

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16679

研究課題名（和文）骨肉腫における血中循環腫瘍細胞と上皮間葉移行の機能解析および肺転移抑制について

研究課題名（英文）Functional analysis of circulating tumor cells and epithelial-mesenchymal transition and inhibition of lung metastasis in osteosarcoma

研究代表者

田中 太晶（Tanaka, Takaaki）

福井大学・学術研究院医学系部門・講師

研究者番号：00796245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：マウス骨肉腫高肺転移株LM8とその親株のDunnを用いた。LM8をマウス皮下移植し、血液を直接浮遊培養して生きている状態のCTCを採取した。2次元培養のLM8と3次元培養のLM8-CTCのそれぞれからRNAを抽出し、RNAの差異を解析した。LM8およびDunnを2次元培養を行い、それぞれ細胞上清を回収してエクソソームの解析を行った。ではLM8とLM8-CTCのRNAに差異を認めなかった。これはCTCは数個から数十個のクラスターであるが、浮遊培養によって微妙な発現の差異が消失したためと考えられる。しかしでは転移に関わる因子AにLM8とDunnとの間に大きな差があることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫は年間発生が約200例と非常に稀であり、若年齢層に好発する骨悪性腫瘍である。手術、化学療法、放射線治療を含めた集学的治療により5年生存率は8割程度であるが、肺転移例では2割程度と予後不良である。このため、骨肉腫治療においては原発巣のコントロールだけでなく、転移抑制を目的とした治療法が渴望されている。近年、転移形成において血中循環腫瘍細胞（CTC）の存在が重要な役割を果たすとの報告が多くされており、その機能を解析することは骨肉腫患者の予後改善につながることから意義のある研究である。

研究成果の概要（英文）：The mouse osteosarcoma high lung metastasis strain LM8 and its parental strain Dunn were used. (1) LM8 was implanted subcutaneously in mice, and live CTCs were collected by direct floating culture of blood. The RNA was extracted from LM8 in 2D culture and LM8-CTC in 3D culture, and the difference in RNA was analyzed. (2) LM8 and Dunn were cultured in 2D culture, and the cell supernatant was collected for exosome analysis. (1) No difference in RNA between LM8 and LM8-CTC was observed. This may be due to the fact that CTCs consist of several to dozens of clusters, and the subtle differences in expression were eliminated by floating culture. However, in (2), we found a large difference in metastasis-related factor A between LM8 and Dunn.

研究分野：整形外科学関連

キーワード：骨肉腫 血中循環腫瘍細胞 上皮間葉移行 肺転移

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫の罹患率は100万人あたり4人と非常に稀であり、若年齢層に好発し、その年代における最も頻度の高い骨腫瘍である。現在まで手術、化学療法、放射線治療を含めた集学的治療により生存率は改善したものの、その予後は劇的な改善には至っておらず、肺転移により最も大きく左右される。また初診時から肺転移がある場合や、集学的治療を行った後でも40-50%の患者に肺転移が生じ、これらの患者は予後不良である。このため骨肉腫治療においては原発巣のコントロールだけでなく、転移抑制を目的とした治療法が渴望されている。

2. 研究の目的

近年、転移形成において血中循環腫瘍細胞(CTC)の存在が重要な役割を果たすとの報告が多くされており、骨肉腫の肺転移における血中循環腫瘍細胞の解析を行うことで治療標的分子の検索、同定を目的とする。申請者はマウス骨肉腫高肺転移株 LM8 を用いて、生きている状態の CTC を浮遊培養することに成功しており、間葉系腫瘍における EMP を制御するメカニズムを解明するには非常によいモデルである。原発巣、CTC、肺転移巣における EMP を評価、解析し、それぞれの細胞の性状と内部状態、環境応答性を明らかにすることで骨肉腫肺転移における分子メカニズムを理解し、CTC の制御を目的とした分子標的治療の開発や転移抑制に特化した新規治療法を目指した。

3. 研究の方法

マウス骨肉腫細胞、高肺転移株である LM8 とその親株である Dunn を用いて実験を行った。Dunn は C3H マウスの背部皮下に移植しても肺転移を形成しないが、LM8 は背部皮下に移植後 4-5 週間でほぼ全例に肺転移形成を認める特徴をもつ細胞株である。

(1) *In vitro* では LM8 および Dunn を通常の接着状態と浮遊状態とで培養を行い、その増殖能を評価した。また *in vivo* では LM8 同種移植モデルで、遠隔転移を認めたマウスの血液から CTC を浮遊培養下で培養し、EMP に関わる遺伝子発現を評価した。

(2) LM8 および Dunn を 2 次元培養し、それぞれ細胞上清を回収してエクソソームの解析を行った。

4. 研究成果

(1)

