

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09329

研究課題名（和文）TSPAN12の骨肉腫細胞に対する影響

研究課題名（英文）Effect of TSPAN12 on osteosarcoma cells

研究代表者

寺内 竜（Terauchi, Ryu）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：20575154

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）：骨肉腫と膜タンパクであるTSPAN12との関係性を評価した。数種類の骨肉腫細胞株を用いてWestern blot analysisおよびrt-PCRを行う、明らかな発現を認めなかった。また、RNA seqでTSPAN12と他のTSPANとを比較すると、TSPAN12は他のTSPANよりも低値であった。このため、TSPAN12と骨肉腫との関係性は低いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫や軟部肉腫は分子標的薬が効きにくいといわれている悪性腫瘍である。本実験では分子標的薬の1つとされている膜タンパクであるテトラスパニンに着目し研究を行った。結果としてはTSPAN12と骨肉腫の関係性は低かったが、研究の中でより関係性が強いと考えられるTSPAN4や15といった新たな研究ターゲットを発見できたことは今後の研究継続に繋がる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the relationship between osteosarcoma and the membrane protein TSPAN12. No significant expression was observed by Western blot analysis or rt-PCR. RNA sequencing showed a lower expression level than other TSPANs.

研究分野：骨・軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 軟部肉腫 膜タンパク テトラスパニン

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は全悪性腫瘍の中で約 0.2%と希少がんに属し、その発生頻度は 100 万人あたり年間 2-3 人と報告されている。1970 年代までは患肢切断術が唯一の治療法であり、5 年生存率は 10 - 20%であった。1980 年代にはドキソルビシンやシスプラチンなどの複数の抗がん剤が登場し、それらを併用した化学療法により、5 年生存率は 60 - 70%まで改善した。さらに、腫瘍の縮小による患肢温存も可能となった。現在では、化学療法と手術療法を併せた集学的治療が標準的治療となっている。しかしながら、この 40 年間、骨肉腫に対する新規抗がん剤は登場していない。原因として、骨肉腫の症例が他の癌と比較して著明に少ないことで新規薬剤開発、臨床応用には莫大な時間、費用および労力がかかることなどが挙げられる。

近年、医学を含めた分子生物学はめざましい進歩を遂げ、様々なメカニズムが解明されつつある。そのような人類の進歩を活用した医学の 1 つに分子標的薬の開発が挙げられる。がん細胞の増殖、転移に必要な特有のタンパクや遺伝子の発現をターゲットとする薬剤であるが、様々な癌腫において開発が進んでいる。これまで軟部肉腫に対して VEGF をターゲットとしたパゾパニブが臨床応用されているが、骨肉腫に対する新規分子標的薬は登場していない。その理由として、骨肉腫細胞は癌細胞とは異なり症例数が少ない希少がんに属している点や、多様性を有することが挙げられる。そこで、骨肉腫に高発現しているタンパクを見つければ新規分子標的薬の開発は十分に期待できる。

テトラスパニンは、細胞膜を 4 回貫通する構造を持つ膜タンパクファミリーで、ヒトでは CD9、CD63、CD81、CD82、CD151 など 33 種類のメンバーが知られている。テトラスパニンは、他の膜タンパクと結合してコンプレックスを形成し、molecular facilitator あるいは、molecular organizer として機能する。テトラスパニンは、インテグリン・パートナーとして悪性腫瘍、自己免疫疾患、感染症、神経疾患における機能解明がすすみ、臨床応用の可能性も報告されてきた。われわれは骨肉腫の治療ターゲットの一つとしてテトラスパニンファミリーに着目しており、とりわけ TSPAN12 が有力な治療ターゲットになりうると考えている。TSPAN12 は、近年、肺癌や卵巣癌、乳癌での抗腫瘍効果を有する報告がある。また、TSPAN12 が p53 調節遺伝子であることや他のテトラスパニンタンパク質 (CD151、NET-6、CD82、CD9 など) と相関関係を示し、がんの進行に関与していることが報告されている。しかしながら、デカルシンの骨肉腫に対する効果についての報告はまだない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は骨肉腫に対する TSPAN12 の関係性を調べることである。

## 3. 研究の方法

(方法) *In vitro* において、ヒト骨肉腫細胞 (143B、MG63、Saos2) およびヒト骨芽細胞 (HOB) における TSPAN12 の発現を Western blot analysis を用いて評価した。

