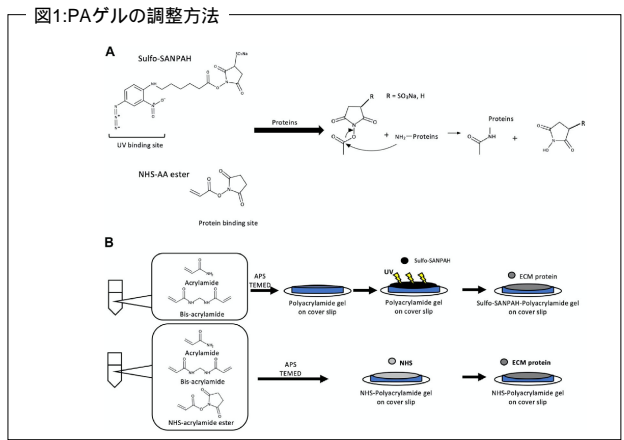
ポリアクリルアミド(PA)ゲル硬度可変型 2 次元培養系:従来の PA ゲル培養系は ECM タンパク質を sulfo-SANPAH などの架橋剤を用いてゲルに結合させていた。しかし、sulfo-SANPAH は高価で PA への結合も安定しないことが問題である。そこで N-hydroxysuccinimide(NHS)-アクリルアミドを PA に混合することで、直接 ECM タンパク質を PA に共有結合可能な PA ゲルの製法を開発し報告した。(Kumai et al. 2021)

軟らかい環境への細胞の適応現象:軟らかい環境(PA ゲル)で培養を繰り返し、PA ゲル上での細胞増殖・伸展活性を評価する。さらに、タンパク質発現や mRNA の発現も継続的に観察する。

## 4. 研究成果

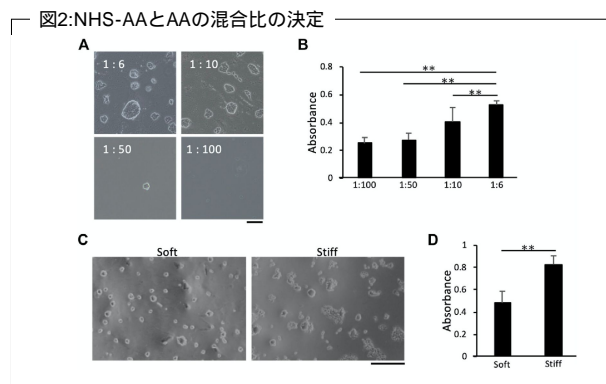
新規ポリアクリルアミド(PA)ゲル培養系の開発

ECMの硬度に対する細胞の反応性を評価する基材として硬度可変型PAゲルが用いられる。PAゲルはアクリルアミド (AA) とビスアクリルアミド (Bis-AA) の濃度を変えることで容易に硬度を調節可能であるため、ECM硬度と細胞応答性の関連を評価するためには、非常に重要な実験系である。しかし、PAゲルは細胞接着性を持たないためタンパク質架橋剤を用いて



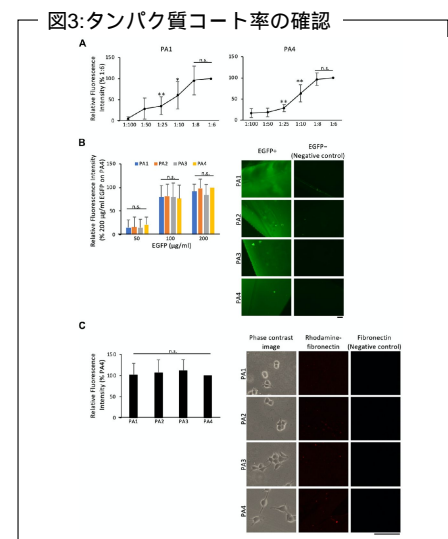
細胞接着性タンパク質を結合させ、細胞付着性を付与する必要がある。従来はタンパク質架橋剤として sulfo-SANPAH を PAゲルに結合させ、硬度に対する細胞応答を評価してきたが、sulfo-SANPAH は非常に高価で不安定、溶解性も悪いなど様々な欠点を有する。さらに、AAの重合後に、sulfo-SANPAH を結合させるため作業工程が多くなってしまった。これらの欠点を解決し、簡便な PAゲルシステムを構築するために、安価な NHS-AA エステルをタンパク質架橋剤として用い、ゲル作製時に同時に混合することで、安価で簡便な作業工程で調整可能な新規 PAゲルを開発した (図1)。

