

令和 2 年 8 月 31 日現在

機関番号：14401  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2016～2018  
課題番号：16K20050  
研究課題名(和文)肉腫肺転移を増大させる宿主因子の同定

研究課題名(英文)tumor microenvironment in lung metastasis of sarcoma

研究代表者  
竹中 聡 (Takenaka, Satoshi)  
大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00588379  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨肉腫高肺転移株LM8の肺転移巣では皮下腫瘍やIn vitroとは異なりAXLの強い酸化がみられ、肺転移巣では原発巣と異なる腫瘍宿主相互作用が肺転移増大に寄与している可能性が示唆された。また、転移性骨肉腫に対し臨床応用が期待されているTAS115はLM8肺転移巣のAXLシグナルを抑制し、肺転移の増大を抑制した。また、その他の多くの骨肉腫細胞株の増殖抑制効果も有することが分かった。これまでに骨肉腫の増大に促進的に作用すると報告のあるOsteoblastやFibroblast、MSCなどは、LM8との共培養の系で腫瘍増殖促進効果は確認できなかった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、転移性骨肉腫に対して複数のMultiple tyrosine kinase inhibitorの臨床試験が進行中であり、本邦ではTAS115のPhase1試験が行われている。本研究ではマウス骨肉腫高肺転移株LM8やその他の骨肉腫細胞株を用いて、TAS115の有効性を示し、肺転移の増大抑制効果も示した。また、肺転移巣増大を抑制する新たな治療標的分子としてAXLを見出したが、今後のさらなる検討が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：AXL signaling was more activated in the lung metastasis than in primary tumor of LM8, mouse osteosarcoma cell line. TAS115, a multiple tyrosine kinase inhibitor, inhibited the proliferation in vitro, the growth of tumor implanted under the skin, and lung metastasis of the LM8, highly lung metastasis cell line of mouse osteosarcoma, by inhibition of phosphorylation of PDGFR, AXL, and Flt3. TAS115 also inhibited the proliferation of some other human osteosarcoma cell lines. We found that GAS6, a ligand of AXL, promoted the proliferation of LM8, but co-culture of LM8 with osteoblast, fibroblast, or MSC did not show proliferative effect of LM8 or secretagogue response of GAS6.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 肺転移 チロシンキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫の治療は化学療法の導入や MRI などの画像検査の発達により、大きく改善し、5 年生存率は初診時に転移のない症例では 75% 程度となった。しかし、肺転移をきたした症例では、5 年生存率は約 30% と未だに低く、新規治療薬の開発が望まれている。近年、がんの進展増大や転移において、がん細胞周囲のがん微小環境が重要な役割を果たすという報告が多くなされており、血管誘導因子の阻害剤 (Avastin) や免疫チェックポイント阻害剤、破骨細胞分化の阻害剤 (ランマーク) などが臨床応用されている。これらの宿主が作り出すがん微小環境の評価に関しては、In vitro の研究では難しく、正常免疫能をもつ Syngeneic 同系マウスでの Vivo での検討が望ましい。これまでにわれわれの研究室では、C3H マウスに自然発生した骨肉腫細胞株を尾静注し高頻度に肺に転移を生じる高肺転移骨肉腫細胞株 LM8 を樹立しており、今回この LM8 を用いて、腫瘍宿主相互作用の検討を行うこととした。また、近年、TAS115 などの Multiple tyrosine kinase 阻害剤の転移性骨肉腫に対する臨床試験が開始されているが、骨肉腫に対する Multiple tyrosine kinase 阻害剤の基礎データがないため、この LM8 を用いて骨肉腫に対する Multiple tyrosine kinase 阻害剤 (TAS115) の抗腫瘍効果を検討し、特に宿主因子との相互作用について検討をすることとした。

### 2. 研究の目的

転移性骨肉腫の予後改善のため、臨床応用に向けて開発が進んでいる Multiple tyrosine kinase 阻害剤である TAS115 の骨肉腫に対する抗腫瘍効果を検討するとともに、肺転移巣の腫瘍微小環境において、肺転移増大に関与する宿主因子とシグナルを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) In vitro、皮下腫瘍、肺転移巣の活性化シグナルの違い

