

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：84409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670661

研究課題名(和文) Circulating Tumor Cellsを標的とした新規抗転移治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the novel ant-metastatic therapy against circulating tumor cells

研究代表者

伊藤 和幸 (Kazuyuki, Itoh)

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)・その他部局等・その他

研究者番号：20301806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部腫瘍の転移は複雑な一連の過程を経て成立するが、腫瘍細胞は非常に早期から血中に CTCs (circulating tumor cells) として観察され、転移成立には転移先での腫瘍増殖が最も重要である。我々は研究室で樹立したマウス骨肉腫高肺転移株(LM8)を同種同所移植後、CTCsを生きたまままで培養することに世界で初めて成功、原発巣のLM8と比較しCTCsの方が高いanti-anoikis活性を有し、浮遊培養条件下でも増殖することを見いだした。さらに肺という原発巣と異なる環境下における腫瘍細胞の増殖に、stiffnessの異なる条件下の3次元増殖にVEGFが重要な役割をする事を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Circulation tumor cells (CTCs) appeared in the early phase of metastasis and the growth of metastasized cells in the target organs are critical during the multistep lung metastasis by musculo-skeletal malignant tumors. We established the method to purify the living CTCs from osteosarcoma (OS) bearing mouse using our previously reported highly metastatic OS cell line LM8. By comparison between CTCs from LM8 and primary tumor cells, we found the higher anti-anoikis activity of LM8-derived CTCs. We also found that vascular endothelial growth factor (VEGF) plays an important role of three dimensional growth of OS in soft-stiffness condition mimicking lung, compare to the hard stiffness primary sites. Using the small molecules targeted to the VEGF signal, we confirmed the effective inhibition of OS lung metastasis in vivo syngeneic mouse orthotopic experimental metastasis model.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：転移 循環腫瘍細胞 骨肉腫 血管内皮細胞増殖因子 組織の硬さ

1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍を含む悪性腫瘍の転移は複雑な一連の過程を経て成立するが、最近の臨床病理学的な解析により、腫瘍細胞は非常に早期から血中に CTC (circulating tumor cells) として観察されること、転移の成立には転移先の腫瘍の増殖が最も critical で、骨髄由来の種々の細胞 (macrophage, 血管前駆細胞等) が補助的な役割を演じていることなどが大きくクローズアップされてきている。しかしながら従来の CTC の研究は、血中の CTC を腫瘍細胞特異的なカラム等を用いて capture する方法で、定量的な解析が可能ということで臨床応用 (Cell Search Systems, Veridex 社) されているが、生きた細胞と死んだ細胞の分離が困難な点、又得られた CTC が 2-100 cells/ml と著しく少なく、生物学的な評価が非常に困難であるなどの欠点が多い。

2. 研究の目的

我々は、H23-24 年度の挑戦的萌芽研究 (課題番号 23659734) を行う過程で、我々の研究室で樹立したマウス骨肉腫高肺転移株 (LM8) を同種同所移植後、経時的に同一マウス尾静脈より採血 (40 μ l) を行い、CTC を生きたままで培養することに世界で初めて成功した。本研究の目的は、CTC の性質を分子生物学的な手法を用いてさらに明らかにし、CTC を標的とした新規抗転移治療の臨床応用への道筋を開くことである。

3. 研究の方法

既に生きた CTC を経時的に同じ担がんマウスより再現性良く得る実権系を確立している。LM8-CTC、LM8 原発巣、Dunn-CTC、Dunn 原発巣より得られた細胞間での発現遺伝子の差を解析し最終的に CTC を標的とした新規治療の開発をめざす。

4. 研究成果

肉眼的肺転移をまったく起こさない親株の Dunn OS に比べ、4 週後に全例肺転移を生じる LM8 では、CTC の出現が移植後早期 (2 週目) より認められ、出現頻度、血中の CTC 数も増加していく。さらに、LM8 より得られた CTC は anti-anoikis 活性が高く、浮遊条件下でも増殖能が高い。一方、Dunn から得られた CTC では原発巣と差を認めない。(国際学会発表) この CTC の浮遊条件下での増殖の差異が最終的に生じる肺転移の大きな原因となっていると考え、得られた CTC を原発巣の LM8 と比較することにより、anti-anoikis を制御する因子の同定を試みた。しかしながら、CTC を培養するとこの活性が減弱し原発巣と差がなくなる事より、CTC の anti-anoikis

活性を制御する因子の同定には、直接 CTC の遺伝子発現を増殖させずに解析する方法の開発が重要である事が判明したが、得られる CTC の数はごく僅かで困難であった。一方研究の過程で、LM8 は肺と原発巣という著しく stiffness の異なる環境下での 3 次元増殖には差が無いが、元の Dunn は肺の環境下では 3 次元増殖を殆どしない事が明らかとなった。さらに、腫瘍細胞と肺血管内皮細胞と共培養実験において腫瘍細胞が分泌する VEGF が肺血管内皮細胞の開裂や腫瘍細胞の内皮細胞への分化 (発表論文 3)、Notch signaling の制御を介して communicate している現象を見だし、TEM (Transendothelial migration) における役割を報告した。また、当センター病院の患者検体より樹立した骨軟部腫瘍細胞株を用いた in vitro, in vivo の解析により、骨軟部腫瘍の 3 次元増殖の制御には、複数の Driver 分子とシグナル伝達系が関与しており、腫瘍の種類により複数の分子標的治療の組み合わせが最も効果的な治療法に結びつく事を見だし、報告を行った。(発表論文 2, 4, 5)

