

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09497

研究課題名(和文) リキッドバイオプシーを用いた軟部肉腫の早期転移診断・治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis and treatment of metastasis of soft-tissue sarcoma using liquid biopsy

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス軟部肉腫の肺転移モデルにおいて、血中腫瘍循環細胞(CTC)は、原発巣が肉眼的腫瘍を形成する2週から存在し、原発巣の増大とともに増加した。さらに、微小転移形成以前から出現するという体内動態を明らかにした。CTCの回収が確立できれば、微小転移の出現予測に有用と考える。一方、CTC数と肺転移数に直接的な関連は認めず、遠隔転移の進行は、CTCの存在のみでは規定されない。CTC回収の際にコロニー形成をする細胞集団を認めた。転移能を規定する因子の1つとして、循環血液中におけるコロニー形成能について解明することが今後の課題の1つである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟部肉腫の原発巣に対する治療は、広範切除を行うことで成し遂げることができる。しかし、生命予後の改善には、原発巣の確実な切除に加え、遠隔転移の制御が不可欠である。軟部肉腫の遠隔転移の早期診断として、血中腫瘍循環細胞(CTC)の体内動態の把握および機能解析を進めることは、遠隔転移を制御し、治療成績の向上につながる。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model of pulmonary metastasis of soft-tissue sarcoma, circulating tumor cells (CTCs) in the blood were present from 2 weeks after the primary tumor formed a gross mass and increased as the primary tumor grew. Furthermore, we found that CTCs appeared even before the formation of micrometastases, which may be useful for predicting the appearance of micrometastases if CTC collection can be established. On the other hand, there was no direct relationship between the number of CTCs and the number of lung metastases, and the progression of distant metastases was not defined solely by the presence of CTCs. One of the future issues is to elucidate the colony-forming ability in the circulating blood as one of the factors that determine metastatic potential.

研究分野：整形外科

キーワード：血中腫瘍循環細胞 軟部肉腫 肺転移

1. 研究開始当初の背景

軟部肉腫は、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。原発巣に対しては、腫瘍切除により病巣の除去が可能であるが、一旦、遠隔転移を生じると、約 70%の患者が転移の増悪により死亡に至る。近年、再発・転移を来した進行性軟部肉腫に対する新規の抗腫瘍薬 (パゾパニブ、トラベクテジンとエリプリン)の導入によって、生命予後の改善が期待されているが、依然として予後は不良である。進行性軟部肉腫の制御には、遠隔転移の制御が不可欠で、遠隔転移を初期の段階で診断し、転移の進行を制御し得る新規治療薬の開発が急務である。これまでに我々は、肉腫の制圧を目的とし、肺転移の分子機序について一連の研究を行ってきた。マウス自然発生の未分化多形肉腫細胞 (RCT)から分離、樹立した転移能の異なる高肺転移株 (high metastatic clone of RCT, HM-RCT)と低肺転移株 (low metastatic clone of RCT, LM-RCT)を用いて、HM-RCT ではラミニンの発現が亢進することで細胞外マトリックスへの接着能および浸潤能が亢進し、肺転移が促進することを明らかにした。その結果をもとに臓器の微小環境として、転移先の線維芽細胞と肉腫細胞の相互関係におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-2, 9)の関与、血管内皮細胞と肉腫細胞の相互関係における TNF- α やインターロイキン-1 (IL-1)の関与を解明した。今後、肉腫の転移形成における初期段階の病態を解明し、転移の進行を制御することが、肉腫治療の発展に必要である。

