

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592233

研究課題名(和文)新規マウス軟部肉腫高肺転移株の樹立と肺転移再現動物モデルの開発

研究課題名(英文) Establishment of a murine soft tissue sarcoma cell line with high metastatic potential to the lung

研究代表者

中 紀文(Naka, Norifumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90601964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス良性神経系軟部腫瘍細胞株TR6BC1からマウス軟部肉腫で初めて自然肺転移を生じる高肺転移株TR6BC1-LMの樹立に成功した。軸索伸展や遊走能に関する Semaphorin4D/PlexinB1シグナル伝達路が本細胞株で活性化されており、RNA干渉による機能抑制実験において、亢進した運動能、浸潤能の著しい減弱が観察されたことから、本シグナルが肺転移能を賦与する機能分子群の一つである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established a murine soft tissue sarcoma cell line (TR6BC1-LM) with high metastatic potential to the lung from benign murine neurogenic cell line (TR6BC1) using repeated Fidler's procedures. Compared to TR6BC1, TR6BC1-LM exhibits higher in vitro 3D growth ability, rapid in vivo tumor formation property and enhanced invasive potential. Semaphorin4D/PlexinB1 signaling known as guidance signals in development was activated in this cell line. PlexinB1 silencing induced attenuation of motility and invasiveness of TR6BC1-LM. These data suggest that activation of Semaphorin4D/PlexinB1 signaling might confer high metastatic capacity on this cell line.

研究分野：骨軟部腫瘍学

キーワード：骨軟部腫瘍 肉腫細胞株 実験動物モデル 転移能 plexin semaphorin

1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は四肢を中心に全身各所に発生するが、その生命予後は原発巣ではなく転移巣、とりわけ肺転移巣により規定される。転移巣の形成過程は 1) 原発巣からの離脱、血管への侵入、2) 血液中での生存と標的臓器への血管内移動、3) 血管壁への接着と血管外への漏出、4) 標的臓器への生着と増殖・増大の各段階を経て成立するとされる。このうち、転移の早期には血管の外から内への浸潤能や血液内浮遊状態での生存能が要求されるが、後期には逆に、血管の内から外への浸潤能と肺組織内接着状態での生存・増殖能が必要となる。転移が成立する上でどの段階の重要性が高いのか、あるいはどのような分子機構が各段階の機能変換を制御しているのかなど問題はまだまだ十分明らかになっていない。

肺転移巣を効果的に制御する方法を開発するためには、上記の多段階からなる肺転移過程を再現する実験モデルの導入が不可欠である。我々の研究グループは、転移能のない C3H マウス骨肉腫細胞株 Dunn から Fidler の方法 (Poste G, Fidler IJ Nature 1980) で転移能を強化し、高肺転移株 LM8 の樹立に成功した。本細胞株は広く国内外の研究者に用いられ、代表的な悪性骨腫瘍である「骨肉腫」の肺転移メカニズムに関する研究成果が数多く報告されている。しかしながら、現在まで軟部肉腫の高肺転移細胞株や肺転移を再現する動物実験モデルの報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、マウス軟部肉腫高肺転移株の樹立と肺転移再現動物モデルの開発を主たる目的とし、樹立されたマウス軟部肉腫高肺転移株を対象にその発現・機能解析を通じて軟部肉腫の肺転移メカニズムを詳細に検討し、多段階からなる肺転移過程を制御する機能分子を探索する。

3. 研究の方法

良性軟部腫瘍細胞株として報告されている C3H マウス神経鞘腫細胞株 TR6BC1 を 1,000 万個 syngeneic な C3H マウスに移植すると約 3 週間で 1cm を越える腫瘍を形成する。本細胞株を 100 万個尾静注すると 10 日以内に広範な肺転移巣を形成することが新たに観察された。このことから、我々が入手した TR6BC1 は良性の神経鞘腫ではなく悪性の神経性軟部肉腫として取り扱うべき細胞株であると考えられた。本細胞株を用い、以下の二つのアプローチで肺転移能を増強し、肺転移の臨床像を再現するマウス軟部肉腫実験動物モデルの作成を試みるとともに、肺転移能に関連する機能分子の絞り込みを行った。

