

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：94416

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09290

研究課題名（和文）骨肉腫の足場依存的な肺内増殖メカニズムの解明と肺転移抑制療法への応用

研究課題名（英文）Elucidation of scaffold-dependent pulmonary growth mechanisms in osteosarcoma and their application to therapy for inhibiting pulmonary metastasis

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、in vivoのCRISPR活性化スクリーニングとin vitroのRNA-seq解析で、骨肉腫細胞が軟らかい環境での足場依存的、機械刺激非依存的増殖メカニズムを明らかにすることを試みた。RNA-seq解析では、高肺転移株LM8では、複数のCdc42GEF発現が増加し、複数のCdc42GAP発現が低下していた。さらに、軟らかい環境ではRibosome活性が亢進していることが分かった。CRISPR活性化スクリーニングでも、肺転移した骨肉腫細胞でRibosome関連遺伝子群の増幅が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨肉腫の肺転移メカニズムに対する工学的な新規のアプローチである。この研究によりリボソーム活性やCdc42活性が、“足場の乏しい軟らかい環境”での骨肉腫細胞の増殖を促進し、肺転移を増加させるメカニズムを明らかにできれば、肺組織の軟らかさに対応した増殖メカニズムという新たな治療標的を発見し、骨肉腫肺転移の抑制療法を開発することができる。

研究成果の概要（英文）：The 5-year survival rate of osteosarcoma has not shown significant improvement over the past 30 years, and the establishment of novel therapeutic strategies to suppress pulmonary metastasis, the primary cause of mortality, is desired. In this study, we attempted to elucidate scaffold-dependent, mechanically insensitive growth mechanisms of osteosarcoma cells in environments poor in collagen fibers, where they serve as soft scaffolds, using in vivo CRISPR activation screening and in vitro RNA-seq analysis. RNA-seq analysis revealed increased expression of multiple Cdc42GEFs and decreased expression of multiple Cdc42GAPs in highly metastatic LM8 cells. Furthermore, it was found that ribosome activity is enhanced in soft environments. CRISPR activation screening also confirmed amplification of ribosome-related gene clusters in metastatic osteosarcoma cells.

研究分野：腫瘍の転移

キーワード：骨肉腫 肺転移

### 1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍は他のがん種と比較して発生数が少なく、組織型が多岐にわたるため、新しい治療戦略の開発が困難である。中でも骨肉腫の5年生存率は、この30年間に大きな改善が見られておらず、主な死因である肺転移を抑制する新規治療戦略の確立が望まれている。

肺転移は原発巣から転移巣への複数のステップを経て成立する。血行性に肺組織に到達したうち0.01%程度の腫瘍細胞しか肺組織で増殖できないため、肺での腫瘍増殖は転移過程のボトルネックで、有用な治療標的と考えられている。我々は工学的観点から骨肉腫細胞の肺での増殖過程を研究し、骨肉腫細胞が肺組織の様な軟らかい環境で十分に増殖するには足場となるコラーゲン線維が増加する必要があること、骨肉腫細胞からの分泌因子によって肺線維芽細胞が活性化し線維化が進行すること、コラーゲン線維の増加を抑制する肺線維化抑制剤によってマウス骨肉腫肺転移モデルの肺転移が抑制されること、を報告した。さらにこの研究過程で、骨肉腫細胞がコラーゲン線維が増殖する以前の軟らかく足場の乏しい環境でも腫瘍外環境からの機械的シグナルに依存せず足場への接着依存性(足場依存性)に増殖することを見出した。

骨肉腫細胞は、肺転移初期に十分に肺線維化が進行しない段階でも腫瘍が増殖するメカニズムを有していると推測される。この足場依存的、機械刺激非依存的増殖メカニズムの解明は、骨肉腫の肺での増殖を初期段階で効果的に抑制し、上記の線維化抑制剤と併せることで肺転移を抑制する治療法の開発につながると考えた。

### 2. 研究の目的

肺転移初期段階で、骨肉腫細胞が軟らかく足場となるコラーゲン線維の乏しい環境での足場依存的、機械刺激非依存的増殖メカニズムを明らかにし、治療標的となる分子を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究開始時は、CRISPR活性化スクリーニングによって肺転移を促進する遺伝子を抽出し、肺転移初期段階の肺組織での増殖メカニズムを解析する計画であった。CRISPR-dCas9活性化システムでは、遺伝子切断活性を不活化したdCas9と複数の転写活性因子を組み合わせることで標的遺伝子を内在性に活性化する。Dunn細胞にCRISPR活性化ライブラリーを導入し、C3H/Heマウスに尾静注し、肺組織から回収した遺伝子の中で、どの遺伝子が増幅されているか次世代シーケンサーで解析した。

しかし、CRISPR活性化ライブラリーを低肺転移性のマウス骨肉腫細胞Dunnを導入することが困難なために実験の遂行が計画よりも遅れた。そこで、肺組織環境を模した軟らかいPAゲルとプラスチックディッシュ上での高肺転移株LM8、低肺転移株Dunnの遺伝子発現スクリーニングをRNA-seq解析で行い(Group1: LM8 on plastic dish, Group2: LM8 on PA gel, Group3: Dunn on plastic dish, Group4: Dunn on PA gel)、CRISPRスクリーニング解析を補完した。解析は、統計ソフトRを用いて行った。mappingはHisat2, quantificationはFeatureCounts, DEG検出はDESeq2, Edgwr, Clusteringはhclust, heatmap2, pathway解析とGO解析はClusterProfilerで行った。

