

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591754

研究課題名(和文)

悪性骨軟部腫瘍肺転移成立における骨髄由来細胞によるニッチの形成とその役割

研究課題名(英文)

Pre-metastatic Niche and Its Role in Lung Metastasis of Malignant Musculoskeletal Tumors

研究代表者

橋本 伸之 (HASHIMOTO NOBUYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50324752

研究成果の概要(和文):

LM8 マウス骨肉腫モデルを用い、初期肺転移巣形成に重要な働きを担う NF- κ B 活性化に関わる新規ユビキチンリガーゼ LUBAC の機能解析を行った。本リガーゼは高肺転移株 LM8 では親株に比べ、その発現が亢進し、機能抑制にて細胞増殖・運動能・マトリックス分解能が有意に抑制され肺転移は有意に抑制された。LUBAC を抑制した場合、尾静注後の LM8 は肺血管床への接着が抑制されておりこの作用は細胞接着に關与する ICAM-1 を介していた。

研究成果の概要(英文):

We mainly investigated the precise function of a new ubiquitin ligase LUBAC involved in NF κ B activation, which is a key molecular event in the early lung metastasis using LM8 murine osteosarcoma animal model. LUBAC was overexpressed in this highly metastatic subclone compared with the parental cells. The media obtained from lung organ culture also stimulated the expression. In the loss of function study, cell proliferation, motility and MMP-9 production was significantly reduced in vitro. And lung metastasis was also inhibited in vivo. When the tumor cells injected from the tail veins were observed by in vivo imaging system, the LUBAC knock-down cells were rapidly washed-out and unable to form early colonization in lung through the suppressed ICAM-1 function. Taken together, we showed an evidence proving that ubiquitination plays an important role not only in protein degradation but also in signal transduction of a human disease.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

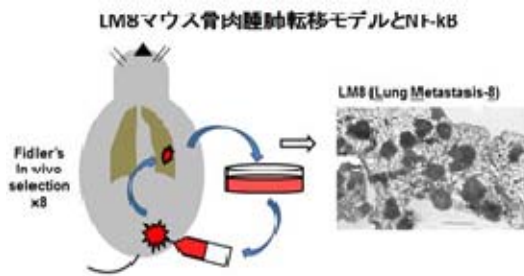
科研費の分科・細目:外科系臨床医学・整形外科学

キーワード:悪性骨軟部腫瘍、肺転移、メカニズム

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍は、しばしば血行性に肺転移を生じ予後不良な疾患である。我々は、マウス自然発生骨肉腫から樹立された細胞株 Dunn か

ら Fidler 法による in vivo selection を行ない、1998 年高率に肺転移をきたす株 LM8 を樹立した。



続く両細胞株の発現プロファイルの解析からは valosin-containing protein (VCP)が肺転移に関与することを明らかにした。VCP は nuclear factor- κ B (NF- κ B)の活性化に関わることから骨肉腫肺転移に NF- κ B 活性化が重要な働きをすると考え、天然ハーブから得られるNF- κ B 阻害剤パルセノライドを用い、この肺転移モデルでの治療実験をさらに実施した。この結果、パルセノライドは LM8 細胞をマウス背部皮下に移植直後から投与すると転移抑制効果を示したが、24 時間後に投与開始下群では効果が見られなかった。このことから NF- κ B の活性化は肺転移成立の初期に重要な働きをすることを明らかにした。

一方、転移成立過程においては骨髄由来細胞が premetastatic niche と呼ばれる微小環境を構築し、腫瘍細胞を呼び寄せていることが近年示されてきた。しかし肉腫領域における premetastatic niche の存在は示されておらず、その形成に関わる分子機構は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、悪性骨軟部腫瘍の肺転移においても骨髄由来細胞が転移形成に関与しているかを明らかにすることを出発点として、その実態や転移形成における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

我々の構築した LM8 マウス骨肉腫肺転移モデルにおいて、GFP マウス由来の骨髄細胞を移植し、骨髄由来細胞の転移初期における肺への動員を観察しようとした。またヒト骨肉腫患者血中の骨髄由来細胞同定をFACS解析にて行うことを計画した。

しかしながら、骨髄移植モデルを構築するためのマウスのバッククロスと GFP マウスの入手に困難を生じたこと、NF- κ B 活性化に関わる新規ユビキチンリガーゼ LUBAC(Linear ubiquitin chain assembly complex)に関する知見を相次いで得たことから、転移成立初期過程における本分子の機能解析を重点的に行った。

(1) LM8, Dunn 骨肉腫細胞における

LUBAC 発現解析

LUBAC は、HOIL-1L(longer isoform of

haem-oxidized iron-regulatory protein ubiquitin ligase 1), HOIP(HOIL-1L interacting protein), Sharpin (SHANK-associated RH domain-interacting protein)の3つの分子から成る複合体である。これら3分子の発現を各々の細胞株を用い、ウェスタンブロット解析にて実施した。