「1」後期肺転移能を高めたマウス軟部肉腫細胞株 TR6BC1-LML の樹立

Fidler の方法に準じ、TR6BC1 を 100 万個 C3H マウスの尾静脈より注入し、2-3 週間後呼吸

不全を示したマウスを安楽死させ両肺を無菌下に摘出する。両肺に形成された転移結節を切除・細切後、コラゲナーゼ処理にて単細胞化する。形態的に純度が高まったと判断された段階で、腫瘍細胞を再び尾静注する。本操作 (尾静注 肺転移巣形成 in vitro 細胞培養 再度尾静注、図 1.) を複数回 (2-3 回程度) 繰り返すことで、多段階からなる肺転移形成過程のうち、後半の血管外浸潤、肺組織への生着、増殖に長けた細胞を分離・培養する。

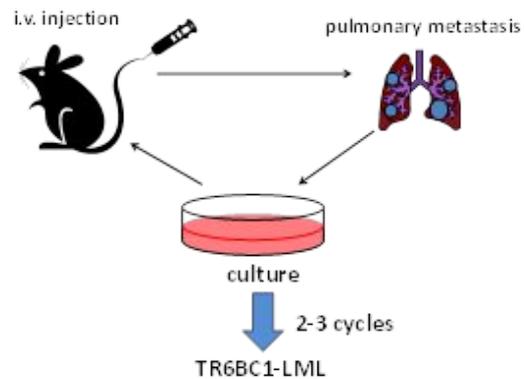


図 1

「2」前期肺転移能を高めたマウス軟部肉腫細胞株 TR6BC1-LME の樹立

TR6BC1 を 1,000 万個 C3H マウスの皮下に注入し、腫瘍体積が 2cm³ を超えた時点でマウスを安楽死させ、心より無菌下に全血採血を行う。得られた血液を特殊培地で培養し、血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell, CTC) の増殖を観察する。形態学的に腫瘍細胞の純度が高まった時点で、再度腫瘍細胞をマウス皮下に移植する。CTC を回収・増幅する本操作 (原発巣形成 CTC の採取 in vitro 細胞培養 再度原発巣形成、図 2) を複数回 (2-3 回程度) 繰り返す。この操作により、多段階からなる肺転移形成過程のうち、前半の血管内浸潤および血液内生存に長けた細胞を分離・培養する。

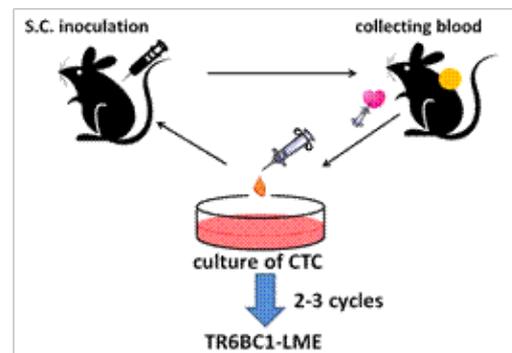


図 2

「3」TR6BC1-LME および TR6BC1-LML を用いた肺転移再現動物モデルの開発

TR6BC1-LME あるいは TR6BC1-LML を 1,000 万個 C3H マウスの皮下に注入し、腫瘍体積が

2cm³を超えた時点でマウスを安楽死させ、両肺を無菌下に摘出する。肺組織を細切、単細胞化後培養し、腫瘍細胞の存在を調べる。肉眼的に観察可能な多数の肺転移結節が複数のマウスで確認できれば、肺転移再現動物モデルの完成とみなされる。

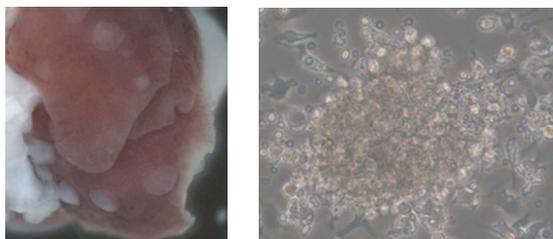
「4」マウス軟部肉腫高肺転移株の生物学的機能解析

作製された軟部肉腫高肺転移株と親株 TR6BC1 で 2 次元 3 次元での増殖能、運動能、浸潤能を調べ、生物学的機能の差を比較検討する。さらに軟部肉腫肺転移能に関連する機能分子を絞り込み、ヒト軟部肉腫肺転移の効果的な診断手法や治療法の生体指標となる分子の同定を行った。

