

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：84409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23659734

研究課題名（和文）肺転移に対する骨髄の関与を検討する新規実験系の開発

研究課題名（英文）Development of experimental system to analyze the involvement of bone marrow during lung metastasis

研究代表者 伊藤 和幸 (Itoh Kazuyuki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター（研究所）・生物学部門・部門長

研究者番号：20301806

研究成果の概要（和文）：骨肉腫の予後は肺転移により大きく左右される。転移成立には腫瘍のみならず、宿主側の骨髄の役割が大きく注目されている。本研究では骨肉腫の起源細胞と考えられる間葉系幹細胞の骨分化過程における細胞運動様式、運動能の変化のメカニズムを論文報告した。次に我々が樹立報告したマウス骨肉腫高肺転移株LM8と全く肺転移を起こさない親株Dunnとの比較においてLM8、Dunn共に骨髄内へのhomingはなく、転移先である肺血管内皮細胞での浸潤能に大きな差があり肺への転移巣形成に大きく関与していることを論文報告した。

研究成果の概要（英文）：Prognosis of patients suffering osteosarcoma depends on lung metastasis. Recently the role of bone marrow in the establishment of metastasis shed lights. In this study, we firstly reported the mechanism of change in the cellular motility and motile mode during the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells-origin of osteosarcoma. Next, we compared the ability of lung metastasis between highly metastatic mouse osteosarcoma cell line, LM8-established in our laboratory, and parental Dunn cells. Neither LM8 nor Dunn found in the mouse bone marrow, while striking difference exist during the step of extravasation (invasion onto the endothelial cells of lung) between two cell lines. We thus reported the involvements of invasive ability to establish lung metastasis in mouse osteosarcoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：骨・軟部腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫を始めとする骨軟部悪性腫瘍の予後は、肺転移により最も大きく左右される。最近転移成立には腫瘍側の要因のみならず、宿主側とりわけ骨髄の役割が大きくクローズアップされている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々の研究室で樹立したマウス骨肉腫高肺転移株 (LM8) の移植と、骨形成因子 (BMP-2) による骨髄の充満した ectopic bone formation を同時に同一の (LM8 に syngeneic な) C3H mouse 体内で行うことにより、LM8 の肺転移に対する骨髄の影響を観察しようとするものである。骨髄移植を用

いず、正常な免疫能を保ったままで実験を行うことが可能であり、がん細胞の骨髄に及ぼす影響と骨髄のがん転移に及ぼす影響を同時に観察でき、転移メカニズムの解明により将来の臨床応用が大いに期待される。

### 3. 研究の方法

マウスを用いた動物実験を主として研究を行う。

#### 動物実験

体重 20-30g のマウス背部筋膜下に 2-5  $\mu$ g の BMP-2 を含有する collagen pellet を移植すると、2 週間で、1-2cm の大きさの骨髄が充満した石灰化した新生骨 (ectopic bone formation) を観察できる。この系においては、pellet 移植後の 3-4 日目より、新生血管の侵入が認められ、血流を介して多くの間葉系の未分化細胞 (間葉系幹細胞と考えられる) が、pellet をめざして移動し、2 週間の間に骨髄で充満した、破骨細胞、骨芽細胞を伴った新生骨を形成する。

一方、LM8 は、 $10^6$ - $10^7$  個を皮下に移植すると、2 週目で血中に CTC の存在を確認でき (大学院生田中、未発表)、2-3 週間で直径 1-2cm の原発巣腫瘍を形成し、4-5 週目で、肺転移にて全例死亡する。従って、この 2 つを同一の C3H マウスに行う事により、LM8 (原発巣、肺転移巣)、新生骨及び骨髄、さらに実験終了時の全血より CTC (circulation tumor cells) を解析することが可能で、まず、新生骨髄の LM8 の肺転移に及ぼす影響と、LM8 の新生骨形成に及ぼす影響の両者を詳細に観察し、マウス体内で起こっている現象のメカニズムを考察する。