## 4. 研究成果

### RNA-seq解析

clustering解析では細胞間の遺伝子発現の差異が培養条件によるものよりも大きいことが確認された。主成分分析でも、主成分1によって細胞群が分離され、主成分2,3で培養条件が分離された。

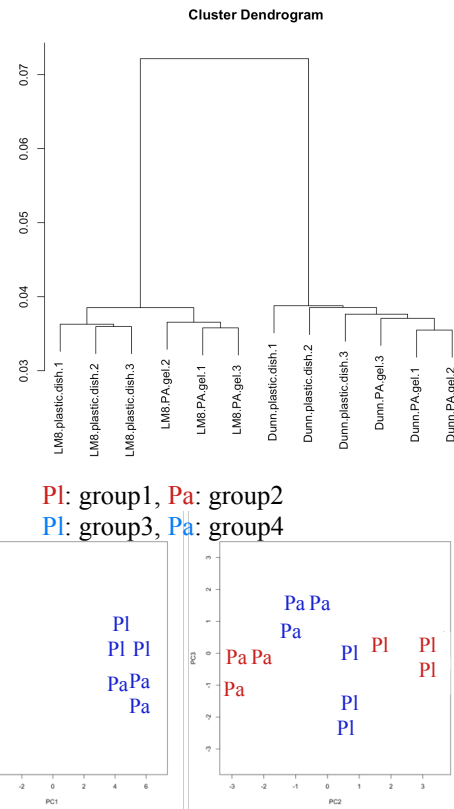
LM8-DunnシステムにおけるCdc42活性と肺転移性の関与について、2010年に研究員自ら報告している。しかし、Cdc42活性の調節機構については不明のままであった。今回、Group1とGroup3の比較からCdc42の活性を調節するGAP/GEF因子の発現に偏りがあることが明らかになった。高肺転移株LM8では、複数のGEF発現が増加し、複数のGAP発現が低下していた。いくつかのGAPはTARGET OSプロジェクトの公開データで患者予後との関連が確認された。さらに、Group1とGroup2のGO解析から、軟らかい環境ではRibosome活性が亢進しているこ

とが分かった。いくつかの Ribosomal protein はTARGET OSプロジェクトの公開データで患者予後との関連が確認された。

### CRISPR活性化スクリーニングの結果

CRISPR活性化ライブラリーを導入したDunn細胞を58匹のC3H/Heマウスに尾静注し、2匹で明かな肺転移を認めた。肺組織から回収した遺伝子に対して次世代シーケンサー解析を行った。肺組織で増幅された遺伝子をGO解析するとリボソーム関連遺伝子群の増幅が確認され、上記のRNA-seq解析結果を補完する結果であった。

本研究成果は2024年度の日本がん転移学会、日本癌学会で発表予定である。さらに、上記の結果を踏まえて、リボソーム活性やCdc42活性が、“足場の乏しい軟らかい環境”での骨肉腫細胞の増殖を促進し、肺転移を増加させるメカニズムを明らかにする計画である。本研究によって、肺組織の軟らかさに対応した増殖メカニズムという新たな治療標的を発見し、骨肉腫肺転移の抑制療法を開発する。



## 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 3件）

1. 著者名 Wakamatsu T, Ogawa H, Yoshida K, Matsuoka Y, Shizuma K, Imura Y, Tamiya H, Nakai S, Yagi T, Nagata S, Yui Y, Sasagawa S, Takenaka S	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of organoids from human epithelioid sarcoma with the air-liquid interface organoid cultures.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Oncol.	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/fonc.2022.893592	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 Yui Yoshihiro, Kumai Jun, Watanabe Kenta, Wakamatsu Toru, Sasagawa Satoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Lung fibrosis is a novel therapeutic target to suppress lung metastasis of osteosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of 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） 10.1002/ijc.34008	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 Rie, Wakamatsu Toru, Yoshida Keiichi, Matsuoka Yukiko, Takami Haruna, Nakai Sho, Tamiya Hironari, Kakunaga Shigeki, Yagi Toshinari, Yoshida Ken-ichi, Imura Yoshinori, Yui Yoshihiro, Sasagawa Satoru, Takenaka Satoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Genetic characterization of a novel organoid from human malignant giant-cell tumor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100486 ~ 100486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbo.2023.100486	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 Northey Jason J., Hayward Mary-Kate, Yui Yoshihiro, Stashko Connor, Kai FuiBoon, Mouw Janna K., Thakar Dhruv, Lakins Jonathon N., Ironside Alastair J., Samson Susan, Mukhtar Rita A., Hwang E. Shelley, Weaver Valerie M.	4. 巻 31
2. 論文標題 Mechanosensitive hormone signaling promotes mammary progenitor expansion and breast cancer risk	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 106 ~ 126.e13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2023.12.002	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshihiro Yui, Toru Wakamatsu, Satoru Sasagawa
2. 発表標題 肺線維化は骨肉腫肺転移の治療標的になりうる
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yui Yoshihiro, Kumai Jun, Watanabe Kenta, Wakamatsu Toru, Sasagawa Satoru
2. 発表標題 線維化抑制剤による骨肉腫の肺転移抑制の可能性
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021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 <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
---------	---------