(2) LM8 細胞での LUBAC 機能抑制実験

LUBAC の機能抑制は HOIL-1L に対する siRNA を用いて行った。HOIL-1L をノックダウンすると HOIP, Sharpin の発現も低下しており、NF- κ B 活性も低下していることが確認され、この細胞を LUBAC の機能抑制実験に用いた。

- ① 細胞増殖に与える影響: 単層(monolayer)の増殖は細胞数の計測にて、また足場非依存性増殖は軟寒天中でのコロニー形成能にて評価した。
- ② 細胞運動能: ボイデンチャンバーを用い細胞運動能を比較した
- ③ 細胞浸潤能: マトリックスメタロプロテアーゼ産生をゼラチンザイモグラフィにて解析およびマトリゲルコーティングしたボイデンチャンバーによる運動能解析

(3) 肺転移能の評価

マウス背部皮下移植したモデルにおいて、移植腫瘍のサイズ変化および 28 日後の肺転移結節数を組織学的に評価した。

(4) in vivo イメージングを用いた

尾静注肺転移モデルによる解析

① ICAM-1 強発現細胞での肺血管床への接着能

上記パルセノライドを用いた実験から肺転移成立初期に NF- κ B が重要な働きを示すこと。ICAM-1 が NF- κ B の下流遺伝子で肺転移成立初期の肺血管床への接着に重要な働きをすることから、ルシフェラーゼをすでに導入した LM8 細胞に ICAM-1 を強発現させ、尾静注後 1 時間と 24 時間後のマウス個体内での腫瘍細胞の局在を in vivo imaging にて追跡した。

② LUBAC ノックダウン細胞の肺血管床への接着能

LUBAC ノックダウン細胞では ICAM-1 の発現が抑制されていることが明らかになったことから、LUBAC ノックダウン細胞の肺血管床への接着を同様に in vivo imaging にて可視化・評価した。

③ 同細胞への ICAM-1 導入による肺転移能レスキュー実験

(4)-②の実験の効果が ICAM-1 を介することを

明らかにするため、LUBAC ノックダウン細胞に ICAM-1 を強発現させ、ノックダウンによる肺転移能抑制がレスキューされるか検討した。

(5) NF- κ B 阻害剤による LM8 骨肉腫細胞に対する放射線感受性増強試験
NF- κ B には抗アポトーシス作用があることから天然ハーブからの抽出物で NF- κ B 阻害剤として知られるパルセノライド投与により LM8 細胞の放射線感受性増強作用が得られると仮説し、in vivo でその検証実験を行った。

4. 研究成果

(1) われわれの高肺転移株 LM8 では親株 Dunn に比べ、LUBAC を構成する3つの分子 (HOIL-1L, HOIP, Sharpin) のいずれもその発現が亢進していた。また NF- κ B 活性をルシフェラーゼ活性にて計測したところ LM8 では恒常的に活性亢進が認められた (図1)。さらに肺組織培養上清中にて LM8 細胞を刺激したところ活性促進が観察された。

Increased LUBAC Expression and NF- κ B activity in LM8

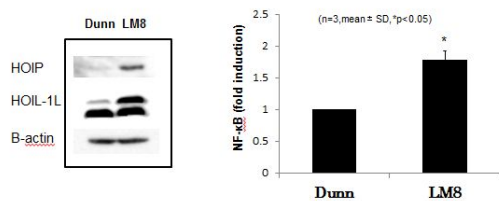


図1. Dunn, LM8 骨肉腫細胞における LUBAC 発現・NF- κ B 活性

(2) 次に本リガーゼの機能を知るため HOIL-1L に対する siRNA を導入した LM8 細胞を作成し LUBAC を構成する他の分子の発現を調べたところ HOIP, Sharpin の発現も抑制されており (3 量体を形成できず不安定化したためと考えられる)、NF- κ B 活性も抑制されていた。

この細胞を用い LUBAC 機能抑制の効果を調べたところ、細胞増殖・細胞運動能・MMP-9 発現抑制を介したマトリックス分解能が有意に抑制されていた (図2)。

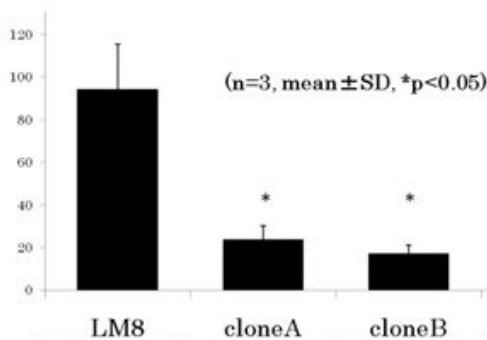


図2. LUBAC 機能抑制による足場非依存性増殖への影響

(3) in vivo においては肺転移が有意に抑制された (図3)。

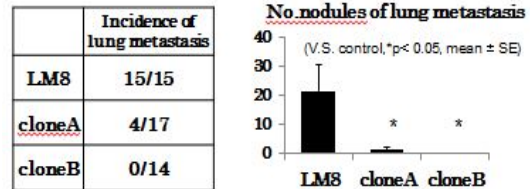


図3. LUBAC 機能抑制により肺転移能は抑制される

(4) また in vivo イメージングシステムにて肺転移成立初期段階を観察したところ、LUBAC を抑制した LM8 では肺毛細血管床にとどまることができなくなっていることが判明した (図4,5)。

