

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16666

研究課題名(和文)骨肉腫細胞の浸潤・転移機構におけるケモカインの意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of the signal cross talk via CCL26 in the tumor microenvironment in osteosarcoma.

研究代表者

岩崎 達也 (Iwasaki, Tatsuya)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30769427

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)：骨肉腫は原発性骨腫瘍の中で最も発生頻度が高い疾患である。化学療法の進歩により生存率は改善したが、未だ遠隔転移を生じ予後不良となる症例も存在する。腫瘍細胞の悪性形質には、腫瘍細胞自身の増殖能・転移能が関与するのみならず、腫瘍細胞周囲に存在する正常細胞との相互作用が重要であることが、近年明らかとなってきた。特に遠隔転移に関しては、細胞同士の直接接触がなくても作用する液性因子の存在が重要であると考えられる。本研究の目的は、骨肉腫の遠隔転移成立における、腫瘍微小環境内および遠隔転移部での液性因子の関与とその意義を解明することである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去30年にわたり骨肉腫に対する新薬は登場しておらず、現在の標準治療に用いられている抗癌剤は1970年代に開発された薬剤である。既存の抗癌剤の組み合わせや投与タイミングの改変、薬剤追加による治療成績の向上はもはや限界に達している。正常細胞と腫瘍細胞間のケモカインを介した相互作用に、どのような遺伝子が関与し、周辺環境を腫瘍細胞の生存や転移に有利な状態に変化させるか、が明らかになると考えられ、本研究の意義は極めて大きい。そのメカニズムを明らかにすることで、従来の化学療法とは全く異なる新しい治療法の開発に繋がる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma is the most common primary bone tumor, and advances in chemotherapy have improved survival rates, but there are still cases of distant metastasis, leading to poor prognosis. Recently, it has been established that the malignant trait of tumor cells does not only involve proliferative and metastatic activity but also the interaction between them and the normal cells surrounding them. Based on this perspective, we analyzed how osteosarcoma cells interact with different types of human mesenchymal stem cells. In this study, we elucidated the role of chemokine not only in terms of its mechanism in primary tumors but also in distant metastatic lesions, and we believe that our findings will contribute to the development of a new treatment strategy for osteosarcoma.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 液性因子

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫の増殖や転移には、微小環境内での周辺細胞との相互作用が大きな役割を果たしている。本研究では、骨肉腫と周辺細胞との相互作用に直接接触が不要な液性因子が関与していると仮定し、共培養モデルを用いて相互機構に関わる液性因子を同定、その意義について検討した。

2. 研究の目的

ヒト骨肉腫細胞株 (MG63) とヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を共培養し、それぞれ単独培養群との変化を網羅的に解析すると Chemokine (C-C motif) ligand 26 (CCL26) 発現が著明に増強していることを見いだした。これまで炎症性ケモカインとして考えられていた CCL26 が、骨肉腫と周辺微小環境においてどのような役割を果たしているのか全く調査されていない。本研究の目的は、骨肉腫の遠隔転移成立における、腫瘍微小環境内および遠隔転移部での CCL26 の関与とその意義を解明することである。

3. 研究の方法

骨肉腫細胞とその微小環境内における CCL26 を介した signal cross-talk のメカニズム解明と臨床応用に展開するための基礎となる研究を行った。具体的には、以下の項目を検討した。

- 1) CCL26 のリコンビナント蛋白質および中和抗体を用い、単独培養および共培養での CCL26 の mRNA、タンパク発現、さらに細胞増殖に影響しているかを検証する。
 - 2) 抗体の有無による浸潤能の変化を motility assay, invasion assay にて解析する。
 - 3) 2) で用いた細胞群を使用し浸潤能に関わる因子の蛋白質発現を評価する。
 - 4) *in vivo* で転移能が変化するか観察する。単独培養群、共培養群、共培養+中和抗体投与群それぞれの細胞をマウス尾静脈に投与し転移数を比較する。
- 以上の方法でケモカイン CCL26 が骨肉腫と hMSCs との間で signal cross-talk を形成し腫瘍進展に寄与している因子であるか解析を行った。

4. 研究成果

1) 共培養条件および Recombinant (r)CCL-26 投与により誘導された、MG63 および hMSC における CCL-26 発現および細胞増殖の変化を解析した。併せて単培養および共培養の MG63 および hMSC における CCL-26 発現に対する抗 CCL-26 Ab の中和の影響を検証した。骨肉腫細胞と間葉系幹細胞の共存でお互いから上昇する CCL26 は腫瘍細胞にとって促進的に作用しているはずである。リガンドとして CCL26 を投与すると共培養状態と同様に CCL26 の発現量が増加し(図 1)、

