

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18062

研究課題名（和文）細胞剛性に着目した転移抑制薬スクリーニング

研究課題名（英文）Screening of anti-metastatic agent based on cell stiffness

研究代表者

喜多 晃司（Kita, Kouji）

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：90828328

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）：癌細胞の転移には癌細胞形態の変化が必要であり、柔軟性が高い細胞は転移を形成しやすいため、柔軟性の低下は転移の抑制に繋がると考えられる。細胞の柔軟性を細胞の剛性と捉え、マウス骨肉腫細胞の高肺転移株であるLM8を用いて、原子間力顕微鏡による細胞剛性を増幅させる薬物のスクリーニング、マウス肺転移モデルによる転移抑制効果の検討を行った。Na⁺遮断薬、K⁺遮断薬、Ca⁺遮断薬、Gap junction遮断薬の中で、Gap junction遮断薬であり消化性潰瘍治療薬であるカルベノキシロンは、細胞増殖を抑制せず、細胞の剛性を上昇することで肺転移を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の癌に対する創薬は、癌細胞の増殖抑制が中心であり、転移抑制剤は未だ登場していない。癌細胞の転移には、細胞間隙や膠原線維間隙を通過する際に細胞形態の柔軟な変化が必要である。新たな基準として細胞の柔軟性に注目し、細胞を硬化させる薬剤を転移抑制剤として探索した。また、転移発生時期は不明であり、医療が転移へ介入できる時期は、初診から原発巣の完全切除までと予想される。抗癌剤のような高リスクではなく、低リスクで長期投与が可能であり、抗癌剤投与中も投与できるような薬剤が理想であると考えられ、一般薬から探索薬剤を選んだ。消化性潰瘍治療薬であるカルベノキシロンが理想的な転移抑制剤であるとの結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Cancer metastasis needs cell shape deformity. It is thought that highly deformable cancer cells have a highly metastatic phenotype. Experimentally, deformability was regarded as cell stiffness. We hypothesized that upregulation of cell stiffness inhibited lung metastasis. In this study, drug screening was performed based on cell stiffness evaluated by atomic force microscopy and lung metastasis in vivo mouse model. In the Na⁺, K⁺, Ca⁺ channel blocker and Gap junction blocker, carbenoxolone (gap junction inhibitor and drug for gastric ulcer) inhibited lung metastasis in vivo via upregulation of cell stiffness.

研究分野：転移

キーワード：転移 硬さ 剛性 原子間力顕微鏡 アクチン濃度 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の転移は、原発巣からの離脱、基底膜や周囲間質の破壊、血管内侵入、遠隔臓器での血管壁接着、血管外脱出、増殖のように多段階の過程を経て成立する。様々な細胞機能が関与するが、癌細胞の周囲環境に対する形態変化は、このすべてのプロセスにて共通なイベントであると考えられる。形態変化への柔軟性が高い細胞は転移を形成しやすく、柔軟性の低い細胞は転移を形成しにくいと予想され、柔軟性のコントロールは、転移能のコントロールに繋がる可能性がある。近年の癌に対する創薬は、腫瘍組織自体の退縮を目的としており、癌細胞の増殖抑制、細胞死がその根幹である。転移の抑制を主目的とした創薬はほとんど行われておらず、今回注目した細胞の柔軟性をコントロールする薬剤の探索研究は未だない。また、探索対象は、すでに臨床で使用されている非抗腫瘍薬であり、抗腫瘍薬は対象としない。その理由として、転移の発生時期が予測不能なため、抗転移薬は初診時から治療完了までの長期間投与が必要である。そのため、癌に対する手術治療、薬物治療に干渉することなく投与できることが重要である。このようなコンセプトによる抗転移薬の探索研究の例は他になく、臨床に直結した研究であり、転移の恐怖に耐えている方々の精神的苦痛の軽減と転移の減少という恩恵をもたらす可能性がある。

2. 研究の目的

細胞の柔軟性を細胞の剛性と捉え、剛性との関連性の強い細胞骨格であるアクチン濃度を指標にし、*in vitro*にてアクチン濃度の増加、細胞表面を硬化させて柔軟性を低下させる薬物を探索し、さらにその *in vivo*にて転移抑制効果を検討し、転移抑制薬として臨床応用の可能性を探ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

細胞は、マウス骨肉腫細胞である Dunn (低肺転移株) およびその高肺転移株である LM8 を使用した。

【方法】

アクチン intensity : 8well の cell culture slides を用いて、細胞を 3×10^4 cells/500 μ l/well で培養し、48 時間後に薬剤を投与する。薬剤投与後 24 時間後に Alexa Fluor 488 phalloidin を用いてアクチン細胞骨格を染色し、顕微鏡写真を撮影する。非投与群と薬剤投与群の 1 細胞あたりの平均アクチン intensity を、image J を用いて評価する。アクチン intensity は以下の式を利用する。

$$\therefore \frac{[Actin]}{Cell} = \frac{Area \times Mean Intensity^2}{s.d.^2}$$