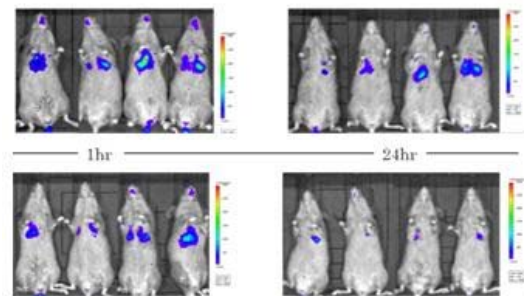


図4. 尾静注1時間後 (左) と24時間後 (右) の腫瘍細胞の局在
上段: LM8 細胞
下段: LUBAC 機能を抑制した LM8 細胞

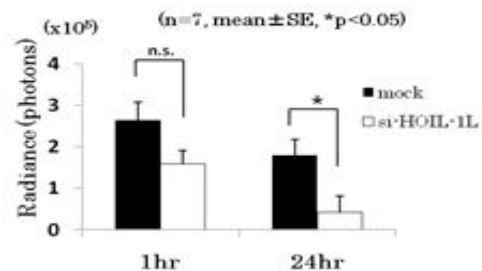


図5. LUBAC 機能抑制により LM8 細胞の肺血管床への接着は阻害される

また NF- κ B の下流遺伝子で血管内皮への接着に関与する ICAM-1 を導入することにより、この効果は完全にレスキューすることができた。

以上の結果からLUBACはLM8においてNF κ Bを活性化し、ICAM-1の発現を介して肺組織への接着性を促進し、微小肺転移を形成。その後はマトリックス分解能や増殖能の亢進作用を受けて転移巣を増大させるものと考えられた。

ユビキチン修飾系はその発見以来、プロテオソーム分解シグナルとしての役割が知られてきたが、本リガーゼは従来にない直鎖状のユビキチン鎖修飾を行うとともに、NF- κ B活性の積極的シグナル伝達として働き、悪性腫瘍の肺転移に関与していることが明らかとなった。このように本研究ではヒト疾患と関連して本リガーゼの関与を初めて示すこととなった。

(5) 最後に、LM8 骨肉腫モデルへの放射線感受性増強試験を、パルテノライドを用いて実施したところ、LM8の放射線感受性を増強することを明らかにした。

パルセノライドは薬草ナツシロギクから抽出される成分で、すでに健康食品として市販され安全性の高いことが明らかとなっている。

上記結果から、骨肉腫患者における放射線治療において、安全かつ有効にその治療効果を増強する可能性が示唆されたと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

① Sugiyasu K, Hashimoto N, Myoui A, Yoshikawa H, et al. Radio-sensitization of the Murine Osteosarcoma Cell Line LM8 with Parthenolide, a Natural Inhibitor of NF- κ B. Oncology Letters. (in press)(査読あり).

[学会発表] (計6件)

① 杉安謙仁朗、橋本伸之、名井陽、吉川秀樹ほか NF κ B阻害剤パルテノライドによるマウス骨肉腫LM8の放射線感受性増強実験. 第69回日本癌学会学術総会. 2010年9月23日 大阪市

② 友永真人、橋本伸之、名井陽、吉川秀樹ほか マウス骨肉腫肺転移における新規NF κ B活性化経路(LUBAC)の役割. 第69回日本癌学会学術総会. 2010年9月22日 大阪市

③ 杉安謙仁朗、橋本伸之、名井陽、吉川秀樹ほか NF κ B阻害剤パルテノライドによるマウス骨肉腫LM8の放射線感受性増強実験. 第43回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会. 2010年7月15日. 東京

④ 友永真人、橋本伸之、名井陽、吉川秀樹ほか マウス骨肉腫肺転移における新規NF κ B活性化経路(LUBAC)の役割. 第43回日本整形外

科学会骨・軟部腫瘍学術集会. 2010年7月15日. 東京

⑤ 友永真人、橋本伸之、名井陽、吉川秀樹ほか マウス骨肉腫肺転移における新規NF κ B活性化経路(LUBAC)の役割. 第19回日本がん転移学会. 2010年6月17日. 金沢市

⑥ Sugiyasu K, Hashimoto N, Myoui A, Yoshikawa H, et al. Radio-sensitization of the Murine Osteosarcoma Cell Line LM8 with Parthenolide, a Natural Inhibitor of NF- κ B. 56th annual meeting of orthopaedic research society. 2010.3.7. New Orleans, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 伸之 (HASHIMOTO NOBUYUKI)
大阪大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50324752

(2) 研究分担者

名井 陽 (MYOUI AKIRA)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 10263261
吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)
大阪大学・医学研究科・教授
研究者番号: 60191558

(3) 連携研究者