

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16681

研究課題名(和文) Dormancy調節により骨軟部肉腫の増殖および転移を抑制する

研究課題名(英文) Inhibition of proliferation and metastasis of bone soft tissue sarcoma by control of dormancy

研究代表者

鈴木 賀代 (Suzuki, Kayo)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：20456388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HM-RCTを筋肉内移植後、経時的に原発巣と肺転移巣で、dormancyの状態をKi-67およびE2F4の発現で検討した。原発巣では、腫瘍形成初期でKi-67の発現が観察され、肺転移が増加する5-6週までにピークとなった。肺転移巣では、肺転移形成初期である3週では、Ki-67の発現はほとんど見られず、E2F4の発現が少数の細胞で認め、肺転移が増加・増大した6週では、Ki-67の発現が増加していた。以上の結果、原発巣では腫瘍形成初期から、Ki-67陽性細胞が出現し、腫瘍の増大傾向が止まるとE2F4の発現細胞が出現し、腫瘍組織の一部に、dormancyが生じる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟部肉腫の原発巣および転移巣形成過程における、dormancy存在の可能性を示した。

Dormancy 制御により、肉腫治療の新たな治療戦略の礎になり得る。

研究成果の概要(英文)：After intramuscular transplantation of HM-RCT, the mice were sacrificed, and the dormancy status was examined by Ki-67 and E2F4 expression in primary and lung metastases. As a result, in the primary lesion, Ki-67 expression was observed at the early stage of tumor formation, peaked by 5-6 weeks when lung metastasis increased. On the other hand, in lung metastases, almost no Ki-67 expression was observed up to 3 weeks, which is the early stage of lung metastasis formation, and E2F4 expression was observed only in a small number of cells, and at 6 weeks when lung metastasis increased, Ki-67 expression was increased. As a result, Ki-67 positive cells appeared and increased in the primary tumors from the early stage of tumor formation, and the period when tumor growth was high in tumor tissues was maintained as the tumor increased, but when the tumor growth trend stopped, E2F4 The expression cells appeared, and it was suggested that dormancy might occur in a part of the tumor tissue

研究分野：整形外科学

キーワード：骨軟部腫瘍 肉腫 転移 マウス未分化多形肉腫細胞株 高肺転移株 低肺転移株 dormancy

1. 研究開始当初の背景

肉腫は自律性増殖という局所的問題に加え、転移という全身的問題が未だ解決されていない。Dormancy は、ガンの増殖過程において、腫瘍細胞が増殖後、ある期間に増殖が停止する状態とされ、腫瘍細胞が再増殖を開始するまでのガンの進行準備段階と考えられており、乳癌の骨転移でその機構が注目されている。Dormancy には、3 つのカテゴリーがあり、腫瘍細胞の cell cycle が休止する cellular dormancy、腫瘍組織への血管新生が休止する angiogenic dormancy、および腫瘍細胞への免疫機構が休止する immunologic dormancy が報告されている。Dormancy の臨床的意義は、ガンをある一定期間の治療後、また再発や転移巣への術後にガンが急激に出現・増悪することや、再発性ガンに対する化学療法などの補助療法が初回時に比較し効果が乏しいことである。初発時にすでに播種したガン細胞が dormant の状態で、体のどこかに潜伏し何らかのきっかけで再度増殖し始めると仮定されている。このように腫瘍細胞の増殖・転移・再発に dormancy が大きく関与していることは、dormancy の病態生理を把握し調節することによって、実現可能かつ根治的なガンの治療標的となりうることを示唆している。しかし、潜伏中の播種性 dormant tumor cell の研究は乳癌などの一部の癌腫においてわずかに報告されているのみである。dormancy の調節に関しては、いくつかのサイトカイン (TGF, INF, TNF など)、タンパク (COCO, DLL4, BMP7 など) および周辺環境細胞 (血管内皮細胞、線維芽細胞など) が報告されているが、恒久的に確立されたものはない。また、癌腫に関する報告であり、発生源が異なる肉腫に関する報告はない。肉腫細胞がどのようにして dormant な状態になり、再び目覚めて再発・転移・増殖するのかが未だに明らかになっていない。国内外の報告と我々の肉腫の肺転移における分子機序の研究成果より、肉腫の増殖・転移・再発形成に対して dormancy が重要な役割を演じていると考える。