ペトリデッシュと ultra low attach デッシュを使用した。

LM8 と Dunn を 48 時間培養すると図 1 のようにペトリデッシュでは浮遊する細胞も一部認めたものの、ほぼ接着して増殖していることを確認した。しかし、Ultra low attach デッシュを用いると接着する細胞はなく、ほぼすべての細胞が浮遊状態で増殖していることが確認できた。

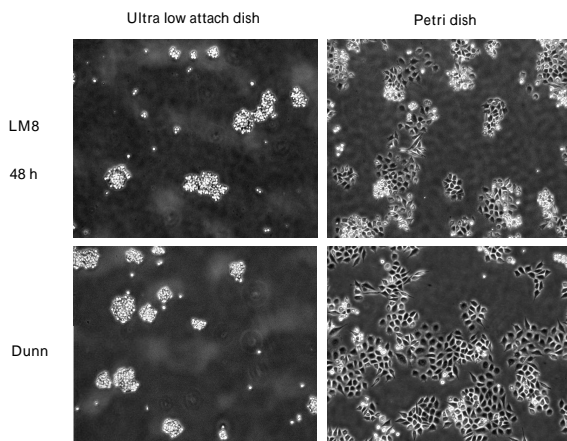


図 1 : LM8 と Dunn における接着培養と浮遊培養について

LM8 と Dunn を C3H マウス背部皮下に移植し、移植後 5 週間で採血を行い、上記の Ultra low attach デッシュを用いた 3 次元培養を行うと、両細胞株共に浮遊培養を行うことができた。Dunn では primary と CTC との間で浮遊培養を行っても 3 次元増殖に差を認めなかったが、LM8 においては CTC のほうが浮遊環境において血清あり、なしの両方の環境において primary にくらべて CTC のほうが有意に増殖能が高いことを確認した。これは高肺転移株である LM8 のほうが血中の環境でも増殖能が高いことを反映しているものと考えられた。(図 2)

