

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：94416

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16641

研究課題名（和文）肺線維化の抑制で骨肉腫の肺転移を制御できるか

研究課題名（英文）Lung fibrosis is a novel therapeutic target to suppress lung metastasis of osteosarcoma

研究代表者

由井 理洋 (Yui, Yoshihiro)

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院（附属研究所）・研究所・主任研究員

研究者番号：20547757

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）：骨肉腫は若年層で最多の骨腫瘍である。本研究では、有効な治療法のない骨肉腫肺転移に対して肺線維化抑制が有用かを検証した。臨床サンプルとマウス骨肉腫肺転移モデルで、骨肉腫の肺転移に伴い肺線維芽細胞が活性化し、肺線維化が進行することを確認した。軟らかい環境で骨肉腫細胞の増殖は線維量に依存した。線維化抑制剤であるビルフェニドン、ニンテタニブいずれも、マウス骨肉腫肺転移モデルにおいて有意に肺転移を抑制した。乳がんなどで線維化抑制剤は転移抑制効果が否定されているが、軟らかい環境への適応性が異なる骨肉腫のような腫瘍では線維化抑制剤が肺転移抑制に有用である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫の予後は、肺転移に対して有効な治療法が開発されずに30年間大きな改善がない。様々な分子標的薬が試みられてきたが、肺転移抑制に有用性を示すものは見つかっていない。本研究は、腫瘍外環境の一要因である腫瘍周囲の線維化を治療標的とすることで、骨肉腫の肺転移を抑制できる可能性を示したものである。肺線維化抑制は、骨肉腫の新規治療戦略として今後臨床応用につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The prognosis of patients with osteosarcoma has not improved over the last 30 years. In this study, we examined the metastasis-promoting effect of lung fibrosis in metastatic lesions and its potential as a therapeutic target in lung metastasis of osteosarcoma. We confirmed that lung fibrosis with activated fibroblasts progressed with the lung metastasis of osteosarcoma and that lung fibrosis in a bleomycin model promoted lung metastasis of osteosarcoma. The proliferation of osteosarcoma cells was dependent on the amount of collagen fiber on soft polyacrylamide gels. Anti-fibrotic agents significantly suppressed lung metastasis in a mouse model of osteosarcoma lung metastasis. Anti-fibrotic agents may effectively suppress lung metastasis of osteosarcoma, which has low adaptability to soft environments.

研究分野：がん転移

キーワード：骨肉腫 転移 線維化抑制剤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1970年代に化学療法が標準治療として導入され、悪性骨軟部腫瘍患者の5年生存率は60-70%まで改善した。しかし転移に対する有効な治療法が確立されていないため、この30年間に大きな改善が見られず、初診時に転移が認められた場合の5年生存率は骨軟部腫瘍全体で15-30%である。乳がん、肺がんでは分子標的薬が標準治療として組み込まれるようになったが、骨軟部腫瘍では、腫瘍特異的な分子マーカーがほとんど見つからず分子標的薬が標準治療として用いられるに至っていない。一方で、血管新生阻害薬など細胞周囲環境因子を標的として癌細胞を制御する戦略が一定の成果を挙げつつあり、注目が集まっている。腫瘍組織を取り巻く微小環境は、サイトカインや成長因子などの液性因子やコラーゲン線維などの細胞外基質、がん関連線維芽細胞や免疫細胞などの細胞応答等、複雑な要素で構成されている。これらは癌細胞の多様性を引き起こし、薬剤耐性など治療にも大きな影響をもたらす。さらに近年では、工学的アプローチの医学応用が進み、細胞周囲の硬度などの物性、すなわち物理的環境条件が腫瘍細胞に与える影響についての研究が飛躍的に進んでいる。その過程で、腫瘍細胞を取り巻く周囲組織の硬化が腫瘍の悪性化を促進することが報告されている。生体内における細胞周囲の硬度は、主にコラーゲンを中心とする線維の密度と配列の方向性で決定されるが、腫瘍それぞれで悪性化をきたす硬度や線維化すなわち硬化をもたらす因子など、研究で明らかにしなければならない項目は多い。その一方で、細胞周囲の硬度をコントロールすることで腫瘍悪性化を抑制する方法についてはほとんど報告がなく、検討の余地が十分にあると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨肉腫細胞をモデルケースとして、1) *in vitro*で硬度可変型2次元、3次元培養系を用いて細胞周囲環境の硬化が腫瘍悪性化に関与するメカニズムを明らかにし、2) 動物実験で骨肉腫肺転移モデルとブレオマイシン肺線維化誘導モデルを組み合わせ、肺線維化による肺転移促進メカニズムを明らかにする。さらに3) 動物実験で肺線維化抑制薬による骨肉腫肺転移抑制を実証し、臨床応用に繋がるエビデンスを整えることを目的とする。