(方法 ) real-time PCR で TSPAN12 の発現量を確認した。

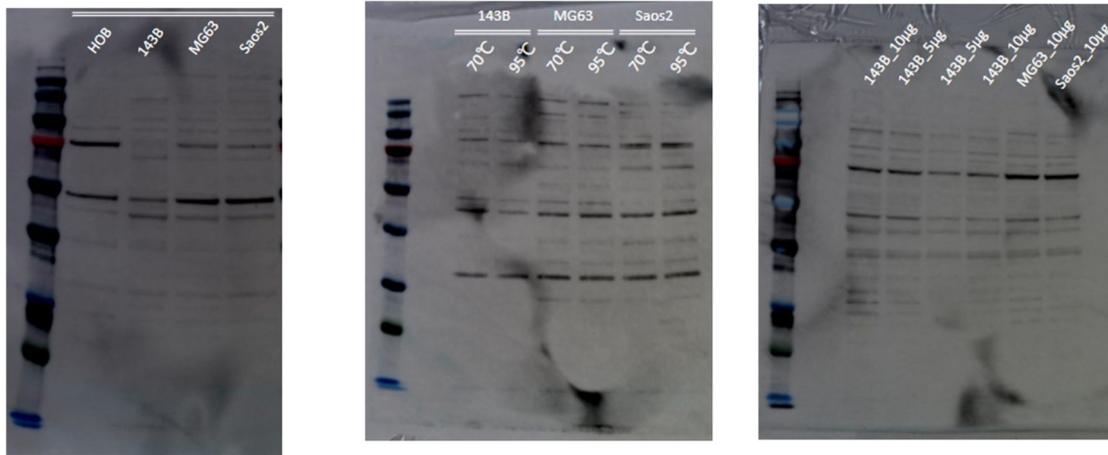
(方法 ) RNAi による TSPAN12 knock down を作成するため Reverse transfection 法を用いて実験を行った。

(方法 ) 方法 の結果を踏まえ、転移に関連する遺伝子を評価した(MMP2,9,14)。

(方法 ) RNA seq を用いて他の TSAPN との相対評価を施行した。

#### 4 . 研究成果

(結果 ) Western blot analysis における明らかな発現を認めなかった。抗体の種類や boil temperature、遠心分離後のタンパク回収等の実験過程各所の調整を行うも、発現の変化は認められなかった。

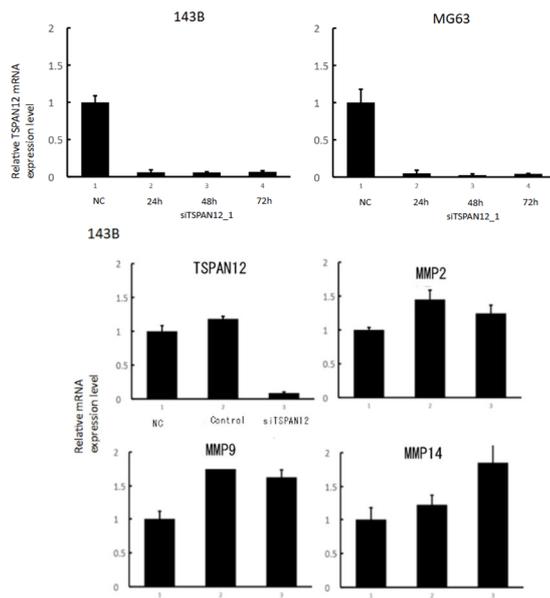


(結果②) すべての細胞株で低値であった。

(結果③) 両細胞株で 24 時間以降 knock down を顕著に認めた。

(結果④) 明らかな関係性認めなかった。

(結果⑤) 他の TSAPN と比較して、TSPAN12 の発現量は低値であった。



RNAseq カウントデータ(一部)

TSPAN12ももとの発現が少ない

gene_name	siCtrl_spm	siCtrl_count	siCtrl_spm	siCtrl_count	siTSPAN12_spm	siTSPAN12_count
TSPAN6	34.262034	2505	32.748535	2720	32.713028	2548
TSPAN9	16.181723	1388	14.433060	1259	14.737406	1313
TSPAN17	47.853344	2762	48.910725	2872	43.830248	2847
ACTB	832.7194	25244	7182.0234	24599	7056.432	24542
TSPAN15	40.876075	1478	42.190447	1832	38.23381	1478
TSPAN12	7.204802	264	7.589099	422	0.511039	32
TSPAN13	45.183275	1817	47.824107	2069	42.78187	1792
TSPAN14	58.793876	7487	57.870777	7800	62.57796	8538
ESR1	6.711053	232	652.21355	6673	278.354	4161
TSPAN11	0.322865	25	0.3623688	16	0.383062	22
TSPAN1	3.741751	102	4.388168	142	3.811064	81
TSPAN8	0.058655	2	0.057481	2	0	0
TSPAN2	0.084383	4	0.183439	14	0	0
TSPAN31	7.484473	529	12.551952	699	6.512128	346
TSPAN3	41.454903	2807	26.433302	2782	19.425543	2249
TSPAN7	2.526408	89	2.957832	119	4.049963	155
TSPAN18	1.2314379	72	0.790835	52	1.788956	80
TSPAN33	2.391858	126	2.450339	153	1.871882	126
TSPAN5	47.54782	3275	49.30283	3405	50.85596	3875
TSPAN10	0.285242	10	0.830751	26	0.222303	11
TSPAN4	97.18128	2792	103.84957	3154	97.41825	2990
TSPAN14.A51	0.820085	10	0.568119	4	0.7817	13
TSPAN19	0.114848	7	0.038629	4	0	0
TSPAN3-DT	0.285591	36	0.357148	47	0.358771	48

Count マッピングされたリード数  
TPM リードのカウントデータを総リード数と遺伝子の長さで補正

今後の方針として、RNA seq で発現の高値であった TSPAN4,15 等に対して、同様に評価を行う予定である。

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
研究分担者	土田 真嗣  (Tsuchida Shinji)  (10719834)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	
研究分担者	白井 寿治  (Shirai Toshiharu)  (20397186)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授   (24303)	

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