リキッドバイオプシーは、がん患者の血液などの体液を採取し、体液中に存在する微量ながん細胞やがん細胞由来の産物を高感度に検出する手技である (図 1)。リキッドバイオプシーで検出可能なバイオマーカーとして、CTC、血中遊離 DNA (cell free DNA; cfDNA)、ctDNA が挙げられる。これらのバイオマーカーの検出により、がん患者の治療効果判定や転移の出現といった、癌細胞の動態をリアルタイムで把握することが可能である。その結果、癌腫、特に肺癌、乳癌、大腸癌治療で、病期・病勢に応じた最適な治療の導入を可能にし、進行癌患者の生命予後の飛躍的な改善が期待されている。そこで、腫瘍の起源および臨床の特徴が異なる肉腫においても、リキッドバイオプシーを用いて、CTC や ctDNA をモニタリングし、転移形成の比較的早期の段階で、転移を制御する新規の標的分子・蛋白を同定することが期待できる。現在の肉腫治療における薬物療法は、腫瘍細胞の増殖を抑制する薬剤であり、転移形成の早期を標的とする薬物療法は存在しない。本研究では、軟部肉腫患者でリキッドバイオプシーによる転移の早期診断に有用なバイオマーカーを確立し、転移形成の準備段階で CTC がどのように転移促進機能を獲得するのか、ctDNA の解析も加え、転移制御機構を解明する。その結果、転移形成が加速する機序が明らかとなり、転移形成の早期段階を標的とした新規薬物療法の開発につながり、肉腫細胞を根絶させることができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、軟部肉腫の肺転移形成における血中腫瘍循環細胞 (CTC)の同定と体内動態を評価することである。将来的には、CTC や ctDNA の制御を介した、転移の早期診断と進行抑制の新しい治療法を確立することができ、今後の臨床応用への基礎となる。

3. 研究の方法

マウス軟部肉腫肺転移モデルとして、マウス自然発生未分化多形肉腫細胞 (RCT)から、Fidlerらの方法によって我々が樹立した、高肺転移株 RCT(+)と低肺転移株 RCT(-)を用いた。RCT(+)と RCT(-)をそれぞれ、C3H/He マウスの大腿筋肉に移植し、移植後 2, 3, 4 週で原発巣の体積と肺転移数を測定した。

CTC の回収は、毛細管現象を利用するサイズベースの CTC 分離キット (MetaCell®)にて、末梢および心臓採血で得た全血液から CTC を分離回収した。回収した filter を 4 日間培養し、直径 20 μ m 以上の細胞をカウントし、CTC 数を経時的に評価した。

CTC が RCT であることは、Vimentin と CD45 の二重蛍光染色で確認した。

4. 研究成果

原発巣の体積は、移植後 2 週、3 週、4 週と経時的に増加した。各週数とも、RCT(+)と RCT(-)では有意差は認めなかった。肺転移数は、移植後 3 週から結節として確認され、経時的に増加し、移植後 4 週で、RCT(+)の転移数が、有意に多くなった。

回収した CTC を 4 日間培養し、直径 20 μ m 以上の細胞を計測したところ、RCT(-)では移植後 2 週的全血中にも CTC を確認し、移植後 3 週では、コロニー形成が旺盛となった。移植後 4 週でも CTC が散見された。RCT(+)でも、同様に、移植後 2 週的全血から、CTC が観察され、移

植後3週では、やや集簇しつつある CTC が観察され、4週では、クラスター化した CTC の集団を認めた。RCT(+)では、CTC 数と原発巣サイズに相関を認めたが、肉眼的肺転移数との間に相関は認めなかった。

RCT 細胞の生物学的特徴として、細胞増殖能を CCK8 assay で評価したが、RCT(+), RCT(-)で有意差はなかった。

マウス軟部肉腫の肺転移モデルにおいて、CTC は、原発巣が肉眼的腫瘍を形成する2週から存在し、原発巣の増大とともに増加した。すなわち肉眼的肺転移が形成される以前から CTC は出現するという体内動態を明らかにした。また、クラスター化した CTC を認めたことは、乳癌領域で、原発巣で低酸素領域から血中循環に入った CTC は細胞間接着が増強し、クラスター化しやすく、低酸素領域由来の CTC クラスターは高転移能を有することが報告されており、肉腫の CTC においても、転移能を規定する他の分子生物学的機序の解明が今後の研究課題と考えられた。CTC の回収が確立できれば、微小転移の出現予測に有用だけではなく、遠隔転移の進行機序のさらなる解明につながると思われた。