動物実験で得られた結果を *in vitro* の培養細胞系で検証し、正常免疫下での骨髄の肺転移に及ぼすメカニズムを明らかにする。

#### 培養細胞実験

新生骨は、前述したように骨髄由来の未分化間葉系細胞が血管より遊走して形成され、その細胞モデルとしては ST2, C3H 10T1/2. MC3T3 等のマウス培養細胞があり、当研究室で培養実験に用いている。また、転移能のない親株 Dunn と高率に肺転移する LM8 の間には、MMP 産生、VEGF 産生、運動能 (運動能の差は、Rho family GTP 結合蛋白質 Cdc42 の活性化と細胞周囲の棘状突起 filopodia を特徴とする形態変化) 亢進などの差があることを既に報告しており、今回骨髄に及ぼす影響に関して、original の Dunn 細胞との比較で行うことが可能である。また骨髄由来の間葉

系幹細胞の運動能は、上皮由来のがん細胞運動とはメカニズムが大きく異なる。この点も考案し、間葉系由来の腫瘍細胞の転移能に関する細胞運動の役割に関しても追求する。

下記のメンバーとチームを作り全体の研究を遂行する。

連携研究者

吉川秀樹 (大阪大学医学部整形外科教授) - 全体のまとめ、臨床応用、大学院生の派遣  
研究協力者

田中太晶、若松透 (大阪大学医学部整形外科大学院生) - マウス動物実験

市田勝紀 (奈良先端大学院大学大学院生) - 間葉系細胞培養実験

### 4. 研究成果

(1) 骨肉腫の起源細胞と考えられる間葉系幹細胞の骨分化過程における、細胞運動様式、運動能の変化のメカニズムをマウス細胞を用いて検討した。これらの細胞の運動は間葉系細胞運動様式で、低分子量 G 蛋白質 Cdc42, Rac に依存することを最近見だし、論文報告 (4) した。

(2) 雄由来の LM8, Dunn を雌の同系 C3H マウスに移植後経時的に種々の臓器より DNA を抽出し、Y 染色体特異的遺伝子 sry 発現を PCR にて検討した結果、LM8 では移植後 3 週目に肺で、4 週目に血液で、Dunn では 4 週目に肺と血液で検出されたが、共に骨髄内では検出されなかった。

(3) 血中の生細胞のみを培養する方法を用いて血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells, CTCs) 数を検討すると、LM8 群は Dunn 群に比べ、CTCs がより早期に、より頻度が高く、又より数が多く検出できた。

(4) 血管内での生存 (anti-anoikis activity) を調べる為に、腫瘍細胞が接着できないように処理 (HEMA coat) した dish で培養すると、LM8 由来の CTC は増殖可能だが、Dunn 由来の CTC は増殖できずに死滅して行く事が明らかとなった。

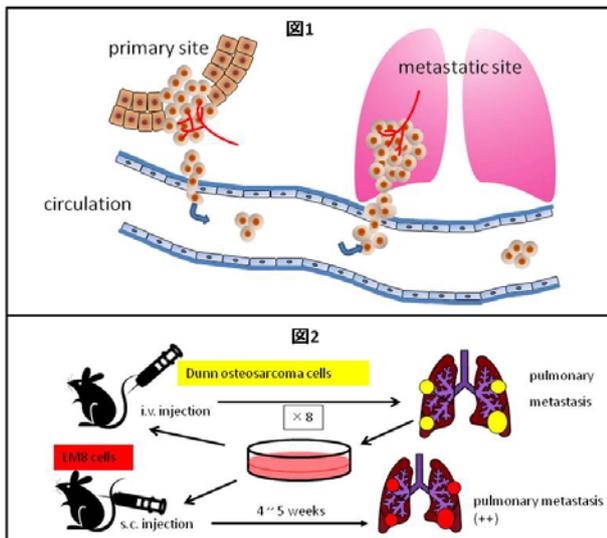
(5) 培養血管内皮細胞上に LM8, Dunn を重層し腫瘍細胞が血管内皮細胞に浸潤する extravasation を *in vitro* で模倣した trans-endothelial migration (TEM) assay のビデオ撮影を行い、LM8 は Dunn に比べ約 2 倍運動能が高かった。また単位時間当たりの血管内皮細胞の分裂回数を比較すると LM8 が Dunn に比べ約 2 倍多かった。(図 1, 2)

(6) (5)のメカニズムの一つとして、LM8がDunnに比較して大量に産生・分泌する内皮細胞増殖因子(VEGF)に着目し、VEGFの細胞内signalを阻害する低分子化合物Pazopanib(Glaxo Smith Klein社より供与)を作用させると、LM8の内皮細胞を通過するTEM運動能、血管内皮細胞の分裂共に抑制された。

(7) さらに動物実験において、原発巣切除後にマウスにPazopanibを経口で投薬すると、肺転移巣の減少、CTCの減少、血液中のVEGF濃度の減少が認められ、VEGF阻害薬が複数の機序で肺転移の抑制に作用している事を明らかにした。

以上より、LM8、Dunn共に骨髄内へのhomingはなく、転移先である肺血管内皮細胞での浸潤能に大きな差があり肺への転移巣形成に大きく関与していることが示唆され、国際学会で発表(8)すると共に論文報告(1)した。

さらに、VEGFの骨軟部腫瘍に関する研究は継続して行っており、大学院生の若松らが、骨軟部腫瘍の3次元増殖に深く関与する研究結果を得ており、国際学会で発表(7)するとともに、現在論文作成中である。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

(1) Tanaka, T., Yui, Y., Naka, N., Wakamatsu, T., Yoshioka, K., Araki, N., Yoshikawa, H., and Itoh, K.: Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8-VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy.: Clinical & Experimental Metastasis 査読有 30(4), 2013, 369-379

DOI: 10.1007/s10585-012-9543-8

(2) Nishimura, Y., Takiguchi, S., Yoshioka, K., Nakabeppu, Y., and Itoh, K.: Silencing of SNX1 by siRNA stimulates the ligand-induced endocytosis of EGFR and increases EGFR phosphorylation in gefitinib-resistant human lung cancer cell lines.: Int. J. Oncology 査読有 41, 2012, 1520-1530

DOI: 10.3892/ijo.2012.1578.

(3) Nishimura, Y., Yoshioka, K., Takiguchi, S., and Itoh, K.: Mechanisms of acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib in NSCLC cell lines: Evidence for a role of SNX1 in the regulation of EGF-dependent phosphorylated EGFR endocytosis in a human lung cancer cells.: Recent Res. Dev. Cell Biol. 査読無 4, 2012, 1-23

<http://www.researchgate.net/publication/2611335>

(4) Ichida, M., Yui, Y., Yoshioka, K., Tanaka, T., Wakamatsu, T., Yoshikawa, H., Itoh, K.: Changes in cell migration of mesenchymal cells during osteogenic differentiation.: FEBS Letters 査読有 585, 2011, 4018-4024

DOI:10.1016/j.febslet.2011.11.014

(5) Nishimura, Y., Bereczky, B., Yoshioka, K., Taniguchi, S., and Itoh, K.: A novel role of Rho-kinase in the regulation of ligand-induced phosphorylated EGFR endocytosis via the early/late endocytic pathway in human fibrosarcoma cells.: Journal of Molecular Histology 査読有 42(5), 2011, 427-442

DOI: 10.1007/s10735-011-9348-0

(6) Nishimura, Y., Yoshioka, K., Takiguchi, S., Bereczky, B., Nakabeppu, Y., and Itoh, K. A Role for SNX1 in the Regulation of EGF-Dependent Phosphorylated EGFR Endocytosis Via the Early/Late Endocytic Pathway in a Gefitinib-Sensitive Human Lung

Cancer Cells.: Current Signal Transduction Therapy 査読無 6(3), 2011, 383-395  
[http://www.benthamdirect.org/pages/b\\_getarticlebyissue.php](http://www.benthamdirect.org/pages/b_getarticlebyissue.php)

〔学会発表〕(計 15 件)

(1) Itoh, K.: Sodium butyrate induced cellular senescence and inhibited invasion of cancer cells with distinct mechanism: The 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology 2012年12月17日 Moscone Center (San Francisco, CA, USA)

(2) Tanaka, T.: Dynamic Analysis of Lung Metastasis by Mouse Osteosarcoma LM8: The 17th Connective Tissue Oncology Society 2012年11月15日 Hilton Prague (Prague, Czech Republic)

(3) 田中太晶、マウス骨肉腫細胞株 Dunn と高肺転移亜株 LM8 における血中循環腫瘍細胞 (CTCs) の動的・経時的解析: 第 71 回日本癌学会学術総会 2012年9月20日ロイトン札幌 (北海道)

(4) 西村行生、SNX1-siRNA 導入 gefitinib 耐性肺癌細胞内における EGFR リン酸化および downregulation の解析: 第 71 回日本癌学会学術総会 2012年9月20日ロイトン札幌 (北海道)

(5) 吉岡潔子、酪酸ナトリウムによるがん細胞浸潤の抑制: 第 71 回日本癌学会学術総会 2012年9月20日ロイトン札幌 (北海道)

(6) 若松透、滑膜肉腫に対する血管新生阻害薬による分子標的治療: 第 71 回日本癌学会学術総会 2012年9月19日ロイトン札幌 (北海道)

(7) Wakamatsu, T.: Anti-tumor effect of VEGF-targeted therapy on Synovial sarcoma: 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society 2012年9月4日 Brisbane Convention & Exhibition Centre (Brisbane, Australia)

(8) Tanaka, T.: Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8 – VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy: 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society 2012年9月3日 Brisbane Convention & Exhibition Centre (Brisbane, Australia)

(9) 田中太晶、マウス骨肉腫細胞株 Dunn と高肺転移亜株 LM8 における血中循環腫瘍細胞

(CTCs) の動的・経時的解析: 第 45 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2012年7月15日東京国際フォーラム (東京都)

(10) 吉岡潔子、酪酸ナトリウムおよびプロテアソーム阻害剤 MG132 の悪性腫瘍に対する浸潤抑制作用: 第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会 2012年7月13日オリエンタルホテル広島 (広島県)

(11) 田中太晶、マウス骨肉腫高肺転移亜株 LM8 における肺転移成立時の動的解析 VEGF は抗転移治療のターゲットとなりうる: 第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会 2012年7月12日オリエンタルホテル広島 (広島県)

(12) 伊藤和幸、どうして骨肉腫は肺転移をするのか?: 第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会 2012年7月12日オリエンタルホテル広島 (広島県)

(13) Tanaka, T.: Sequential Detection of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Mouse Osteosarcoma Dunn and its Highly Metastatic subline LM8: SICOT 2011 25th Triennial World Congress 2011年9月7日 Prague Congress Centre (Prague, Czech Republic)

(14) 田中太晶、マウス骨肉腫細胞株 Dunn と高肺転移株 LM8 における血中循環腫瘍細胞 (CTCs) の動的・経時的解析: 第 44 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2011年7月15日国立京都国際会館 (京都府)

(15) 田中太晶、マウス骨肉腫細胞株 Dunn と高肺転移株 LM8 における血中循環腫瘍細胞 (CTCs) の動的・経時的解析: 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会 2011年6月30日アクトシティ浜松 (静岡県)

〔図書〕(計 1 件)

(1) 若松透、伊藤和幸、医学書院『臨床整形外科』、ベバシズマブ Bevacizumab-VEGF モノクローナル抗体: 47(3), 2012, 240-243

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
大阪府立成人病センター  
研究所 生物学部門  
<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/biology.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 和幸 (Itoh Kazuyuki)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構  
大阪府立成人病センター (研究所)・  
生物学部門・部門長

研究者番号 : 20301806

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

吉川 秀樹 (Yoshikawa Hideki)  
大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 60191558