マウス骨肉腫高肺転移株である LM8 を C3H マウスに皮下接種すると約 3 週で高率に肺転移を生じる。この細胞をもちいて、腫瘍微小環境による活性化シグナルの違いを Mouse-Phospho-RTK Array によって検討を行った。Mouse-Phospho-RTK Array は 39 種類のマウスレセプターチロシンキナーゼに対する抗体をメンブレンにスポットされており、各レセプターチロシンキナーゼのリン酸化レベルを同時に検出できるもので、LM8 の In vitro 培養、皮下腫瘍、肺転移巣の Lysate を用いて、各レセプターチロシンキナーゼのリン酸化を検討した。リン酸化がみられたものについてウエスタンブロットで確認を行った。

#### (2) Multiple tyrosine kinase inhibitor による抗腫瘍効果と腫瘍微小環境の変化

マウス骨肉腫高肺転移株である LM8 に対する Multiple tyrosine kinase inhibitor である TAS-115 の抗腫瘍効果を In vitro および In vivo で検討した。また、Mouse-Phospho-RTK Array を用いて、TAS 投与後の活性化シグナルの変化を検討し、腫瘍微小環境に与える影響について検討した。また、TAS115 は LM8 以外の骨肉腫細胞株でも増殖抑制効果があるかを検討した。

#### (3) これまでの報告にある宿主因子についての検討

これまで、骨肉腫の原発巣増大に関与する宿主因子として MSC や Osteoblast、Fibroblast などが報告されている。これらの細胞と LM8 との共培養を行うことにより増殖促進効果がみられるかを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) In vitro、皮下腫瘍、肺転移巣の活性化シグナルの違い

マウス骨肉腫高肺転移株である LM8 の In vitro 培養、皮下腫瘍組織、肺転移巣組織から Lysate をとり、Mouse-Phospho-RTK Array を用いてそれぞれの環境下での活性化シグナルを検討したところ、In vitro 培養下および皮下腫瘍では PDGFR のリン酸化が最も強くみられたが、肺転移巣で最も強くリン酸化していたのは AXL であった (図 1)。ウエスタンブロットでも、肺転移巣において In vitro 培養下や皮下腫瘍と比較し、AXL のリン酸化が強い一方で、PDGFR

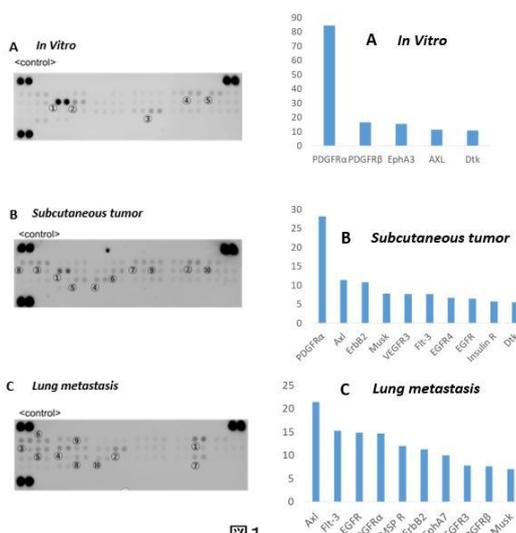


図1

のリン酸化は In vitro 培養下や皮下腫瘍と比較し弱いことを確認した。これらのことから原発巣と肺転移巣では腫瘍と宿主相互作用によって活性化しているシグナルが異なることが示唆され、肺転移を有する骨肉腫患者の治療に際しては、原発巣だけでなく肺転移巣で活性化しているシグナルも抑制する治療が必要となることが示唆された。

( 2 ) Multiple tyrosine kinase inhibitor による抗腫瘍効果と腫瘍微小環境の変化

In vitro 培養下に TAS115 は複数の骨肉腫細胞株に対し濃度依存的に増殖抑制効果を示した ( 図 2 )。またマウス骨肉腫高肺転移株 LM8 を皮下接種し、1 週間後より TAS115 を投与すると、LM8 皮下腫瘍増大および肺転移が抑制された ( 図 3 )。また、LM8 を尾静注し肺に生着させた後、1 週間後より TAS115 を投与しても抑制効果は見られたことから、TAS115 は一旦生着した肺転移の増大も抑制することが分かった。TAS 投与後 In vitro、皮下腫瘍、肺転移巣の組織を採取し、活性化シグナルを見たところ、PDGFR、AXL とモリン酸化は著明に低下していた ( 図 4 )。これらの結果から多数の tyrosine kinase を阻害する TAS115 は肺転移を有する骨肉腫に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

