

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09403

研究課題名（和文）骨内腫瘍細胞の生存、再活性化及び増殖のメカニズム解明

研究課題名（英文）Analysis of Survival and Reactivating Factors in Tumor Cells during Metastatic Latency in Bone

研究代表者

新井 隆太（Arai, Ryuta）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：40722509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：早期癌切除後患者の数年間の経過観察のうちにはしばしば転移性骨腫瘍は発生する。臨床におけるこのような現象、つまり原発巣と転移巣発生の時間的な隔たりは転移性潜伏期と呼ばれる。潜伏期腫瘍細胞の制御因子はこれまで不明であり、治療薬開発には至っていない。我々は骨内非増殖期を有するマウスモデルを確立、潜伏期細胞株と早期癌切除検体の網羅的遺伝子解析を組み合わせた分子生物学的解析を行うことで、骨内潜伏期腫瘍細胞の制御因子の同定を行った。制御因子のノックダウン細胞およびその関連経路に基づく新規骨転移予防薬を用いて転移性骨腫瘍の抑制、さらには原発巣検体において同定因子が予後不良因子であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌による死亡の90%は転移に関連している。転移性腫瘍に対する予防として、遠隔臓器に播種後の、潜伏期における細胞の生存と再活性化のステップを標的とすることが効果的であると考えられている。しかしながら、骨における潜伏期腫瘍細胞の生存・再活性化メカニズムや制御因子は依然不明であり、治療薬開発には至っていない。

それに対し本研究では転移性骨腫瘍マウスモデルを確立、潜伏期腫瘍細胞細胞株を樹立し分子生物学的解析を行い、転移巣での制御因子の同定、その関連経路に基づく新規骨転移予防薬の確立を行った。これにより、転移性腫瘍に対する新たな予防・治療戦略が開かれた。

研究成果の概要（英文）：Bone metastasis often arises years after the removal of the early-staged primary cancer. This clinical time interval is known as metastatic latency. Since a regulator of tumor cells during the metastatic latency has been unknown, preventative therapeutic strategies have not been developed but required.

To this, we created in vivo models of bone metastasis with latency periods. After selecting the upregulated genes in the latency subline, a further screening was performed on clinical transcriptome data: early-staged cancer annotated with subsequent bone metastasis. It successfully narrowing down the most independent factor for the poor prognosis.

Validation was conducted using the knock down cell lines and a related pathway inhibitors. Moreover, immunohistopathology in clinical samples revealed that the positive rates of the regulator were correlated positively with bone metastasis.

研究分野：癌

キーワード：転移性骨腫瘍 転移性潜在期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 早期癌切除後患者の数年間の経過観察のうちしばしば転移性骨腫瘍は発生・再発する。臨床におけるこのような現象、つまり原発巣と転移巣発生の時間的な隔たりは転移性潜伏期 (Metastatic latency) と呼ばれる。

(2) 転移巣の発生は一般に複数のプロセスからなる。原発巣における腫瘍細胞の組織や血管内浸潤、次いで循環血液中における生存、遠隔臓器へ播種される。この播種性腫瘍細胞 (Disseminated Tumor Cells: DTCs) は最終的に細胞増殖が起こることで肉眼的転移巣が形成され、臨床的に診断に至る。しかし、それまでに DTCs は細胞周期が停止した休眠細胞としての生存や微小転移巣での再活性化プロセスを経ることがあり、この期間は臨床上的で転移性潜伏期に相当すると考えられている。転移の予防戦略として、DTCs の生存と再活性化のステップを標的とすることがより効果的であると考えられているものの、骨における DTCs の生存・再活性化メカニズムや制御因子は依然不明であり、治療薬開発には至っていない。