細胞剛性評価 :

原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、薬剤投与に伴う剛性の変化を評価する。評価には剛性の指標である Young 's Modulus を利用する。

➤ *in vivo*での転移抑制効果の有無を評価する。

【方法】マウス骨肉腫細胞を C3H/He マウス背部皮下に 1×10^7 cells/mouse 注射し、背部皮下腫瘍モデルを作成する (自然肺転移モデル)。皮下注射翌日より、*in vitro* スクリーニングで厳選した薬剤を連日投与し、2 回/週で腫瘍径、体重を薬物投与開始日より 4-5 週間測定する。4-5 週後、マウスを安楽死させ、肺を摘出し、コントロール群と肺転移の状態を測定、比較する。

4. 研究成果

まず、低肺転移株である Dunn、高肺転移株である LM8 の肺転移に対する phenotype は、図 1 に示すとおりである。Dunn、LM8 のアクチン intensity、細胞剛性評価を行った。アクチン intensity は、Dunn と比較し、LM8 で有意に低下していた（図 2）。また同様に、細胞の剛性は、LM8 で有意に低下した（図 3）。これにより、骨肉腫においても、転移の phenotype にはアクチン intensity、及び細胞剛性の変化を伴うことがあきらかとなり、以上の結果を報告した (Kita K, et al. Curr. Issues Mol. Biol. 2021;43:1255-1266.)。

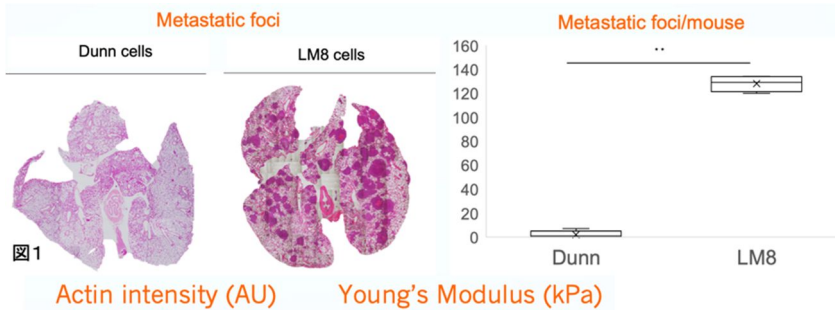


図1

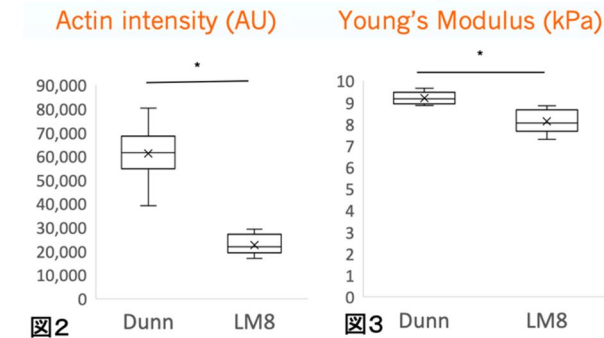


図2

図3

次に、低下した LM8 のアクチン intensity、細胞剛性を上昇させる薬剤をスクリーニングした。対象薬剤を ion channel inhibitor、Gap junction inhibitor とし、Amlodipine, azelnidipine, benidipine, disopyramide, pilsicainide, lidocaine, nifekalant, carbenoxolone を調査した。