まず最初に AA と NHS-AA エステルの混合比を決定した。NHS-AA エステルを混合して用いた場合、架橋剤の量を定める方法として二つ考えられる。1つ目は、NHS-AA エステルの量を調節して表面に定量的に NHS の量を一定にする。2つ目は、NHS-AA エステルの混合比率を一定にし、表面に過剰の NHS が存在する状態にすること。2005年の論文では、リガンドが表面に過剰にある場合、タンパク質



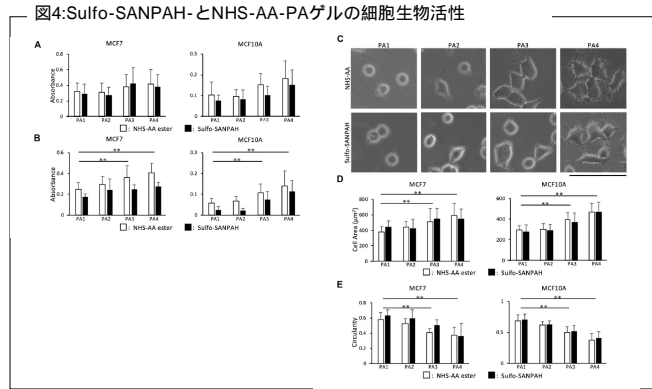
のコート量は一定量で飽和状態となる (Beer et al. 2005)。つまり、一定以上のリガンドがあれば、タンパク質のコート量は加えたタンパク質の量に比例すると考えられる。表面の NHS を定量することは困難であるため2つ目の戦略で実験系を構築した。AA と NHS-AA の比率を 1:6 で混合した際に最も強い細胞増殖活性を示した (図2)。

さらに硬さの異なるゲルで細胞培養の様子を比較するとどちらも均一に増殖していた。また、1:6 の比率で混合した硬さの異なるゲルにタンパク質が均一にコートされているかを GFP と rhodamine-Fibronectin の蛍光タンパク質を用いて確認した。その結果、硬さの異なるゲルはコートしたタンパク質の量に依存しゲル表面に均一にコートされていることが示された (図3)。



従来の sulfo-SANPAH の実験系と NHS-AA エステルの実験系を比較し、同等の生物活性を有するかを確認した。その結果、sulfo-SANPAH の実験系と同等の生物活性を示した。細胞の接着・増殖・形態に違いがないことを確認している(図4)。

本実験系の構築は、従来の実験系と比較し安価で簡単に調整可能で、細胞外環境の硬さと細胞の相互作用をより深く理解するために重要なツールとなる。さらに、がんや再生医療分野など幅広い分野で応用が期待できる。



### 軟らかい環境へのがん細胞の適応性と転移の関連

我々はこれまでに、PA ゲルを基材として、安価に細胞接着面の硬度を自在に調節可能で、硬度という純粋な物理的特性が腫瘍細胞に与える影響を観測可能な系を構築している。この系を用いて骨肉腫に対する軟らかい環境での適応性とコラーゲン線維による影響を確認したところ、軟らかい環境で培養を繰り返しても生物活性に影響を与えなかった。一方で、コラーゲン線維の量に依存し、細胞増殖や細胞伸展活性を示すことを明らかにした。このデータを含めた論文が既に報告され共同執筆者として報告している。

骨肉腫とは対照的に、乳がん細胞は、肺などの軟らかい環境で培養を繰り返すことでその軟らかい環境に細胞が適応し、徐々に細胞増殖・伸展活性が変化することが報告されている(Syed et al. 2017)。そこで、乳がんおよび前立腺がんの細胞株を用いて、網羅的に肺組織などの軟らかい組織を模倣した PA ゲルに対する適応現象を評価した。その結果、転移能の高い細胞株(MDA-MB-231、PC3)ほど強い細胞増殖活性を示し、転移能の低下に伴い細胞増殖活性も低下していた。また、細胞形態も MDA-MB-231、PC3 は軟らかい環境での培養直後では丸い形状であるのに対して、軟らかい環境で培養を繰り返すと伸展した形状へと変化していた。一方で、正常細胞の MCF10A は伸展した形状から丸い形状に変化し転移能の違いにより異なる変化を示した。さらに、これらのがん細胞株の特徴を理解するために、RNA-seq データを CCLE から取得し比較した。低硬度環境で細胞の増殖や伸展が増強する MDA-MB-231、PC3 は細胞外からの刺激を感知するシグナリング経路に関連する遺伝子の発現が多いことが示された。これらの結果から、転移能と軟らかい環境への適応現象には相関性があると仮定して、現在適応現象の詳細なメカニズムをメカノセンシング・トランスダクション機構に着目して研究している。

