

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 05 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890070

研究課題名（和文） 骨肉腫の肺転移形成と血液凝固・線溶因子との関連

研究課題名（英文） Relationship between lung metastases of osteosarcoma and coagulation-fibrinolytic factors

研究代表者

木村 浩明（KIMURA HIROAKI）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50608693

研究成果の概要（和文）：ヒト骨肉腫 cell line “143B” の核に GFP、細胞質に RFP が発現した 2 色の蛍光を有する 143B-dual を使用し、転移能の異なる複数の cell line を最初に樹立した。それらの細胞における uPA、PAI-1、TF の発現量を Eliza と PCR で確認し、uPA と PAI-1 が転移能と強く関連している事が証明された。現在は 143B における uPA と PAI-1 の shRNA を行い、*in vivo* において転移能がどのように変化するかを観察する予定である。

研究成果の概要（英文）：With use of human osteosarcoma cell line “143B dual color”, in which GFP is expressing in nucleus and RFP is expressing in cytoplasm, we first developed multiple cell lines that have multiple metastatic potential. In each cell line, we evaluated expression level of uPA, PAI-1, and TF by ELIZA and PCR. The result showed strong relationship between metastatic potential and expression of uPA & PAI-1. We have now performed shRNA of uAP & PAI-1 for 143B cell line. Then we will evaluate how metastatic potential change after suppression of uPA and PAI-1 in osteosarcoma.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |

研究分野：骨軟部腫瘍

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨肉腫、肺転移、プラスミノゲン活性化因子インヒビター-1 (PAI-1)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子、蛍光蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫患者の循環血液中には多数の癌細胞が流れ、そのうちごくわずかな細胞だけが

肺での接着に成功し転移巣を形成すると言われている。しかし、どのような細胞がどのように肺に生着し増殖するのか、また細胞

側・ホスト側のどのような因子がこの肺での生着に関与しているかについては詳しく解明されていない。

血液凝固因子（血小板やフィブリンなど）や線溶因子（プラスミノゲンやウロキナーゼなど）が悪性腫瘍の増殖や転移に強く関連していることはこれまで多く報告されている。我々も、線溶関連因子であるプラスミノゲン活性化因子インヒビター-1 (PAI-1) やウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (uPA)の肉腫細胞における発現が肺転移発生に強く関連していることを報告してきた (Tsuchiya H, et al. *Anticancer Res.* 1997)。またこれらの物質は、近年のがん幹細胞の研究でも、その関連が注目されている。しかし、これまでの研究ではこれらの因子が転移形成の過程すなわち①原発巣から血管内への流入②循環血液中での遊走③転移巣での接着④血管外脱出や増殖のうち、どの過程に関連しているかは解析が困難であった。

## 2. 研究の目的

がん細胞を可視化して生体内で観察することで悪性腫瘍の転移の過程を明らかにしようとして、これまで我々はアメリカ・サンディエゴのアンチキャンサー社と共同で実験を行ってきた。これまでに、緑色蛍光蛋白 (GFP) や赤色蛍光蛋白 (RFP) で標識した癌細胞をマウスに血管内注入あるいは移植することにより、生きたマウスにおける癌の血行性転移のダイナミックな各過程を高解像度の蛍光顕微鏡を使用して連続的に且つ視覚的に捉えることに成功している (Hayashi et al. *Cancer Res* 2007;67:8223, Yamauchi et al. *Cancer Res* 2006;66:4208)。また、これまで非常に困難であるといわれてきた肺でのイメージングにも取り組み、生きたままで且つ繰り返し肺を観察できるマウスモデルを確

立し、肺転移形成の過程を蛍光蛋白発現がん細胞を用いて観察することに成功した

(Kimura et al. *J Cell Biochem.*

2010 ;109 :58-64)。

このなかで、尾静脈から注射されたがん細胞は肺の毛細血管に一旦塞栓し、そして肺への接着に成功した僅かな細胞だけが肺に留まること、その能力は細胞の種類によって大きく異なることを可視化し証明した。これは、がん細胞の肺に対する生体内接着アッセイとも言える実験である。また単一細胞レベルでの観察および核と細胞質が別の色で標識されていることで、細胞の生死も確認できる。これまで *in vitro* でしかできなかった接着アッセイを *in vivo* で行うことを可能とした非常に独創的なモデルであるといえる。