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 1件）

1. 著者名 Suzuki Kayo, Yasuda Taketoshi, Haruhara Yuki, Watanabe Kenta, Nomura Keiko, Kanamori Masahiko, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 16
2. 論文標題 BCOR-CCNB3 sarcoma arising in the proximal tibia: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	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/mco.2022.2510	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, 川口善治	4. 巻 65
2. 論文標題 軟部肉腫に対する補助化学療法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 231, 237
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 佐藤菜々映, 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 川口善治.	4. 巻 72巻3号
2. 論文標題 下腿皮下組織に発生した骨外性骨肉腫の1例.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 整形外科	6. 最初と最後の頁 230 ~ 233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15106/j_seikei72_23	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 川口善治
2. 発表標題 再発性軟部肉腫に対する治療と成績.
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木賀代、安田剛敏、渡邊健太、金森昌彦、川口善治
2. 発表標題 組織型別にみた80歳以上の超高齢者軟部肉腫患者の治療成績と治療戦略.
3. 学会等名 第55回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木賀代、安田剛敏、渡邊健太、金森昌彦、川口善治
2. 発表標題 再発性軟部肉腫に対する治療成績.
3. 学会等名 第55回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木賀代、岩崎真実、安田剛敏、渡邊健太、金森昌彦、川口善治
2. 発表標題 マウス未分化多形肉腫モデルを用いた血中循環腫瘍細胞の動態評価.
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木賀代、安田剛敏、渡邊健太、金森昌彦、川口善治
2. 発表標題 再発性軟部肉腫に対する治療と成績.
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木賀代、安田剛敏、渡邊健太、金森昌彦、川口善治
2. 発表標題 組織型別にみた80歳以上の超高齢者軟部肉腫患者の治療成績と治療戦略.
3. 学会等名 第55回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木賀代、安田剛敏、渡邊健太、金森昌彦、川口善治
2. 発表標題 再発性軟部肉腫に対する治療成績.
3. 学会等名 第55回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木賀代、岩崎真実、安田剛敏、渡邊健太、金森昌彦、川口善治
2. 発表標題 マウス未分化多形肉腫モデルを用いた血中循環腫瘍細胞の動態評価.
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suzuki K, Yasuda T, Watanabe K, Kanamori M, Kawaguchi Y
2. 発表標題 Comparison of health-related quality of life with different antitumor agents for advanced soft tissue sarcoma.
3. 学会等名 13th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 川口善治.
2. 発表標題 軟部肉腫の遠隔転移出現症例における臨床的特徴と生命予後.
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術集総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 川口善治.
2. 発表標題 温熱処理自家骨移植による患肢温存手術の成績と課題.
3. 学会等名 第54回日本整形外科学会・骨軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 牧野紘士, 金森昌彦, 川口善治.
2. 発表標題 頭蓋頸椎移行部の転移性脊椎腫瘍に対する治療戦略.
3. 学会等名 第137回中部日本整形外科災害科学会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 川口善治.
2. 発表標題 大腿骨近位部転移性骨腫瘍に対する腫瘍用人工骨頭置換術の術後移動能と生命予後.
3. 学会等名 第53回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 川口善治.
2. 発表標題 大腿骨近位部転移性骨腫瘍に対する腫瘍用人工骨頭置換術の術後移動能に影響を与える因子.
3. 学会等名 第53回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 川口善治.
2. 発表標題 転移性脊椎腫瘍に対する放射線治療の有効性と限界.
3. 学会等名 第49回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木賀代, 安田剛敏, 渡邊健太, 金森昌彦, 川口善治.
2. 発表標題 血行再建術を併用した軟部肉腫切除術の成績.
3. 学会等名 第135回中部日本整形外科災害科学会・学術集会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	金森 昌彦 (Kanamori Masahiko) (20204547)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	安田 剛敏 (Yasuda Taketoshi) (20377302)	富山大学・学術研究部医学系・准教授 (13201)	
研究 分 担 者	渡邊 健太 (Watanabe Kenta) (90865255)	富山大学・附属病院・診療助手 (13201)	

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