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 5 件)

Nishimura, Y., Takiguchi, S., Ito, S., and Itoh, K.: EGF-stimulated AKT activation is mediated by EGFR recycling via an early endocytic pathway in a gefitinib-resistant human lung cancer cell line. International Journal of Oncology 査読有 46(4), 2015, 1721-1729 DOI: 10.3892/ijo.2015.2871

Imura, Y., Yasui, H., Outani, H., Wakamatsu, T., Hamada, K., Nakai, T., Yamada, S., Myoui, A., Araki, N., Ueda, T., Itoh, K., Yoshikawa, H., and Naka, N.: Combined targeting of mTOR and c-MET signaling pathways for effective management of epithelioid sarcoma. Molecular Cancer 査読有 13:185, 2014, 1-18 DOI:10.1186/1476-4598-13-185

Wakamatsu, T., Naka, N., Sasagawa, S., Tanaka, T., Takenaka, S., Araki, N., Ueda, T., Nishizawa, Y., Yoshikawa, H., and Itoh, K.: Deflection of vascular endothelial growth factor action by SS18-SSX and composite vascular endothelial growth factor- and chemokine (C-X-C motif) receptor 4-targeted therapy in synovial sarcoma. Cancer Science 査読有 105(9), 2014, 1124-1134 DOI:10.1111/cas.12469

Outani, H., Tanaka, T., Wakamatsu, T., Imura, Y., Hamada, K., Araki, N., Itoh, K., Yoshikawa, H., and 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 査読有 14:455, 2014, 1-12 DOI:10.1186/1471-2407-14-455

Yasui, H., Naka, N., Imura, Y., Outani, H., Kaneko, K., Hamada, KI., Sasagawa, S., Araki, N., Ueda, T., Itoh, K., Myoui, A., and Yoshikawa, H.: Tailored therapeutic strategies for synovial sarcoma: Receptor tyrosine kinase pathway analyses predict sensitivity to the mTOR inhibitor RAD001. Cancer Letters 査読有 347(1), 2014, 114-122 DOI: 10.1016/j.canlet.2014.01.027

〔学会発表〕(計 18 件)

伊村慶紀、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、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

西村行生、肺癌細胞内における EGF 刺激による AKT 活性化は EGFR 再循環により促進される、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

笹川覚、骨軟部肉腫の転移ドライバの同定と発現制御および分子標的としての可能性の検討、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

安井広彦、滑膜肉腫への mTOR 阻害剤の効果予測するバイオマーカーの提案、第 47 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2014 年 7 月 18 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

井村慶紀、類上皮肉腫に対する mTOR 阻害剤(RAD001)と MET 阻害剤(INC280)の併用による抗腫瘍効果、第 47 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2014 年 7 月 18 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

笹川覚、骨・軟部腫瘍の転移 Driver の同定と転移抑制のための分子標的探索、第 47 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、第 47 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2014 年 7 月 18 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

伊藤和幸、肉腫の転移と分子標的治療、第 47 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、骨・軟部腫瘍学術集会、2014 年 7 月 18 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

西村行生、肺癌細胞内における EGFR シグナル下流の AKT 活性化は EGFR 再循環により促進される、第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会、2014 年 7 月 10 日、金沢市文化ホール・金沢ニューグランドホテル (石川県金沢市)

伊藤和幸、骨転移の病態と最新治療、第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会、2014 年 7 月 10 日、金沢市文化ホール・金沢ニューグランドホテル (石川県金沢市)

Tanaka Takaaki, Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma, 15th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, 2014/6/29, Heidelberg (Germany)

Nakagawa Hideki, Sodium butyrate induced cellular senescence, inhibited invasion and modulated sellular metabolism in glioblastoma cells, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014, 2014/4/8, San Diego (CA, USA)

Sasagawa Satoru, Investigating the functional role and expression control of twist1 in sarcoma, The Connective Tissue Oncology Society 18th Annual Meeting, 2013/10/30-11/2, New York (NY, USA)

Wakamatsu Toru, VEGF signal axis is a potential therapeutic molecular target for synovial sarcoma, The Connective Tissue Oncology Society 18th Annual Meeting, 2013/11/1, New York (NY, USA)

若松透、滑膜肉腫の 3 次元増殖における VEGF、CXCR4 シグナルの重要性および分子標的としての可能性、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

笹川覚、Sarcoma の転移における Twist1 の発現制御と機能的役割の解析、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

若松透、滑膜肉腫における CXCL12/CXCR4 分子標的治療、第 46 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2013 年 7 月 11 日、東京ドームホテル (東京都)

笹川覚、骨軟部腫瘍における Twist1 の発現と機能解析、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、2013 年 7 月 11 日、ホテルブエナビスタ (長野県松本市)

伊藤和幸、転移の病態とがんの不均一性、
第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、
2013 年 7 月 11 日、ホテルブエナビスタ（長
野県松本市）

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔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/laboratory/department/seibutsu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 和幸 (Itou 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）・
研究所・部門長
研究者番号：20301806

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

吉川 英樹 (Yoshikawa Hideki)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60191558