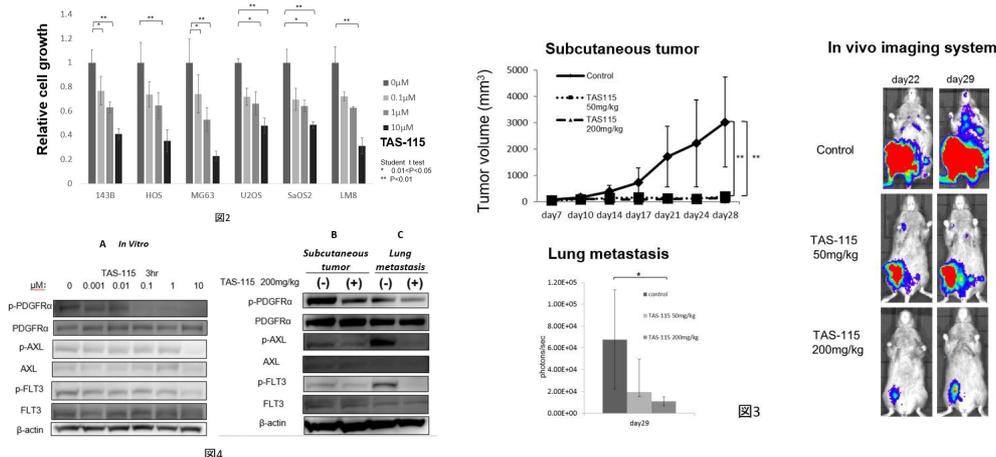


図 4

( 3 ) これまでの報告にある宿主因子についての検討

これまでに、骨肉腫の増大に対し、促進的に作用すると報告がある MSC や Osteoblast、Fibroblast と LM8 を共培養したが、いずれも増殖を促進する結果は得られなかった。一方で AXL のリガンドである GAS6 を添加すると LM8 の増殖促進を認めた ( 図 5 )。このことから、GAS6/AXL のシグナルは腫瘍増殖に促進的に働いていることが確かめられた。2018 年 Cancer Res に M2 マクロファージのマーカーである CD163 を KO したマウスでは骨肉腫の転移が抑制されるという報告があった。マクロファージが GAS6 を分泌するという報告はこれまで数多く報告されているため、われわれは LM8 肺転移巣においてマクロファージが GAS6 を分泌し、肺転移増大に寄与しているという仮説の下、今後、マクロファージとの共培養で LM8 増殖促進効果や GAS6 の分泌促進が得られるかなどを検討する予定である。

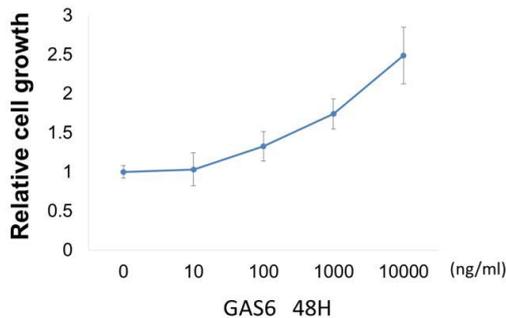


図 5

5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 11 件 )

Yamamoto Y, Kanzaki R, Kanou T, Ose N, Funaki S, Shintani Y, Minami M, Outani H, **Takenaka S**, et al. Long-term outcomes and prognostic factors of pulmonary metastasectomy for osteosarcoma and soft tissue sarcoma. Int J Clin Oncol. ( 査読あり ) 2019 Epub ahead of print 10.1007/s10147-019-01422-0

Miyama A, Kuratsu S, **Takenaka S**, Yoshimura M, Yoneda G, Yamada Y, et al. Two case reports of intra-articular nodular fasciitis of the knee confirmed by MYH9-USP6 gene fusion expression. J Orthop Sci. ( 査読あり ) 2019. Epub ahead of print 10.1016/j.jos.2018.12.008

Imura Y, **Takenaka S**, Kakunaga S, Nakai T, Wakamatsu T, Outani H, et al. Survival analysis of elderly patients with osteosarcoma. Int Orthop. ( 査読あり ) 2019. Epub ahead of print 10.1007/s00264-019-04332-y