4. 研究成果

【1】肺転移再現動物モデルの開発

研究方法「1」を用いて尾静注 肺転移形成 in vitro 細胞培養 再度尾静注の操作 (Fidler 法) を繰り返し TR6BC1-LML を樹立した。2 次元培養下で長紡錘形の形態をとり単層性に緩徐に増殖する親株 TR6BC1 に比べ、本細胞株は小型で短紡錘形の細胞からなり重層性に増殖することが観察された (図 3)。



肺表面に転移性結節を多数認める 分離・培養された細胞は重層性に増殖する

図 3

樹立された TR6BC1-LML は C3H マウス尾静注により 100%の確率で肺転移を形成した。さらに本細胞株をマウス背部皮下に移植したところ、ほぼ 100%の確率で複数の肺転移巣を形成することが確認された (図 4)。

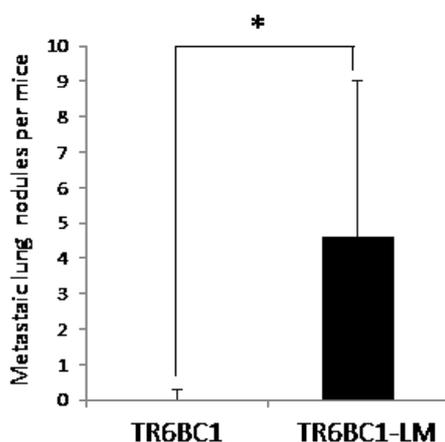


図 4

作製された TR6BC1-LML がマウス背部皮下に

注入するだけで高率に自然肺転移を生じ軟部肉腫の肺転移過程を再現することから、本細胞株を前・後期の肺転移能を高めたマウス軟部肉腫細胞株として用いることが可能と判断した。このことから、本研究の主たる目的である「マウス軟部肉腫高肺転移株の樹立と肺転移再現動物モデルの構築」作業は達成されたものと考えられた。以降の実験において、樹立されたマウス細胞株を「TR6BC1-LM」と命名した。

【2】マウス軟部肉腫高肺転移株の生物学的形態・機能解析

本細胞株 (高肺転移株) は、免疫染色にて S-100, GFAP, Nestin 陽性で、親株同様神経系細胞の性格を示した。2 次元の増殖能は親株と同程度であったが、3 次元の増殖能やマウスでの腫瘍形成能は親株に比べ有意に増大していた。in vitro における運動能 (図 5)、浸潤能 (図 6) は、親株に比べ本細胞株で著明に亢進していた。

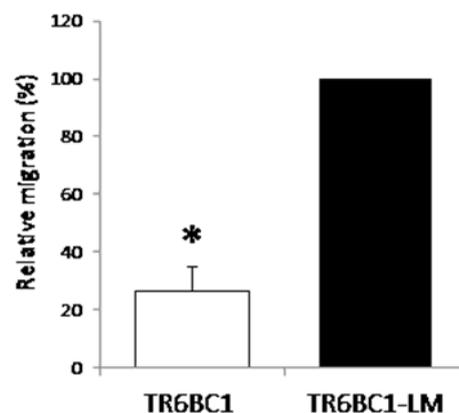


図 5 運動能

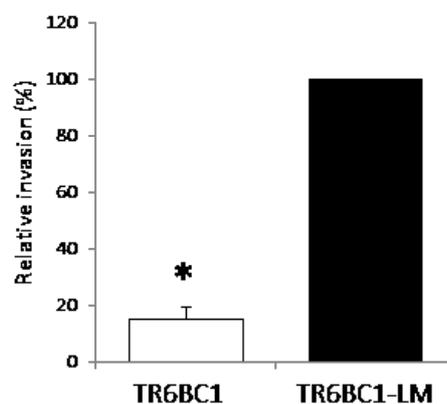


図 6 浸潤能

両細胞株の生物学的機能差を生じる複数の候補分子の中から、神経系細胞で軸索伸展や遊走能に関与する Semaphorin4D/PlexinB1 シグナル伝達路に焦点を絞り、両細胞株で発現量の差を RNA レベル、タンパクレベルで検討した。