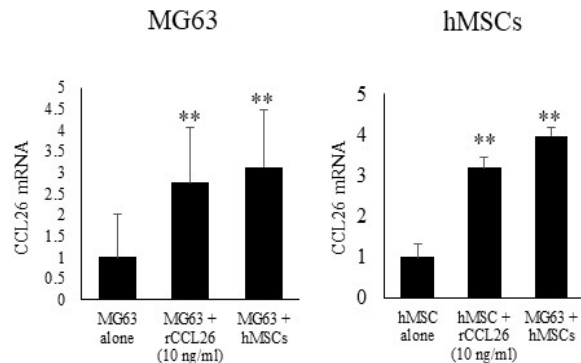


図1 リコンビナントCCL26によるmRNA変化

CCL26 の発現が上昇したりガンド投与および共培養した MG63 と間葉系幹細胞は dose dependent に細胞増殖が有意に上昇していた(図 2)。さらに中和抗体を投与すると CCL26 の発現は低下した。さらに注目すべき点として、単独培養下においても中和抗体投与により CCL26 発現が低下することから、autocrine 機構も

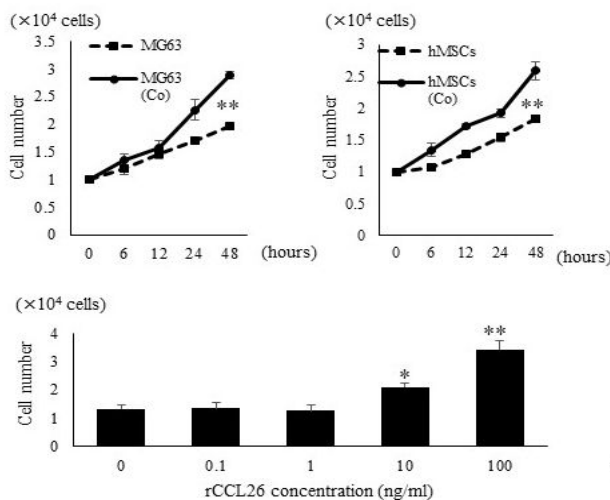


図2 リコンビナントCCL26による細胞増殖変化

同時に有していることが分かった(図 3)。つまり骨肉腫細胞と hMSC が近隣に位置するとお互いが autocrine に加えて paracrine 機構が成立しシグナルループを形成していることが明らかとなった。ケモカインである CCL26 は骨肉腫細胞にとっては単に炎症性物質というだけではなく、腫瘍進展を促進的に作用する非常に重要な液性因子であることが

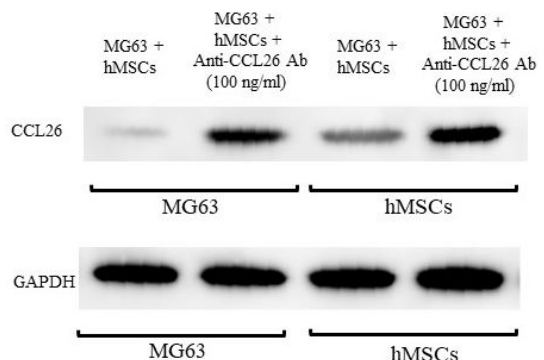


図3 抗CCL26抗体によるCCL26 mRNA発現変化

明らかとなった。

2) MG63 の運動性に対する共培養条件および rCCL-26 または抗 CCL-26 Ab の投与の影響について評価した。ケモカインである CCL26 が腫瘍微小環境で及ぼす影響の中で、腫瘍細胞にとってより重要な機能は運動能や浸潤能の増強である。リコンビナント CCL26 と共培養で遊走能、浸潤能ともに増強し中和抗体を用いた群ではそれらは有意に低下していた(図 4)。

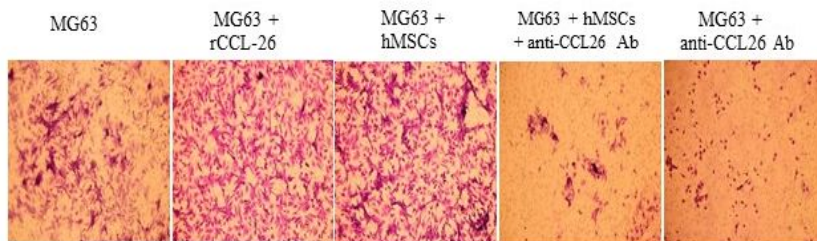


図4 各条件下における細胞浸潤能の変化

3) Src の発現の変化と侵襲性に関連するその下流因子についてタンパク発現変化を観察した。CCL26 は CCR3 のリガンドとして結合し、RhoA, Src, FAK や PI3K, ERK など様々なシグナルを司るケモカインレセプターである。通常はアレルギーなどで好酸球の遊走などで重要な役割を果たしているが、癌細胞においても同様に細胞の遊走や運動能に関与しているのではないかと予想した。特に CCR3 の下流で運動能に関わる因子として Rac, Src とその関連するパスウェイに注目した。我々が確認した結果では、やはり CCL26 増強下では浸潤能に関与するシグナルが活性化していたと同時に ERK など増殖能に関わるタンパクもリン酸化していたことから、CCL26 の細胞間相互作用によって運動能だけではなく増殖能も増強されていたことを示唆する結果であった(図 5)。同時に細胞の形態変化も CCL26 の作用を明らかにした。CCL26 が増強された細胞と中和抗体が用いられた細胞の間にはアクチンファバーの進展に明瞭な差があった。CCL26 による細胞内シグナルが形態的な変化をもたらした事が示された。