Yasuda N, Nakai S, Nakai T, Outani H, **Takenaka S**, Hamada KI, et al. A pseudoaneurysm of the popliteal artery probably pierced by a bone spike arising in the spontaneously regressed osteochondroma: A case report. J Orthop Sci. ( 査読あり ) 2018 Epub ahead of print 10.1016/j.jos.2018.09.006

Outani H, Imura Y, Tanaka T, **Takenaka S**, Oshima K, Hamada K, et al. Clinical outcomes of patients with epithelioid sarcomas: impact and management of nodal metastasis. Int J Clin Oncol. ( 査読あり ) 2018;23(1):181-8. 10.1007/s10147-017-1179-x

Yamada S, Imura Y, Nakai T, Nakai S, Yasuda N, Kaneko K, **Takenaka S** et al. Therapeutic potential of TAS-115 via c-MET and PDGFRalpha signal inhibition for synovial sarcoma. BMC Cancer. ( 査読あり ) 2017;17(1):334. 10.1186/s12885-017-3324-3

Nakai T, Imura Y, Tamiya H, Yamada S, Nakai S, Yasuda N, **Takenaka S** et al. Trabectedin is a promising

antitumor agent potentially inducing melanocytic differentiation for clear cell sarcoma. Cancer Med. (査読あり) 2017;6(9):2121-30. 10.1002/cam4.1130

Yasui H, Imura Y, Outani H, Hamada K, Nakai T, Yamada S, **Takenaka S** et al. Trabectedin is a promising antitumour agent for synovial sarcoma. J Chemother. (査読あり) 2016;28(5):417-24. 10.1080/1120009X.2015.1133013

**Takenaka S**, Naka N, Obata H, Joyama S, Hamada K, Imura Y, et al. Treatment outcomes of Japanese patients with Ewing sarcoma: differences between skeletal and extraskeletal Ewing sarcoma. Jpn J Clin Oncol. (査読あり) 2016;46(6):522-8. 10.1093/jjco/hyw032

Outani H, Hamada K, **Takenaka S**, Imura Y, Oshima K, Sotobori T, et al. Radiofrequency ablation of osteoid osteoma using a three-dimensional navigation system. J Orthop Sci. (査読あり) 2016;21(5):678-82. 10.1016/j.jos.2016.05.005

Imura Y, Nakai T, Yamada S, Outani H, **Takenaka S**, Hamada K, et al. Functional and therapeutic relevance of hepatocyte growth factor/c-MET signaling in synovial sarcoma. Cancer Sci. (査読あり) 2016;107(12):1867-76. 10.1111/cas.13092

〔学会発表〕(計7件)

**Takenaka S**, et al. THE CLINICAL OUTCOME OF THE OSTEOARTICULAR EXTRACORPOREAL IRRADIATED AUTOGRAFT FOR BONE SARCOMA, Connective Tissue Oncology Society annual meeting, 2018, Rome

**竹中聡** 他、脛骨近位骨肉腫の術後機能 QOL 評価、第 51 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2018、静岡

**竹中聡** 他、転移性ユーイング肉腫ファミリー腫瘍の治療経験、第 51 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2018、静岡

**竹中聡** 他、骨盤悪性骨腫瘍に対する腸管遮蔽スペース併用術前放射線照射の治療経験、第 51 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2018、静岡

中井翔、**竹中聡** 他、Anti tumora effect of Eribulin mesilate on clear cell sarcoma cell lines、第 77 回日本癌学会、2018、大阪

安田直弘、**竹中聡** 他、LM8(マウス骨肉腫高肺転移株)に対する TAS-115 の抗腫瘍効果、第 91 回日本整形外科学会学術集会、2018、神戸

**Takenaka S**, et al. The reasons of poor prognosis in patients with pelvic osteosarcoma, Connective Tissue Oncology Society annual meeting, 2017, Maui

〔図書〕(計0件)

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 安田 直弘、中井 翔、前 裕和、王谷 英達、濱田 健一郎、中井 隆彰、山田 修太郎、伊村 慶紀、中 紀文、吉川 秀樹

ローマ字氏名: Yasuda Naohiro, Nakai Sho, Mae Hirokazu, Outani Hidetatsu, Hamada Kenichiro, Nakai Takaaki, Yamada shutaro, Imura Yoshinori, Naka Norifumi, Yoshikawa Hideki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。