リガンドである Semaphorin4D は両細胞株で大きな差を認めなかったが、シグナル受容体である PlexinB1 は RNA レベル (図 7)、タンパクレベル (図 8) で親株に比べ高肺転移株において著明な発現亢進が観察された。

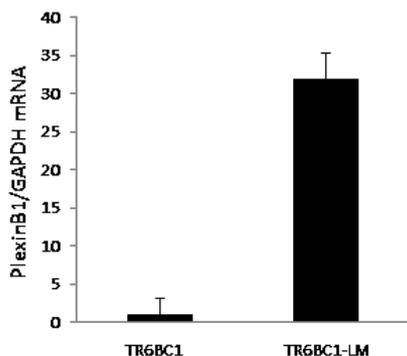


図 7

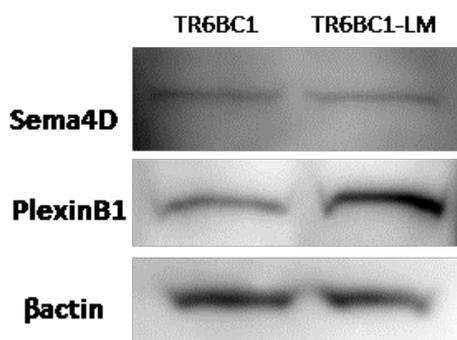


図 8

RNA 干渉による機能抑制実験において運動能、浸潤能が低下傾向を示すことが観察され、Semaphorin4D/PlexinB1 シグナルが肺転移能を賦与する機能分子群の一つである可能性が示唆された。

上記の知見を臨床応用するために、Semaphorin4D/PlexinB1 シグナル伝達路を特異的に抑制する候補化合物を用い、in vitro, in vivo の実験系で運動能、浸潤能およびマウスでの腫瘍形成能、肺転移能に対する抑制効果を検討中である。

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 7 件)

1. Imura Y, Yasui H, Outani H, Wakamatsu T, Hamada K, Nakai T, Yamada S, Myoui A, Araki N, Ueda T, Itoh K, Yoshikawa H, Naka N. Combined targeting of mTOR and c-MET signaling pathways for effective management of epithelioid sarcoma. *Mol Cancer*. (査読あり) 2014; 13:185. DOI:10.1186/1476-4598-13-185.
2. Outani H, Tanaka T, Wakamatsu T, Imura

Y, Hamada K, Araki N, Itoh K, Yoshikawa H, Naka N. Establishment of a novel clear cell sarcoma cell line (Hewga-CCS), and investigation of the antitumor effects of pazopanib on Hewga-CCS. *BMC Cancer*. (査読あり) 2014 19;14: 455.

DOI: 10.1186/1471-2407-14-455.

3. Wakamatsu T, Naka N, Sasagawa S, Tanaka T, Takenaka S, Araki N, Ueda T, Nishizawa Y, Yoshikawa H, Itoh K. Deflection of VEGF action by SS18-SSX and composite VEGF- and CXCR4-targeted therapy in synovial sarcoma. *Cancer Sci*. (査読あり) 2014; 105(9): 1124-34. DOI: 10.1111/cas.12469.
4. Kaneko K, Higuchi C, Naka N, Yoshikawa H. Expression of noggin, an antagonist of bone morphogenetic protein, in schwannoma: A possible mechanism. *Oncol Lett*. (査読あり) 2014; 8(1): 111-116. DOI: 10.3892/ol.2014.2138.
5. Yasui H, Naka N, Imura Y, Outani H, Kaneko K, Hamada KI, Sasagawa S, Araki N, Ueda T, Itoh K, Myoui A, Yoshikawa H. Tailored Therapeutic Strategies for Synovial Sarcoma: Receptor Tyrosine Kinase Pathway Analyses Predict Sensitivity to the mTOR Inhibitor RAD001. *Cancer Lett*. (査読あり) 2014; 347: 114-122. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.01.027.
6. Imura Y, Naka N, Outani H, Yasui H, Takenaka S, Hamada K, Ozaki R, Kaya M, Yoshida K, Morii E, Myoui A, Yoshikawa H. A novel angiomatoid epithelioid sarcoma cell line, Asra-EPS, forming tumors with large cysts containing hemorrhagic fluid in vivo. *BMC Research Notes*. (査読あり) 2013; 6: 305. DOI: 10.1186/1756-0500-6-305.
7. Tanaka T, Yui Y, Naka N, Wakamatsu T, Yoshioka K, Araki N, Yoshikawa H, Itoh K. Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8: VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy. *Clin Exp Metastasis*. (査読あり) 2013; 30(4): 369-379. DOI: 10.1007/s10585-012-9543-8.