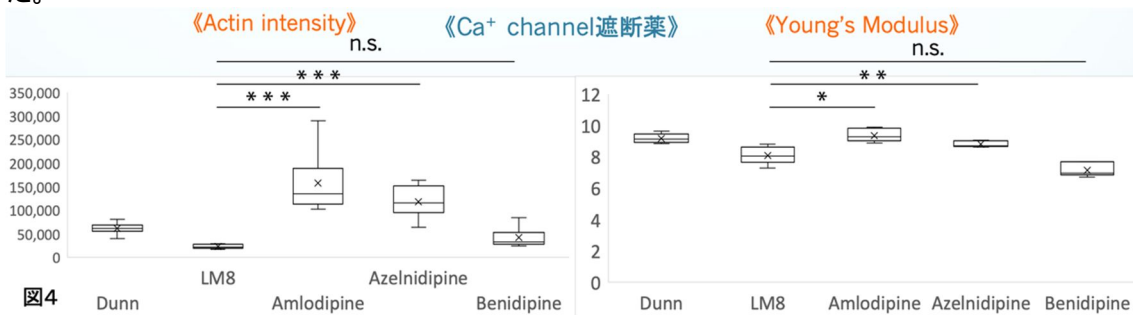


図4

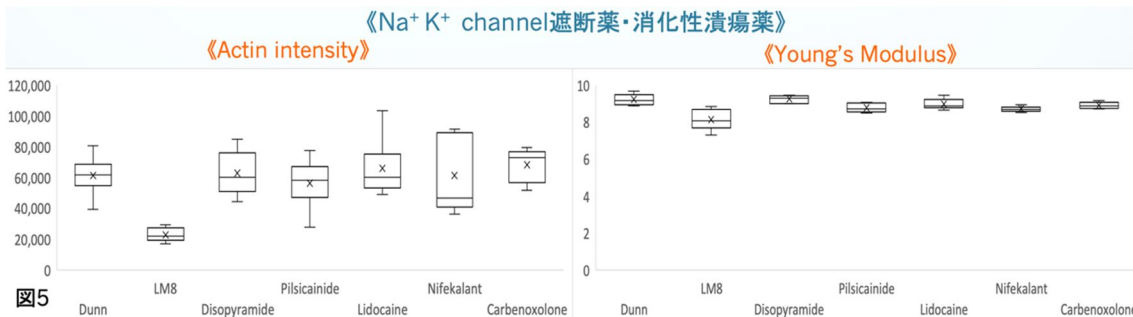


図5

図 4 , 図 5 の結果より、Disopyramide、amlodipine、Lidocaine、Carbenoxolone が、細胞剛性の上昇率が高かった。これらの細胞増殖抑制効果を 24h, 48h, 72h で検討すると、amlodipine は増殖抑制効果が高かったため（図 6） 以後の研究から除外した。

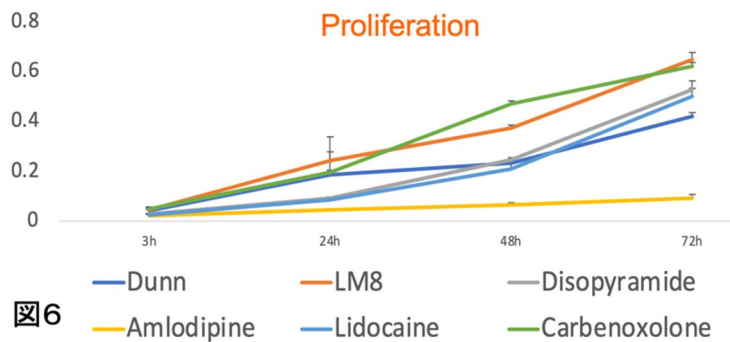
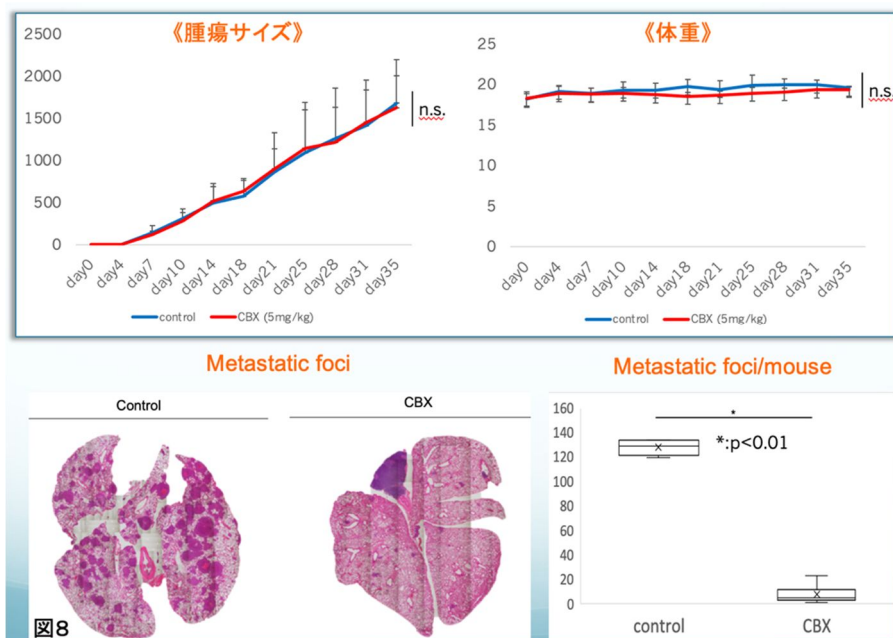
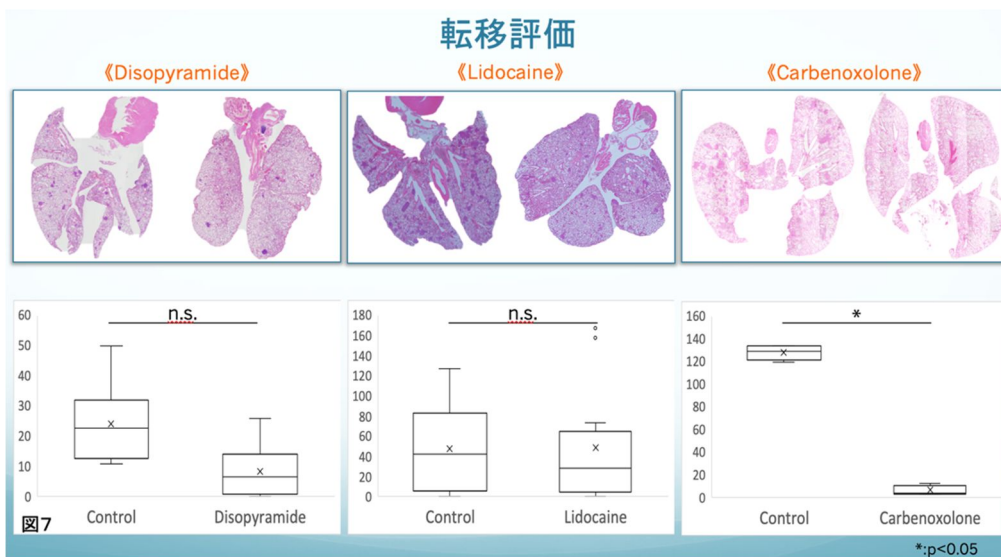