### 3. 研究の方法

臨床サンプル、マウスモデルを用いた肺線維化評価：臨床サンプルとマウス骨肉腫肺転移モデルの原発巣と肺転移巣の線維化をPicro-sirius Red(PSR)染色で評価した。PSR染色は偏光顕微鏡で観察するとコラーゲン線維の太さに応じて、色調が赤→橙→黄→緑と変化する。画像解析ソフト(ImageJ)で各色調が全体に占める割合を定量した。

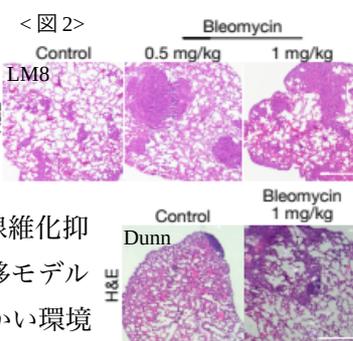
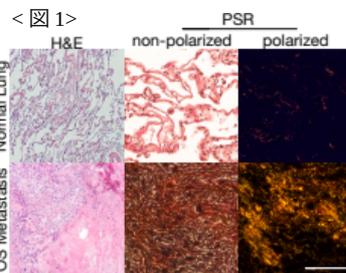
ポリアクリルアミド(PA)ゲル硬度可変2次元培養系：肺組織のような軟らかい環境での、骨肉腫細胞の増殖メカニズムをPAゲル培養系を用いて検証した。従来のPAゲル培養系は細胞接着のためECMタンパク質をsulfo-SANPAHなどの架橋剤を用いてゲルに付着させていた。しかし、sulfo-SANPAH自体のPAへの接着が安定しないことが問題であった。そこで、我々はタンパク架橋剤であるN-Hydroxysuccinimide(NHS)をPAに直接共有結合させる新たなPAゲル作製法を開発し、報告した(Kumai et al. *Frontiers in Materials*. 2021)。本研究では、このPAゲルを用いて生物学的、分子生物学的実験を行った。

ブレオマイシン肺線維症モデルと骨肉腫肺転移モデルのコンビネーション実験：マウス骨肉腫肺転移モデル(LM8-Dunnモデル)ではC3Hマウスを使用する。本研究ではC3Hマウスにブレオマイシンを気管内投与し、2週間後に骨肉腫細胞を尾静注し、肺線維化による転移促進効果を検証した。

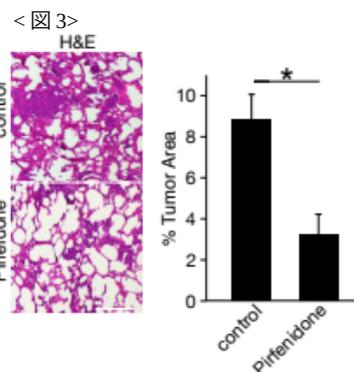
線維化抑制薬による肺転移抑制：線維化抑制剤としてピルフェニドンとニンテダニブを使用した。骨肉腫細胞を皮下移植し、2週間後から連日、経口投与した。ピルフェニドンは100mg/kgを1日2回、ニンテダニブは100mg/kgを1日1回投与した。