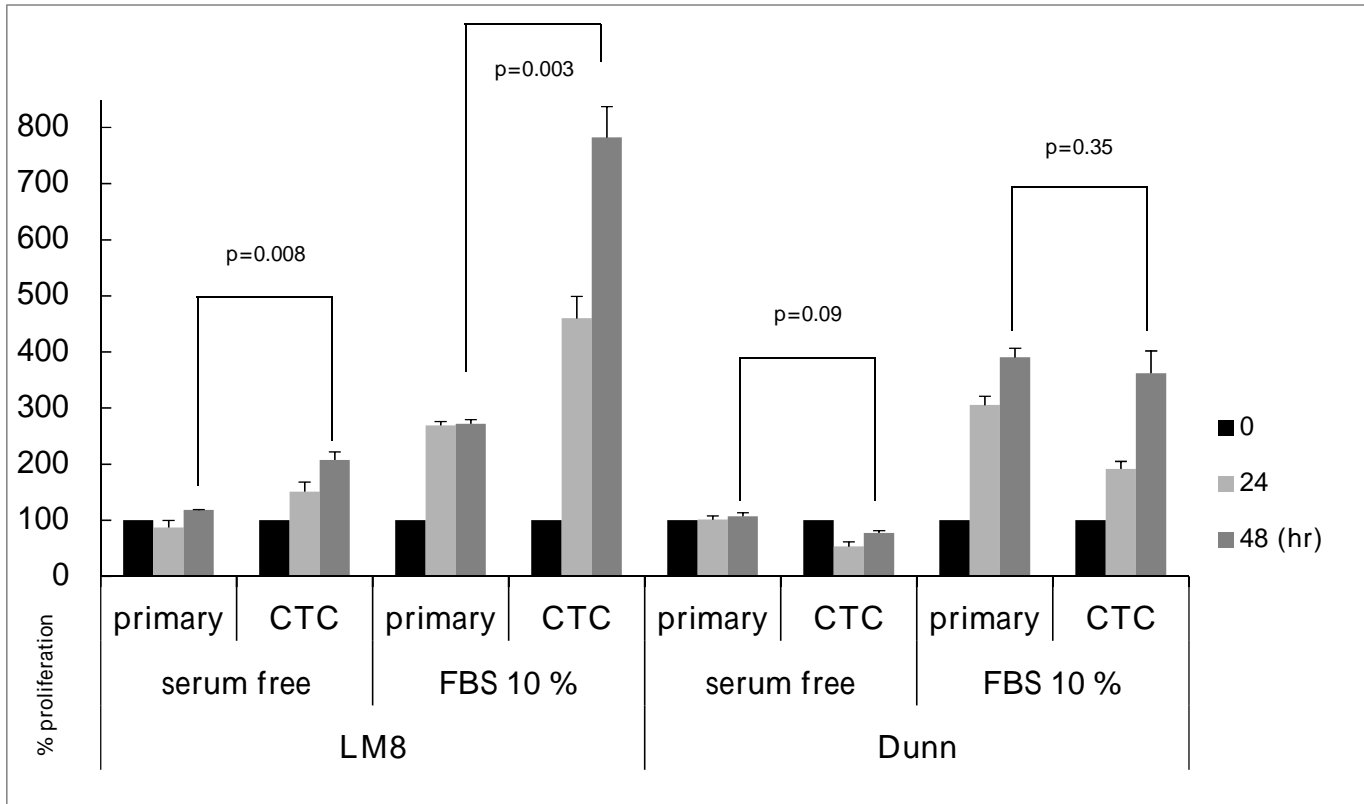


図 2 : LM8 と Dunn における浮遊培養時の増殖能について

また CTC を浮遊培養し、増殖した時点で RNA 抽出を行い、Primary の LM8 と LM8-CTC とのマイクロアレイを行ったものの、両者で有意な差を認めなかった。この結果は CTC 血中を循環する際、数個から数十個のクラスターを形成しているとされており、この実験系では接着することなく浮遊環境で増殖することは血中の環境を模倣しているが、増殖する時点で CTC と primary との差異がなくなったものと考えられる。シングルセル解析等のシステムが必要であると考えられた。

(2)

エクソソームとは細胞外小胞であり、タンパク質や核酸を内包しており、膜タンパクが標的細胞の選択・取り込みに関与しており、がん領域においてエクソソームが転移形成、化学療法抵抗性や生存率に関与している(図 3)。そこでまず LM8 および Dunn を 2 次元培養し、それぞれ細胞上清を回収してエクソソームのプロテオミクス解析を行った。すると LM8 と Dunn との間に約 5800 種類のタンパク発現の差異を認めた。その中でも分子 A に注目している(現時点では分子 A は明らかにすることができない) 分子 A は肉腫だけでなくがん全般において転移形成、化学療法抵抗性や生存率に関与しており、これを解析することで分子 A の造腫瘍性・転移能を解析し、抗分子 A 抗体を製作することでがん患者の治療につながるものと考えている。