図6

次に Disopyramide、Lidocaine、Carbenoxolone の in vivo における肺転移抑制効果を、LM8-マウス肺転移モデルで検討した。肺転移抑制は、Carbenoxolone が最も効果的であった（図7）。そこで、Carbenoxolone による肺転移抑制効果を詳細に検討した。



背部の移植腫瘍は、経時的に増大したが、Carbenoxolone による増殖抑制効果は示さなかった。肺転移は、強力に抑制された。

Carbenoxolone は、アクチン intensity、細胞剛性を上昇させるとともに、肺転移を抑制することを示した。Carbenoxolone は消化性潰瘍治療薬であり、長期投与も可能であると考えられる。以上の結果は投稿予定である。

今後、Carbenoxolone の転移抑制効果のさらなる機能解明を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asanuma K, Nakamura T, Asanuma Y, Okamoto T, Kakimoto T, Yada Y, Hagi T, Kita K, Nakamura K, Matsumine A, Sudo A.	4. 巻 12(6)
2. 論文標題 Prognostic Significance of Thrombomodulin mRNA in High-Grade Soft Tissue Sarcomas after 10years.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orthop Surg.	6. 最初と最後の頁 1726-1732
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 Kita K, Nakamura T, Nakamura K, Hagi T, Asanuma K, Sudo A.	4. 巻 13(6)
2. 論文標題 Deep vein thrombosis of the upper extremity caused by central venous port in a patient with soft tissue sarcoma: A case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 89
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 Kita K, Nakamura T, Tsujii M, Kato J, Hagi T, Asanuma K, Sudo A.	4. 巻 30(8)
2. 論文標題 Clinical outcome of latissimus dorsi reconstruction after wide resection of soft-tissue sarcoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Orthop Surg Traumatol.	6. 最初と最後の頁 1441-1446.
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 Hagi T, Nakamura T, Kita K, Iino T, Asanuma K, Sudo A.	4. 巻 9(11)
2. 論文標題 Anti-tumour effect of tocilizumab for osteosarcoma cell lines.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Joint Res.	6. 最初と最後の頁 821-826
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 Asanuma K, Nakamura T, Hayashi A, Okamoto T, Iino T, Asanuma Y, Hagi T, Kita K, Nakamura K, Sudo A.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Soluble programmed death-ligand 1 rather than PD-L1 on tumor cells effectively predicts metastasis and prognosis in soft tissue sarcomas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 9077
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 Asanuma K, Nakamura T, Hagi T, Okamoto T, Kita K, Nakamura K, Matsuyama Y, Yoshida K, Asanuma Y, Sudo A	4. 巻 7
2. 論文標題 Significance of coagulation and fibrinolysis markers for benign and malignant soft tissue tumors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-021-08091-1	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 Kita K, Asanuma K, Okamoto T, Kawamoto E, Nakamura K, Hagi T, Nakamura T, Shimaoka M, Sudo A.	4. 巻 24
2. 論文標題 Cytoskeletal Actin Structure in Osteosarcoma Cells Determines Metastatic Phenotype via Regulating Cell Stiffness, Migration, and Transmigration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Issues Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb43030089.	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 喜多晃司、浅沼邦洋、岡本貴行、中村公一、萩智仁、飯野隆大、中村知樹、須藤啓広
2. 発表標題 細胞の剛性の増幅による骨肉腫の転移抑制効果
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学会
4. 発表年 2021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
---------	---------