2. 研究の目的

本研究では、骨軟部肉腫の領域ではまだ解明されていない肉腫細胞の増殖および転移形成における dormancy の状態を把握し、dormancy の制御に関わる遺伝子を同定する。その遺伝子の発現調節により、dormancy 制御下で腫瘍細胞の増殖、転移、浸潤に与える影響を確認する。さらに、in vivo において、原発巣、血液循環細胞、転移巣での dormancy 細胞の把握により dormancy に至る時期、dormancy の導入促進による効果を証明する。

3. 研究の方法

(1) [高肺転移肉腫細胞株では dormant tumor cell が存在することを把握する (in vitro)]

我々が樹立した、マウス未分化肉腫細胞 (RCT) の転移能が異なる細胞株 (高肺転移株; HM-RCT, 低肺転移株; LM-RCT) を用いて、研究を行う。細胞増殖能を CCK-8 assay で検討する。また、細胞周期 G0/G1 期を flow cytometry で把握する。浸潤能を Matrigel invasion assay で比較する。さらに各細胞株で dormancy 関連タンパクである p130, p107, E2F4, Ki67 の発現を免疫細胞化学染色や western blot で確認する。

(2) [肉腫細胞での dormant tumor cell の形態の特徴を把握する (in vitro)]

dormant tumor cell の特徴を把握するため、dormancy 関連タンパク (E2F4) を発現する細胞 (dormant tumor cell) と Ki67 を発現する細胞 (non-dormant tumor cell) の形態を位相差顕微鏡で比較する。

(3) [dormancy の制御による抗腫瘍効果の検討 (in vitro)]

HM-RCT をマウスの肺血管内皮細胞 (MLE) と共培養し、dormant tumor cell が減少することを確認する。さらに、HM-RCT と MLE 共培養下で、VEGF 阻害剤を加え、dormancy に及ぼす影響を確認する。

(4) [生体内での肉腫細胞での dormancy の病態把握 (in vivo)]

RCT は自然発生モデルであるため免疫機能不全のない 6 週齢の C3H/He マウスを使用する。HM-RCT と LM-RCT をそれぞれマウスの下腿筋肉内に移植する。移植後、原発巣組織、転移巣組織を採取し、dormancy に至った細胞を E2F4, Ki67 免疫組織染色で同定する。

4. 研究成果

(1) 高肺転移株 (HM-RCT) と低肺転移株 (LM-RCT) では、増殖能や G0/G1 期の細胞数に差はないが、Matrigel invasion assay で比較した浸潤能は、高肺転移株で高い浸潤能を認めた。dormancy 関連タンパクの発現については、LM-RCT で Ki67 が亢進している細胞が多く、HM-RCT では、G0 期で E2F4 の発現が亢進している細胞が多かった。すなわち、高肺転移株では、dormant tumor cell が混在していた。

(2) Dormant tumor cell では細胞から伸長する突起が短く、non-dormant tumor cell では細胞突起が長く、細胞形態的に違いを認めた。

(3) HM-RCT をマウスの肺血管内皮細胞 (MLE) と共培養すると、Ki-67 陽性細胞が増加し、

dormant tumor cell が減少した。一方、HM-RCT と MLE 共培養後に VEGF 阻害剤を加えると、Ki-67 陽性細胞が減少し、dormancy が誘導された可能性があった。

(4) HM-RCT と LM-RCT をそれぞれマウスに筋肉内移植後 5 週で形成された、原発巣と肺転移の HE 染色標本を作製した。高肺転移株の原発巣と肺転移巣に形態学的変化はなく、また低肺転移株の原発巣と肺転移巣と比較しても形態学的変化は見られなかった。HE 染色標本による組織学的評価では、高肺転移株の肺転移巣は、低肺転移株の肺転移巣より、大きな結節を形成していた。HM-RCT と LM-RCT の細胞増殖能を CCK-8 assay で検討した。培養開始後、24 時間、48 時間、72 時間後の増殖能は、2 種類の細胞株で有意差はなかった。また浸潤能を Matrigel invasion assay で比較し、高肺転移株で高い浸潤能を認めた。RCT 高肺転移株と低肺転移株を皮下移植後 5 週で形成された、原発巣と肺転移巣に対する non-dormancy のマーカーである Ki-67 による免疫組織化学染色の結果、原発巣では、高肺転移株および低肺転移株はともに Ki-67 染色陽性の細胞を認めたが、肺転移巣では、2つの細胞株ともに Ki-67 陽性細胞は認めなかった。したがって、原発巣では増殖能を認める腫瘍組織ではあるが、肺で形成された転移巣では、dormancy が生じている可能性が示唆され、肺転移形成初期における dormancy の存在を確認した。

