

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462322

研究課題名(和文)細胞形態、糖代謝、微小環境からアプローチする悪性骨軟部腫瘍の転移浸潤制御

研究課題名(英文) Regulation of malignant bone and soft-tissue tumor metastasis and invasion via cell morphology, glucose metabolism and microenvironment.

研究代表者

柳川 天志 (Yanagawa, Takashi)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40400725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト線維肉腫細胞HT-1080はコラーゲンゲル内で三次元培養すると間葉性遊走を示す細胞とアメーバ様遊走を示す細胞の両者が認められることが知られている。Autocrine motility factor (AMF) は間葉性形態を示している細胞に対し主にRhoAの活性化を強化することによりアメーバ様遊走を刺激する。AMFは細胞運動を刺激するだけでなく糖代謝に関わる酵素でもあるがこの形態変化は糖代謝に影響を受けるものではないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human fibrosarcoma cell line HT-1080 shows both mesenchymal and amoeboid migrations in 3D collagen gel cell culture system. We revealed that autocrine motility factor (AMF) changed the cells showing mesenchymal shape into amoeboid type via RhoA activation. Glucose metabolism did not affect the morphological change, although AMF is also important for glucose metabolism not for cell migration.

研究分野：整形外科

キーワード：細胞形態 細胞運動 転移 浸潤 肉腫

1. 研究開始当初の背景

(1)骨肉腫やユーイング肉腫等の骨軟部悪性腫瘍に転移が生じた場合の治療成績はいまだ不十分である。上皮間葉転換(EMT)は上皮系の表現型を持つ細胞が運動能の高い間葉系の表現型を示すようになる現象で上皮系の形態を示す悪性腫瘍が浸潤・転移するときに EMT を生じることが示されている。

(2)骨肉腫、線維肉腫等は間葉系の形態を示す悪性腫瘍であるが、間葉系形態を示す良性腫瘍も存在する。臨床においては間葉系の形態をとれば必ず浸潤・転移するというわけではなく、腫瘍が浸潤・転移するためにはさらに他の要因も必要とするはずである。

(3)近年間葉アメーバ転換(MAT)が悪性腫瘍の浸潤・転移に重要であることが報告されており、間葉系細胞における MAT の分子機構の解明・制御が待たれている。

2. 研究の目的

(1)我々は以前細胞運動を刺激し、かつ糖代謝にも関わる分子である autocrine motility factor (AMF)が EMT を誘導することを報告した。

(2)間葉性遊走に関わる分子は Rac1、アメーバ様遊走に関わる分子は RhoA であると考えられているが、非常に興味深いことに腫瘍細胞への AMF の添加によりこれらの二分子はともに活性化することを我々は確認した。このため MAT にも AMF が関わると予想した。

(3)MAT の分子機構を解明するとともに AMF の制御により MAT を抑制し腫瘍の浸潤・転移制御につなげたいと考え本研究を立案した。さらに AMF は糖代謝にもかかわる分子であることから MAT が糖代謝にも関わるかを調べ、糖代謝と細胞形態の関係を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1)培養

実験細胞には HT-1080 ヒト線維肉腫細胞株を用いた。

三次元培養は 0.3% Cellmatrix Type I-A(新田ゼラチン), DMEM, HEPES 緩衝液を混和し 3×10^6 /ml で細胞を添加しコラーゲンゲルを作成して行った。これを 37 °C、5%CO₂の下で培養した。

顕微鏡下に細胞形態を確認する際には μ -slide Chemotaxis^{3D} (ibidi, Martinsried, Germany)を用いて培養を行った。

(2)試薬

・プロテアーゼ阻害剤(PI) ProteoGuard™ EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail40 倍希釈

・ROCK 阻害剤 Y27632

・リコンビナント human AMF、hexokinase、GLUT1

(3)細胞の観察

培養開始から 6h 後に BZ-9000 BIOREVO (KEYENCE, Osaka)で撮像した HT-1080 細胞の Z 軸全焦点画像を構築した。アメーバ様形態と間葉系形態の比率を計測し各条件にて AMF の添加が細胞形態に影響を与えるかを²検定で検討した。

アメーバ様の形態は最大径と最少径の比が 2 未満と定義し分裂期にあるものは除外した (Paňková D et al. Eur J Cell Biol. 2012)。

(4)Real-time PCR

real-time PCR でアメーバ様、間葉様の形態を示した時の AMF の発現を解析した。比較のため通常の二次元培養も行った。コラーゲンゲル内の細胞からの RNA の抽出には ISOGEN-LS を用い、二次元培養での細胞には ISOGEN を用いた。

AMF: probe: CCAACAAGGACCGCTTCAACCACTTC

forward primer: GCGCCGCTCTTCGAT

reverse primer: TGCCATGGTTGGTGTG

内部標準として b-actin を用い LightCycler Nano System(Roche Diagnostics, Mannheim)にて相対的定量を行った。