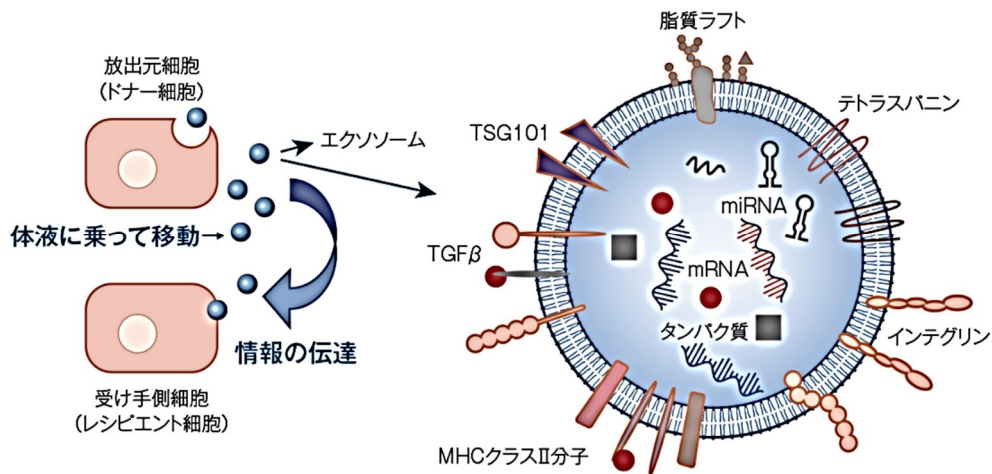


図 3 : エクソソームとは？

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imura Yoshinori, Takenaka Satoshi, Kakunaga Shigeki, Nakai Takaaki, Wakamatsu Toru, Outani Hidetatsu, Tanaka Takaaki, Tamiya Hironari, Oshima Kazuya, Hamada Kenichiro, Naka Norifumi, Araki Nobuhito, Kudawara Ikuo, Ueda Takafumi, Yoshikawa Hideki	4. 巻 43
2. 論文標題 Survival analysis of elderly patients with osteosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Orthopaedics	6. 最初と最後の頁 1741~1747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00264-019-04332-y	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 Outani Hidetatsu, Kakunaga Shigeki, Hamada Kenichiro, Takenaka Satoshi, Imura Yoshinori, Nagata Shigenori, Tanaka Takaaki, Tamiya Hironari, Oshima Kazuya, Naka Norifumi, Kudawara Ikuo, Araki Nobuhito, Ueda Takafumi, Yoshikawa Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Favorable outcomes of localized synovial sarcoma patients with a high utilization rate of neoadjuvant and/or adjuvant chemotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 151-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2019.1863	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 Nakai Sho, Yamada Shutaro, Outani Hidetatsu, Nakai Takaaki, Yasuda Naohiro, Mae Hirokazu, Imura Yoshinori, Wakamatsu Toru, Tamiya Hironari, Tanaka Takaaki, Hamada Kenichiro, Tani Akiyoshi, Myoui Akira, Araki Nobuhito, Ueda Takafumi, Yoshikawa Hideki, Takenaka Satoshi, Naka Norifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Establishment of a novel human CIC-DUX4 sarcoma cell line, Kitra-SRS, with autocrine IGF-1R activation and metastatic potential to the lungs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52143-3	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 Nakai Sho, Tamiya Hironari, Imura Yoshinori, Nakai Takaaki, Yasuda Naohiro, Wakamatsu Toru, Tanaka Takaaki, Outani Hidetatsu, Takenaka Satoshi, Hamada Kenichiro, Myoui Akira, Araki Nobuhito, Ueda Takafumi, Yoshikawa Hideki, Naka Norifumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Eribulin Suppresses Clear Cell Sarcoma Growth by Inhibiting Cell Proliferation and Inducing Melanocytic Differentiation Both Directly and Via Vascular Remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 742 ~ 754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0358	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 Imura Yoshinori, Yamamoto Sachiko, Wakamatsu Toru, Tanaka Takaaki, Tamiya Hironari, Sugimura Keiji, Miyata Hiroshi, Ishihara Ryu, Yano Masahiko, Naka Norifumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Clinical features and prognostic factors in patients with esophageal cancer with bone metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 717-724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.11142	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 Imura Yoshinori, Takenaka Satoshi, Kakunaga Shigeki, Nakai Takaaki, Wakamatsu Toru, Outani Hidetatsu, Tanaka Takaaki, Tamiya Hironari, Oshima Kazuya, Hamada Kenichiro, Naka Norifumi, Araki Nobuhito, Kudawara Ikuo, Ueda Takafumi, Yoshikawa Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 Survival analysis of elderly patients with osteosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Orthopaedics	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) 10.1007/s00264-019-04332-y	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 Tateiwa Daisuke, Oshima Kazuya, Nakai Takaaki, Imura Yoshinori, Tanaka Takaaki, Outani Hidetatsu, Tamiya Hironari, Araki Nobuhito, Naka Norifumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Clinical outcomes and significant factors in the survival rate after decompression surgery for patients who were non-ambulatory due to spinal metastases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 347 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.10.003	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 Tamiya Hironari, Hagizawa Hiroki, Nakai Takaaki, Imura Yoshinori, Tanaka Takaaki, Oshima Kazuya, Ito Toshikazu, Naka Norifumi, Kuratsu Shigeyuki	4. 巻 2018
2. 論文標題 Endoprosthetic Reconstruction for a Displaced Atypical Femoral Fracture in a Cancer Patient with Poor Prognosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Orthopedics	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/7862516	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 Outani Hidetatsu, Akita Hirofumi, Nakai Takaaki, Takada Ryoji, Imura Yoshinori, Tanaka Takaaki, Tamiya Hironari, Oshima Kazuya, Takahashi Hidenori, Ohkawa Kazuyoshi, Katayama Kazuhiro, Araki Nobuhito, Naka Norifumi	4. 巻 47
2. 論文標題 Clinical Features and Prognosis of Patients With the Bone Metastasis of Pancreatic Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 e43 ~ e46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001098	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 Ukon Yuichiro, Tanaka Takaaki, Nagata Shigenori, Hagizawa Hiroki, Imura Yoshinori, Tamiya Hironari, Oshima Kazuya, Naka Norifumi, Aoki Yasuaki, Kuratsu Shigeyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Calcific myonecrosis mimicking soft tissue sarcoma: A case report	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) 10.3892/ol.2018.8320	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 田中 太晶
2. 発表標題 大腿骨骨幹部転移性骨腫瘍に対する人工骨幹の使用経験
3. 学会等名 第52回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 太晶
2. 発表標題 右上腕骨骨肉腫に対して、Attractive BD-Scoreを用いてMRI、ADC値を定量的に測定し、腫瘍の活動性を評価した1例
3. 学会等名 第52回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Tanaka
2. 発表標題 Clinical experience of intercalary endoprosthetic reconstruction for malignant mid-diaphyseal bone tumors of femur and tibia
3. 学会等名 20th ISOLS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Tanaka
2. 発表標題 Intramedullary nailing for bilateral femoral metastases from lung cancer and postoperative rehabilitation
3. 学会等名 12th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------