HM-RCT を皮下移植後 2, 3, 4, 5, 6 週で剖検し、原発巣と肺転移巣で、dormancy の状態を Ki-67 および E2F4 の発現で経時的に検討した。その結果、原発巣では、腫瘍形成初期で Ki-67 の発現が観察され、肺転移が増加する 5-6 週までにピークとなり、その後、Ki-67 の発現の増加は認めなかった。一方で、肺転移巣では、肺転移形成初期である 3 週までは、Ki-67 の発現はほとんど見られず、E2F4 の発現が少数の細胞でのみ観察され、肺転移が増加・増大した 6 週では、Ki-67 の発現が増加していた。以上の結果、原発巣では腫瘍形成初期から、Ki-67 陽性細胞が出現、増加し、腫瘍の増大とともに腫瘍組織で増殖能が高い時期が維持されるが、腫瘍の増大傾向が止まると E2F4 の発現細胞が出現し、腫瘍組織の一部であるが、dormancy が生じている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki K, Yasuda T, Hiraiwa T, Kanamori M, Kimura T, Kawaguchi Y	4. 巻 16
2. 論文標題 Primary cauda equina lymphoma diagnosed by nerve biopsy: A case report and literature review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 623 ~ 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tamura T, Suzuki K, Yasuda T, Nogami S, Watanabe K, Kanamori M, Kimura T	4. 巻 9
2. 論文標題 Extraskeletal osteosarcoma arising in the subcutaneous tissue of the lower leg: A case report and literature review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 287 ~ 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2018.1662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 木村友厚	4. 巻 69
2. 論文標題 進行性軟部肉腫に対する二次化学療法の有効性と安全性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 整形外科	6. 最初と最後の頁 321 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15106/j_seikei69_321	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Kayo, Yasuda Taketoshi, Suzawa Shun, Watanabe Kenta, Kanamori Masahiko, Kimura Tomoatsu	4. 巻 18
2. 論文標題 Fibroma of tendon sheath around large joints: clinical characteristics and literature review	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-017-1736-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki K, Yasuda T, Hiraiwa T, Kanamori M, Kimura T, Kawaguchi Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Primary cauda equina lymphoma diagnoses by nerve biopsy: A case report and literature review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Suzuki K, Yasuda T, Watanabe K, Kanamori M, Kimura T
2. 発表標題 Clinical results of limb-salvage surgery with pasteurized bone graft for malignant bone tumors
3. 学会等名 31th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 今井達朗, 金森昌彦, 木村友厚
2. 発表標題 進行性軟部肉腫に対する抗腫瘍薬の違いによる健康関連QOLの評価
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 木村友厚
2. 発表標題 骨原発悪性リンパ腫の臨床的特徴と画像所見
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 木村友厚
2. 発表標題 二次化学療法を受けた進行性軟部肉腫患者の健康関連QOLの評価
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会 - 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 木村友厚
2. 発表標題 パストール処理骨を用いた患肢温存手術の有用性と課題
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会 - 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki K, Yasuda T, Watanabe K, Kanamori M, and Kimura T.
2. 発表標題 Relationship between the development of distant metastasis after surgical treatment and the prognosis in patients with soft tissue sarcomas.
3. 学会等名 30th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suzuki K, Yasuda T, Watanabe K, Kanamori M, Kimura T.
2. 発表標題 Results of surgical treatment for humeral metastasis according to metastatic sites in the humerus.
3. 学会等名 The 19th International Society of Limb Salvage General Meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 木村友厚.
2. 発表標題 転移部位別にみた上腕骨転移性骨腫瘍に対する手術療法の成績
3. 学会等名 第128回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 木村友厚.
2. 発表標題 進行性軟部腫瘍に対する二次化学療法の有用性と安全性.
3. 学会等名 第90回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 木村友厚.
2. 発表標題 遠隔転移を有する軟部肉腫の予後に影響を及ぼす因子.
3. 学会等名 第50回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 木村友厚.
2. 発表標題 進行性軟部肉腫に対する新規抗がん剤の有用性と安全性.
3. 学会等名 第50回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----