[学会発表](計 10 件)

1. 金子恵子, 伊村慶紀, 王谷英達, 田中太晶, 安井広彦, 竹中 聡, 濱田健一郎, 中 紀文, 名井 陽, 吉川秀樹. 新規マウス軟部肉腫高肺転移株樹立の試み. 第46回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会: 平成 25 年 7 月 11-12 日、東京.
2. 伊村慶紀, 王谷英達, 安井広彦, 金子恵子, 竹中 聡, 濱田健一郎, 中 紀文, 名井 陽, 吉川秀樹. In vivo にて血腫

- 形成を示す新規血管腫様類上皮肉腫細胞株の樹立. 第 46 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会:平成 25 年 7 月 11-12 日、東京
3. 王谷英達,伊村慶紀,安井広彦,竹中 聡,濱田健一郎,田中太晶,中 紀文,名井陽,吉川秀樹. 新規淡明細胞肉腫株に対する抗血管新生阻害薬の治療効果. 第 46 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会:平成 25 年 7 月 11-12 日、東京
 4. Yoshinori Imura, Norifumi Naka, Hirohiko Yasui, Hidetatsu Otani, Keiko Kaneko, Satoshi Takenaka, Kenichiro Hamada, Akira Myoui, Hideki Yoshikawa. Anti-tumor effect of an mTOR inhibitor, (RAD001) against epithelioid sarcoma cell lines. International Society of Limb Salvage 17th General Meeting: 2013/9/11-13, Bologna Italy.
 5. Hirohiko Yasui, Yoshinori Imura, Hidetatsu Otani, Keiko Kaneko, Kenichiro Hamada, Satoru Sasagawa, Kazuyuki Itoh, Norifumi Naka, Hideki Yoshikawa. Anti-tumor effect of an mTOR inhibitor, RAD001 to synovial sarcoma. International Society of Limb Salvage 17th General Meeting: 2013/9/11-13, Bologna Italy
 6. Norifumi Naka. Targeted strategy to treat synovial sarcoma. 8th combined Meeting of orthopaedic research societies: 2013/10/13-16, Venice Italy.
 7. Takaaki Tanaka, Yoshihiro Yui, Norifumi Naka, Toru Wakamatsu, Kazuyuki Itoh, Hideki Yoshikawa. Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma. Metastasis research society 15th International Biennial Congress: 2014/6/28-7/1, Heidelberg, Germany.
 8. Yoshinori Imura, Norifumi Naka, Hirohiko Yasui, Hidetatsu Otani, Keiko Kaneko, Satoshi Takenaka, Kenichiro Hamada, Satoru Sasagawa, Akira Myoui, Nobuhito Araki, Takafumi Ueda, Kazuyuki Itoh, Hideki Yoshikawa. Combined targeting of mTOR and c-MET significantly inhibits epithelioid sarcoma cell growth. Metastasis research society 15th International Biennial Congress: 2014/6/28-7/1, Heidelberg, Germany.
 9. 中 紀文. 肉腫と幹細胞. 第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会:平成 26 年 7 月 17-18 日、大阪
 10. 伊村慶紀,安井広彦,王谷英達,濱田健一郎,竹中 聡,名井 陽,中 紀文,吉川秀樹. 類上皮肉腫に対する mTOR と c-MET を標的とした抗腫瘍効果. 第 73 回

日本癌学会学術総会:平成 26 年 9 月 25-27 日, 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

中 紀文 (NAKA Norifumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 90601964

(2)研究分担者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA Hideki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60191558