#### 4. 研究成果

臨床サンプルとマウス骨肉腫肺転移モデルで、骨肉腫の肺転移に伴い肺線維芽細胞が活性化し、肺線維化が進行することを確認した(図1)。転移巣が増大するよりも早く線維芽細胞の活性化が起きていることも確認された。また骨肉腫細胞は自らの分泌因子によって、肺線維芽細胞を活性化し、コラーゲンなどECM産生を促進することが分かった。ブレオマイシン肺線維化モデルとマウス骨肉腫肺転移モデルを組み合わせた実験では、肺線維化によって骨肉腫の転移性に関わらず、肺転移が促進することが確認された(図2)。低転移細胞と高転移細胞では高転移細胞の方が、転移促進効果が大きかった。肺組織の柔らかさを模したPAゲル培養系を用いて、柔らかい環境で骨肉腫細胞の増殖が線維量に依存することを確認した。この線維量依存性は高転移細胞に特有で、また硬い環境では失われた。骨肉腫細胞は、柔らかい環境で線維量の増加に従い平坦から球状へと形態を変化させ、いずれの形態においてもIntegrin  $\beta$ 1機能阻害抗体で増殖の一部は阻害された。線維化抑制剤であるピルフェニドン(図3)、ニンテダニブいずれも、マウス骨肉腫肺転移モデルにおいて有意に肺転移を抑制した。骨肉腫細胞は、乳がんでは認められる柔らかい環境への適応現象を認めなかった。



<考察>乳がんなどで線維化抑制剤は転移抑制効果が否定されているが、柔らかい環境への適応性が異なる骨肉腫のような腫瘍では線維化抑制剤が肺転移抑制に有用である可能性がある。今後、柔らかい環境で線維が少ない状態=肺転移の極初期段階で、骨肉腫細胞が増殖するメカニズムを解明することで、肺転移抑制療法の新たな治療戦略が明らかになるはずである。



本研究成果は、2019, 2021年度の日本がん転移学会、日本癌学会で発表した。現在、論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe K, Yui Y, Sasagawa S, Suzuki K, Kanamori M, Yasuda T, Kimura T.	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Low-dose eribulin reduces lung metastasis of osteosarcoma in vitro and in vivo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 161-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.26536.	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 Nakagawa H, Yui Y, Sasagawa S, Itoh K.	4. 巻 139(1)
2. 論文標題 Evidence for intrathecal sodium butyrate as a novel option for leptomeningeal metastasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurooncol.	6. 最初と最後の頁 43-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-018-2852-2.	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 Kumai J, Sasagawa S, Horie M and Yui Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 A Novel Method for Polyacrylamide Gel Preparation Using N-hydroxysuccinimide-acrylamide Ester to Study Cell-Extracellular Matrix Mechanical Interactions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Materials.	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） 10.3389/fmats.2021.637278	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 由井 理洋、熊井 準、渡邊 健太、笹川 覚、中 紀文
2. 発表標題 骨肉腫の肺転移形成は肺の線維化に依存する
3. 学会等名 第28回 日本がん転移学会 学術集会・総会（口頭発表）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 由井 理洋、熊井 準、渡邊 健太、笹川 覚、中 紀文
2. 発表標題 骨肉腫の肺転移形成は細胞周囲の線維化に依存する
3. 学会等名 第78回 日本癌学会 学術総会 (ポスター発表)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊井準、渡邊健太、笹川覚、由井理洋
2. 発表標題 細胞外マトリックスの硬度から見た骨肉腫転移メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (ポスター発表)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 健太、由井 理洋、笹川 覚、安田 剛敏、木村 友厚
2. 発表標題 Inhibitory effect of Eribulin on metastasis in mouse osteosarcoma
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 (ポスター発表)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 由井 理洋、渡邊 健太、五十嵐 晃、笹川 覚、安田 剛敏、木村 友厚
2. 発表標題 エリブリンによる骨肉腫肺転移抑制効果の解析
3. 学会等名 第27回 日本がん転移学会 学術集会・総会 (ポスター発表)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 由井 理洋, 渡邊 健太, 五十嵐 晃, 笹川 覚, 安田 剛敏, 木村 友厚
2. 発表標題 エリブリンによる骨肉腫肺転移抑制効果の解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (ポスター発表)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Watanabe K, Yui Y, Sasagawa S, Suzuki K, Kanamori M, Yasuda T, Kimura T.
2. 発表標題 Low-dose eribulin suppresses lung metastasis of osteosarcoma in vitro and in vivo
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (ポスター発表) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

野崎徳洲会病院附属研究所ホームページ <a href="https://nozaki.tokushukai.or.jp/rint/">https://nozaki.tokushukai.or.jp/rint/</a>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------