4. 研究成果

(1)細胞形態

HT1080 細胞にプロテアーゼ阻害剤(PI)を用いてアメーバ様遊走する細胞を誘導した。またアメーバ様遊走は Rho 依存性であるためその下流の ROCK の阻害剤 Y27632 を用いて間葉性遊走をする細胞を誘導した。それぞれにリコンビナント AMF を添加して細胞の形態の変化を調べた。

AMFの単独添加ではアメーバ様遊走を示す細胞の割合はコントロールと差はなかった。またPIでアメーバ様遊走を誘導させた細胞にAMF を添加してもAMF (-)のものに比べ細胞形態に変化はなかった。一方でY27632により間葉性形態を誘導した細胞にAMFを添加するとアメーバ様形態を示す細胞の割合はAMF (-)のものが25.6%であったのに対してAMF (+)にすることにより63.1%で優位に高い割合を示した ($p<0.01$)。

コントロール

	アメーバ様	間葉系
AMF (-)	43(55.8%)	34
AMF (+)	44(61.1%)	28

$p=0.63$

PI

	アメーバ様	間葉系
AMF (-)	89(82.4%)	19
AMF (+)	84(80.0%)	21

$p=0.78$

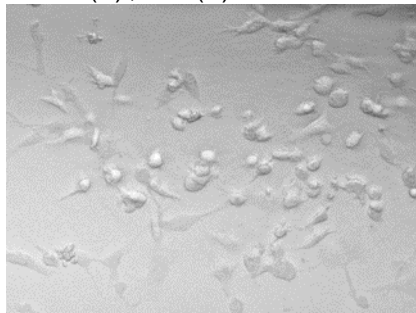
Y27632

	アメーバ様	間葉様
AMF (-)	30(25.6%)	87
AMF (+)	70(63.1%)	41

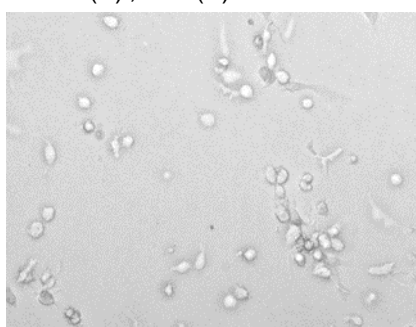
$p<0.01$

AMF 以外の糖代謝関連分子の hexokinase、GLUT1 や glucose 濃度は三次元培養下の細胞形態に大きな影響は与えなかった。

Y27362(+), AMF(-)

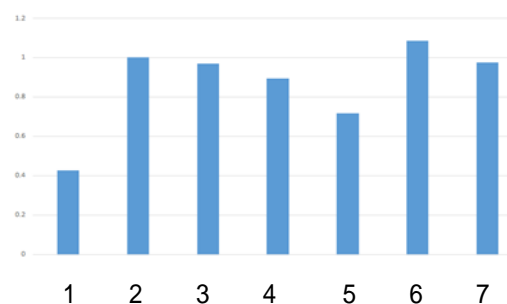


Y27632(+), AMF(+)



(2)AMF 発現

二次元培養と三次元培養を比較すると AMF の mRNA レベルでの発現は約二倍上昇した。一方で三次元培養下では形態を変化させても AMF の発現に大きな変化は生じなかった。AMF の添加により AMF の発現はやや減少しネガティブフィードバック機構が示唆された。



1. コントロール(2D)
2. コントロール(3D)
3. AMF(+)
4. PI(+)
5. PI(+), AMF(+)
6. Y27632(+)
7. Y27632(+), AMF(+)

AMF が ROCK 阻害剤により間葉系優位な形態を示していた HT-1080 をアメーバ様優位に変化

させた。RhoA ROCK のシグナルがブロックされた環境では AMF からの代替的なシグナルがアメーバ様へと形態を変化させることが示唆された。

これまで AMF は低酸素状態で発現が上昇し、その際 HIF1- が発現を制御することが知られていた。三次元培養が AMF の発現を上昇させる新たな環境要因である可能性がある。

(3)今後の展望

本研究により AMF が二次元培養では検出できない腫瘍細胞のアメーバ様形態への転換にかかわることが示された。今後三次元培養における AMF の制御によりアメーバ様形態転換への抑制、それに続く転移・浸潤の制御へと発展させる研究が期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

柳川天志、齋藤健一、高岸憲二

Autocrine motility factor が三次元培養下の線維肉腫細胞の形態に与える影響

第 29 回 日本整形外科学会基礎学術集会

鹿児島市 2014 年 10 月 09 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柳川 天志 (YANAGAWA Takashi)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40400725

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

船坂 龍善 (FUNASAKA Tatsuyoshi)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構

Raz Avraham

Karmanos Cancer Institute, MI, USA