(3) これに対し、転移予防において鍵となる転移性潜伏期に関連した研究が盛んに行われてきた。マウスを用いた研究において、腫瘍細胞の動脈接種後骨へ生着、一定期間の非増殖期を経た後に増殖期に移行することが報告されてきた。さらに、このモデルにおける腫瘍非増殖期は転移性潜伏期に相当し、微小転移巣を形成していることが判明している。さらに腫瘍細胞が原発巣と異なる環境である遠隔転移巣に生着、増殖するためには代謝シグナルによる適応が行われる。我々は、この非増殖期における腫瘍細胞の生存・再活性化規定因子は代謝を制御するとの仮説を立て、研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では骨内非増殖期を有するマウスモデルを確立、その分子生物学的解析を行うことで、骨内非増殖期腫瘍細胞の制御因子の同定、およびその関連経路に基づく新規骨転移予防薬の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞株と骨内非増殖期を有するマウスモデルの確立: 1.0×10^6 の乳癌細胞株および膀胱癌細胞株をヌードマウスの尾動脈に接種し、膝に生着した各腫瘍細胞が 14 日間の非増殖期を経て増殖期に移行するモデルを作製した。動脈注射後 14 日に骨に定着した腫瘍細胞を摘出、*in vitro* 培養し、非増殖期細胞株 (Latency 細胞) を樹立した。また、*in vivo* において増殖期に移行した細胞株を骨より分離し、*in vitro* 培養、尾動脈注射を繰り返し、高骨親和性細胞株 (Bone-Tropic Tumor Cells: BoTCs) を作製した。各細胞株における *in vivo* 腫瘍形成能と形態観察を比較した。

(2) Latency 細胞株の遺伝子解析: 腫瘍細胞をストレス (低酸素) 環境下で培養、またマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。

(3) 予後不良規定因子の検出: パブリックデータにある早期乳癌臨床検体のトランスクリプトームデータとそれに付随した術後骨転移のコホートデータを使用し、非増殖期細胞株に

において発現上昇していた遺伝子の中から予後不良規定因子を同定した。

(4)規定因子ノックダウン細胞株の樹立と腫瘍形成能評価：解析にホルモンレセプター陰性乳癌細胞株、前立腺癌細胞株を追加してノックダウン細胞株を樹立し、*in vitro*、*in vivo* 環境下での腫瘍形成能の評価を行った。

(5)骨転移メカニズムの解明と阻害剤実験：The enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA 等を用いた関連経路の定量化、さらに *in vivo* 実験において骨転移形成に対する阻害剤の効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 骨内非増殖期を有するマウスモデルの確立: Latency 細胞は組織切片上では single cell にて生存、培養状態では円形の形態を保持した。親細胞株、BoTCs は紡錘形の形態であった。BoTCs の *in vivo* 評価において、BoTCs は移植後 14 日以内に増殖期に入り、非増殖期は認めなかった。

(2) Latency 細胞の特異的生存能: 塩化コバルトによるストレス培養環境下において、Latency 細胞のみが生存と再活性化を示した。遺伝子網羅的解析において、Latency 細胞は代謝等の遺伝子セットが特異的に濃縮されていた。

(3) 予後不良規定因子の同定: Latency 細胞において親細胞株と比較し発現亢進し遺伝子を候補分子とし、単変量解析 (log-rank test) 並びに多変量解析 (the cox-proportional hazard model) を行った。最も *P* 値が低い遺伝子を予後規定因子とした。

(4) ノックダウン細胞株における骨転移形成能の評価: 上記 4 種の細胞株でノックダウン細胞株を樹立。Real-time PCR と Western Blotting にて発現量は低下した。*In vitro* 通常培養条件下での細胞増殖は、3 種の細胞株では、コントロール株とノックダウン細胞株で変化がなかった。一方、*in vivo* 並びに塩化コバルト負荷による *in vitro* ストレス (低酸素状態模倣) 環境下では全ての細胞株においてノックダウン細胞株は生存と再活性化が低下した。

(5) 骨転移メカニズムの解明と阻害薬による転移性骨腫瘍形成抑制効果: ELISA において、関連代謝産物はノックダウン細胞株にて低下した。関連阻害剤を用いた *in vivo* においても阻害剤投与群は転移性骨腫瘍形成が抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水寛和、津田真寿美、王磊、新井隆太、田中伸哉、岩崎倫政
2. 発表標題 転移性骨腫瘍再発を制御するマスターレギュレーターの探索
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水寛和、津田真寿美、王磊、新井隆太、岩崎倫政、田中伸哉
2. 発表標題 転移性骨腫瘍再発を制御するマスターレギュレーターの探索
3. 学会等名 第123回北海道癌談話会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清水 寛和 (Shimizu Hirokazu)	北海道大学 (10101)	

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
---------	---------