

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16353

研究課題名（和文）細胞骨格を介した細胞運動極性の制御による骨軟部肉腫の転移抑制

研究課題名（英文）Suppression of metastasis of bone and soft tissue sarcoma by regulation of cell movement polarity via cytoskeleton

研究代表者

渡邊 健太（Watanabe, Kenta）

富山大学・附属病院・診療助手

研究者番号：90865255

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、マウス骨軟部肉腫細胞から樹立した転移能の異なる転移株を用い、転移能と細胞骨格の関連に着目し、新たな転移抑制法を創成することであった。研究の方法は、細胞骨格について特に細胞運動の極性に注目し、微小管プラス端集積タンパクによる細胞運動の調整メカニズムを解析することを計画した。

2次元、3次元培養にて微小管阻害薬であるエリブリンにて細胞運動の指向性が低下していること、その原理としてAPCの局在の変化があることを確認した。次いでAPCをはじめとした微小管+端集積タンパクに注目し、そのノックアウト株、過剰発現株の作成を行ったが安定した細胞株の樹立ができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

目的の新たな転移抑制の治療法の確立には至らなかったが、細胞運動極性の調整が転移の抑制につながる可能性は考えられた。今後安定した遺伝子操作による細胞株の樹立により、より詳細に細胞運動極性の機序、調整をすることが可能となれば現在治療困難である骨軟部肉腫の転移の抑制につながる治療法の確立を目指すことができるのではないかと考える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to create a new method for inhibiting metastasis by focusing on the relationship between metastatic potential and cytoskeleton using metastatic strains with different metastatic potentials established from mouse bone and soft tissue sarcoma cells. As for the research method, we focused on the polarity of cell movement, especially in the cytoskeleton, and planned to analyze the regulation mechanism of cell movement by microtubule plus-end-accumulating proteins.

In 2D and 3D cultures, it was confirmed that eribulin, a microtubule inhibitor, reduced the directivity of cell motility, and that the principle of this was a change in the localization of APC. Next, we focused on microtubule + end-accumulating proteins such as APC, and created knockout strains and overexpressed strains, but could not establish stable cell lines.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞骨格 細胞運動極性 転移抑制

1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫の治療には手術療法に加え、抗がん剤治療、放射線治療が行われている。しかし、転移に対する新たな基礎研究が行われているが、肺転移を制御する治療法の確立には至っていない。そのため、現在でも肺転移を有する骨軟部肉腫患者の5年生存率は、約20%と予後不良な疾患であり、転移抑制が課題である。実際には、骨軟部肉腫では原発巣は切除され、局所制御は可能である。しかし、初診時より転移を有する場合や治療の経過中に転移を来した場合には、抗がん剤治療が行われるが、選択される薬剤は毒性が強く患者負担も大きい。私は毒性の少ない微小管阻害薬に注目し、投与法の工夫によって原発巣を縮小させずとも、転移を抑制する‘抗転移薬’の可能性を明らかにした。この先行研究をもとに、転移に重要といわれる細胞運動のなかでも運動の極性の変化に着目し新たな転移抑制治療の創成を目指し本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス骨軟部肉腫細胞から樹立した転移能の異なる転移株を用い、転移能と細胞骨格の関連に着目し、細胞運動の極性の変化に関連した新たな転移抑制法の創成することである。

3. 研究の方法

(1) 転移能の異なる骨軟部肉腫細胞株を用い、微小管の動的不安定性の違いを確認し、細胞運動の極性の差を検討する。+TIPs (Microtubule-plus-end-tracking protein)の発現と細胞運動極性のメカニズムを解明し、+TIPsの機能を抑制することで細胞運動極性を低下させ転移抑制を確認する。これらの検討により、新規の転移抑制薬や投与法の開発を目指す。

(2) 本研究ではマウス自然発生の骨軟部肉腫細胞株を用いる。骨肉腫細胞と未分化多型肉腫細胞であり、同一細胞から樹立した高転移株と低転移株を用いる。これらの細胞株は、正常な免疫機能を維持しているマウス固体内で、同所移植により転移形成の観察が可能である。そのため、免疫不全マウスを用いる多くの転移モデルよりも正確に真の腫瘍と宿主の関係を観察する。

4. 研究成果

(1) 培養法の確立：軟部肉腫細胞株であるRCTと骨肉腫細胞株であるLM8、DUNNを用いて細胞培養を行った。2次元培養は問題なく可能であった。コラーゲンを用いた3次元培養を行い、顕微鏡を用いてコロニーのサイズ、生着率を計測できるようになった。

(2) 微小管の長さの検討法：微小管阻害薬を用いて検討を行うため微小管の長さが変化しているかを検討できるように α -tubulin を細胞免疫染色し、その画像を画像処理することで微小管の長さを測定した。 α -tubulin を免疫染色することで細胞突起数の測定と微小管の長さを測定することができた。骨肉腫細胞株であるLM8に微小管阻害薬であるエリブリンを投与すると細胞突起数は濃度依存的に減少し、チューブリンの長さも減少していたことから微小管の長さを比較検討できると考えられた。

(3) 細胞運動の評価：2次元の細胞運動はMigration assayとWound healing assayを用いて行った。3次元では細胞突起数、コロニーの大きさをを用いて評価を行うことができた。LM8とエリブリンの実験では濃度依存的に細胞運動能は低下を認めていた。

(4) 細胞運動の極性の検討：細胞運動極性を評価するためMTOCの細胞免疫染色を行った。Wound healing assayをおこなった細胞を細胞免疫染色することで傷を埋めるための方向と実際の運動の方向とが一致しているかを検討した。

(5) +TIPsとの関係の検討：細胞の運動と+TIPsの関係を検討するために+TIPsの一つであるAPCの免疫染色を行った。微小管阻害薬であるエリブリンを投与するとAPCは細胞の中心に確認され、辺縁には見られなくなることを確認した。このことから微小管に沿って行われる+TIPsの細胞内輸送が微小管阻害薬により阻害されていた。

(6) +TIPsの過剰発現株、ノックアウト株の作成：骨軟部肉腫株での運動能評価、細胞免疫染色評価が可能であったため、+TIPsの機能をさらに検討するため過剰発現株とノックアウト株の作成を行った。形質転換やウイルスベクターを用いた形質導入など様々な方法を検討して行

ったが安定した過剰発現株、ノックアウト株の作成をすることができなかった。安定株の作成ができなかったため実験をこれ以上進めることができなかった。

骨軟部肉腫に置ける細胞運動の極性に関する報告は少なく、そのメカニズムは未だ解明されていない状態である。今回の研究では詳細な検討ができなかったが、+TIPs と細胞運動の極性の評価が可能であれば+TIPs を制御することで細胞運動をコントロールでき、新たな転移抑制の治療へつなげることができるのではないかと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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