まず初めに MDA-MB-231 細胞のインテグリンの活性化状態を経時的に追跡した結果、低硬度環境に順応して細胞増殖スピードが増加するのと相関してインテグリン 1 が活性化することが明らかになった。この結果は細胞外からの Outside-in 刺激が高転移細胞の MDA-MB-231 で増強していることを示しており、軟らかい環境への適応には細胞外からの Outside-in シグナルが重要である可能性を示している。

今後これらの、詳細なメカニズムを明らかにすることで、これまで有効な転移抑制療法が確立されていないがん領域で革新的な発見になると考えられる。さらに、培養環境硬度の重要性が指摘されている再生医療分野など様々な分野へ幅広い展開が見込めるため、これらの研究を継続する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Kumai Jun, Sasagawa Satoru, Horie Masanobu, Yui Yoshihiro   | 4. 巻<br>8            |
| 2. 論文標題<br>A Novel Method for Polyacrylamide Gel Preparation Using N-hydroxysuccinimide-acrylamide Ester to Study Cell-Extracellular Matrix Mechanical Interactions | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Materials  | 6. 最初と最後の頁<br>637278 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fmats.2021.637278  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-            |
| 1. 著者名<br>Igarashi Ko, Yui Yoshihiro, Watanabe Kenta, Kumai Jun, Nishizawa Yasuko, Miyaura Chisato, Inada Masaki, Sasagawa Satoru                                   | 4. 巻<br>20           |
| 2. 論文標題<br>Molecular evidence of IGFBP-3 dependent and independent VD3 action and its nonlinear response on IGFBP-3 induction in prostate cancer cells              | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>BMC Cancer  | 6. 最初と最後の頁<br>802    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s12885-020-07310-5   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-            |
| 1. 著者名<br>Ishikawa Masaya, Hamada Keisuke, Yamada Yuji, Kumai Jun, Katagiri Fumihiko, Kikkawa Yamato, Nomizu Motoyoshi  | 4. 巻<br>26           |
| 2. 論文標題<br>Conformational dependence of integrin binding peptides derived from homologous loop regions in the laminin chains  | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Peptide Science  | 6. 最初と最後の頁<br>e3284  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/psc.3284   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-            |
| 1. 著者名<br>Yoshihiro Yui, Jun Kumai, Kenta Watanabe, Toru Wakamatsu, Satoru Sasagawa   | 4. 巻<br>-            |
| 2. 論文標題<br>Lung fibrosis is a novel therapeutic target to suppress lung metastasis of osteosarcoma  | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Cancer   | 6. 最初と最後の頁<br>-      |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/ijc.34008  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>熊井準                                     |
| 2. 発表標題<br>細胞外環境の硬さへの対応メカニズムと腫瘍転移の関連性              |
| 3. 学会等名<br>第35回 Bone Research Joint meeting (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>熊井準、笹川覚、堀江正信、由井理洋    |
| 2. 発表標題<br>細胞外環境の硬さが及ぼす腫瘍転移への影響 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第140年会          |
| 4. 発表年<br>2020年                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>熊井準、笹川覚、由井理洋                 |
| 2. 発表標題<br>転移先臓器硬度に対する細胞可塑性ががんの転移に与える影響 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第142年会                  |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>熊井準、笹川覚、由井理洋                            |
| 2. 発表標題<br>細胞外マトリックス(ECM)硬度に対するがん細胞の可塑性ががん転移に与える影響 |
| 3. 学会等名<br>第31回日本がん転移学会学術集会・総会                     |
| 4. 発表年<br>2022年                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

野崎徳洲会病院研究所 ホームページ  
<https://nozaki.tokushukai.or.jp/rint/?PHPSESSID=i5e2vhsabmqv9uchr518behnr1>

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|