このモデルを利用して、血液凝固・線溶関連因子とがん細胞の肺への接着との関係を検討することが本研究の目的である

## 3. 研究の方法

### (1) 異なる転移能を持った複数の骨肉腫 cell line の樹立

今回使用するのは、ヒト骨肉腫細胞株 143B である。この細胞株に関してはすでに核に GFP・細胞質に RFP が発現した 2 色の細胞 (143B-dual) を樹立しており、すぐにでも使用できる。この細胞株をヌードマウスの尾静脈に注射し実験肺転移を作成し、それを培養細胞株に戻す *in vivo* 細胞継代を繰り返して、転移能の異なった数種類の 143B-dual を樹立する。



### (2) 転移能の異なる細胞株での血液凝固・線溶関連因子の発現・産生量

血液凝固・線溶関連因子に関しては、これま

でにがんの転移と強い関連があると報告されている PAI-1・uPA・tissue factor;TF に注目して研究を行う。転移能の異なった 143B-dual を樹立したのち、まずこれらをヌードマウスに  $2 \times 10^6$  個 尾静脈より注射し、それぞれの肺転移形成能を確認する。また培養細胞より RNA を抽出しそれぞれの因子の mRNA の発現を real time quantitative PCR で、培養液の上清からそれぞれの因子の産生量を ELIZA 法で定量化し、その肺転移形成能との相関を調べる。この結果により、それぞれの因子が肺転移形成に対して促進・抑制、どちらの方向に働いているかということが推測できる。

### (3) shRNA による血液凝固・線溶関連因子のノックダウンと、生体内接着アッセイを用いた血液凝固・線溶関連因子とがん細胞の肺への接着との関連

それぞれの因子と骨肉腫細胞の肺での接着との関連を明らかにするため、shRNA で発現がノックダウンされた細胞を作成する。前述の実験で、それぞれの因子が高発現している細胞株を選択し、shRNA でその発現をノックダウンする。ここでも RT-PCR および ELIZA でその発現がノックダウンされているかを確認する。次にそれぞれの因子が高発現していた細胞株とノックダウンした細胞株をそれぞれヌードマウスに  $2 \times 10^5$  個 尾静脈より注射し、注射直後および 24 時間後に肺の表面に生存している細胞の数をカウントする。24 時間後に観察する理由は、これまでの我々の実験結果から、尾静脈より注射され肺に接着し残存するがん細胞の数は、おおよそ 24 時間でプラトーに達するという結果を得たからである。この結果より、それぞれの因子が骨肉腫細胞の肺への接着を促進しているのか、抑制しているのか、何も影響を及ぼさないのかという事が証明されるはずである。



左：ヒト線維肉腫 HT1080-dual  $2 \times 10^5$  をヌードマウスの尾静脈に注射した直後の肺  
右：24 時間後の同一マウスの同一部位肺への接着に成功した細胞だけが残存している。

## 4. 研究成果

(1)まず、転移能の異なる骨肉腫細胞を数種類樹立した。ヒト骨肉腫 cell line 143B の核に GFP、細胞質に RFP が発現した 2 色の蛍光を有する 143B-dual が作成済であったため、この 143B-dual をヌードマウスの尾静脈に注射し実験肺転移を作成、それを培養細胞株に戻す *in vivo* 細胞継代を行った。そこで樹立した cell line を 143B-LM1 とし、この cell line を用いて *in vivo* 継代を更に繰り返して行い、143B-LM2, 143B-LM3, 143B-LM4 まで樹立した。

次にこれらの肺転移形成能を調べた。それぞれの cell line を  $1 \times 10^6$  個ヌードマウスに尾静脈注射し、2 週間後に肺を切除して、肺転移の個数を蛍光顕微鏡を用いて定量化した。またヌードマウスの脛骨に  $2 \times 10^5$  個細胞を移植し同所移植モデルを作成。移植 4 週後に同じように肺を切除して、肺転移の個数を蛍光顕微鏡を用いて定量化した。その結果、*in vivo* 継代の数が増すごとに転移能が上がっていくことを確認した。