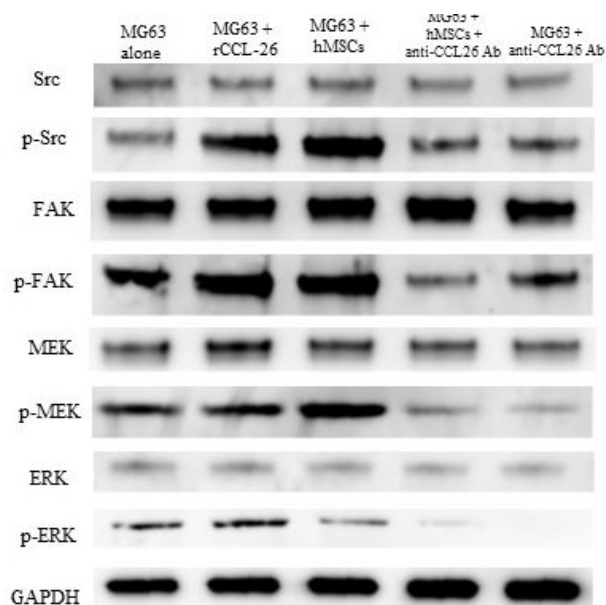


図5 細胞浸潤能に関与する因子のタンパク発現

4) マウスにおける肺転移巣の変化について検証を行った。骨肉腫を含め、悪性腫瘍のもっとも深刻で特徴的なのは遠隔転移である。骨肉腫患者の生存期間を延長するために、遠隔転移に関わる問題を解決しなければならないことは明白である。我々は CCL26 中和抗体を腹腔内に投与することでマウス転移巣の体積が減少した現象を確認した(図 6)。これは骨肉種細胞が遠隔へ転移するには周囲の正常細胞と協同して CCL26 を増加させることで浸潤能を強化することが必要であるという可能性を示す結果である。さらに CCL26 を中和したマウスの腫瘍組織内からも CCL26 の発現が有意に低下しており、ex vivo で行ってきた現象が生体内でも確認できた。液性因子である CCL26 は直接接触ではなく、遠隔部病変の進展に深く関わっている。骨肉腫で最も恐ろしい遠隔転移という現象の制御に向けて新たな展開となるであろう。

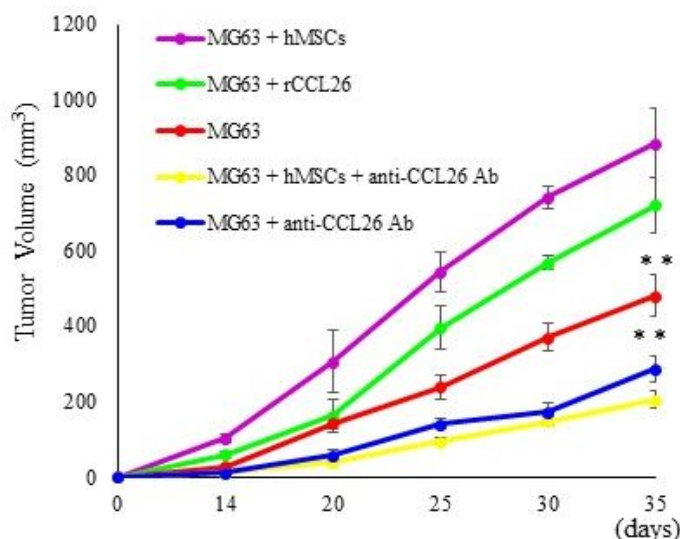


図6 マウス骨肉腫の腫瘍増殖能の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Tanaka K, Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Tsumura H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Surrogacy of intermediate endpoints for overall survival in randomized controlled trials of first-line treatment for advanced soft tissue sarcoma in the pre- and post-pazopanib era: a meta-analytic evaluation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC cancer	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/s12885-019-5268-2	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 Tanaka K, Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Tsumura H.	4. 巻 14
2. 論文標題 A meta-analysis of randomized controlled trials that compare standard doxorubicin with other first-line chemotherapies for advanced/metastatic soft tissue sarcomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plos One	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） 10.1371/journal.pone.0210671.	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 Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Interaction between human osteosarcoma and mesenchymal stem cells via an interleukin-8 signaling loop in the tumor microenvironment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Commun Signal.	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/s12964-018-0225-2.	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 Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H.	4. 巻 18
2. 論文標題 MicroRNA-181c prevents apoptosis by targeting of FAS receptor in Ewing's sarcoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Cell Int.	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/s12935-018-0536-9.	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----