この結果から、転移能の異なる骨肉腫の細胞株を 4 種類得ることができた。転移能が上がるに連れて上昇していく分子や蛋白を見つけることで、骨肉腫の肺転移の治療につながっていくと考えている。この cell line は今回の凝固・線溶因子の実験のみならず、他の因

子の解析にも使用することができる。また、これらのcell lineすべてに蛍光蛋白が安定して発現していることも確認しており、転移能の違いによる細胞動態の観察もsingle cell レベルで可能である。

(2) 樹立した転移能の異なる複数のヒト骨肉腫cell line 143B, 143B-LM1, 143B-LM2, 143B-LM3, 143B-LM4 を使用し、ELIZA法で各cell lineの培養液上清に分泌された線溶関連因子PAI-1, u-PA, TF の濃度を測定した。その結果、転移能が上昇するにつれてPAI-1・u-PAの濃度が上昇していた。TFに関しては転移能と上清中の濃度に関して差は認めなかった。またRT-PCRで各cell lineにおける線溶因子のmRNAの発現を調べたところ、同様の結果であった。

(3) shRNAで最も転移能の高かった143B dual LM-4におけるPAI-1、およびuPAの発現をブロックしたcell lineを作成し、その腫瘍形成能・転移能を比較する実験を計画したが、shRNAが軌道に乗らず、現在も実験を継続中である。また同時に骨肉腫の同所移植モデルを作成し、PAI-1およびuPAの中和抗体を投与し、マウスの肺転移の発生および生存率に差が出るかを確認していく予定である。

## 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 11 件)

- ① Momiyama M, Suetsugu A, Kimura H, Kishimoto H, Aki R, Yamada A, Sakurada H, Chishima T, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM., Imaging the efficacy of UVC irradiation on superficial brain tumors and metastasis in live mice at the subcellular level., 査読有, J Cell Biochem.

2013; 114 (2):428-34., doi: 10.1002/jcb.24381.

- ② Momiyama M, Zhao M, Kimura H, Tran B, Chishima T, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM., Inhibition and eradication of human glioma with tumor-targeting Salmonella typhimurium in an orthotopic nude-mouse model., 査読有, Cell Cycle., 2012; 11(3) :628-32., doi: 10.4161/cc.11.3.19116.
- ③ Kimura H, Tome Y, Momiyama M, Hayashi K, Tsuchiya H, Bouvet M, Hoffman RM., Imaging the inhibition by anti-β1 integrin antibody of lung seeding of single osteosarcoma cells in live mice., 査読有, Int J Cancer. 2012 ;131(9):2027-33. doi: 10.1002/ijc.27475.
- ④ Hayashi K, Karita M, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Tsuchiya H., Functional outcomes after total scapulectomy for malignant bone or soft tissue tumors in the shoulder girdle., 査読有, Int J Clin Oncol. 2011; 16(5): 568-73. doi: 10.1007/s10147-011-0229-z.
- ⑤ Takata M, Sugimoto N, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Tanzawa Y, Kimura H, Miwa S, Takeuchi A, Tsuchiya H., Activity of bone morphogenetic protein-7 after treatment at various temperatures: freezing vs. pasteurization vs. allograft., 査読有, Cryobiology. 2011; 63(3):235-9. doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.09.001.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Kimura H. Anti-β1 Integrin Antibody Inhibits Osteosarcoma Lung Seeding and Metastasis. 9<sup>th</sup> Asian-Pacific MusculoSkeletal Tumor Society meeting. 2012.9.12, Hilton

Kuala Lumpur (Malaysia)

- ② 木村浩明, FISH を用いた軟部肉腫における MDM2 遺伝子増幅の解析, 第 85 回日本整形外科学会総会, 2012 年 5 月 18 日, 国立京都国際会館 (京都府)
- ③ Kimura H. Real time imaging of single sarcoma cell dynamics of lung metastasis. AAOS annual meeting 2012, 2012.2.7, Moscone center (USA)
- ④ Kimura H. Long-term follow-up of cannulation for solitary bone cysts. 16<sup>th</sup> General meeting of International Society of Limb-Salvage, 2011.9.18, National Convention Center (China)
- ⑤ 木村浩明, 蛍光蛋白発現がん細胞を用いた肺転移形成のリアルタイムイメージング, 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)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

木村 浩明 (KIMURA HIROAKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号 : 50608693

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし