

財団使用欄

令和5年6月16日 受理
No. 2

完了報告書

(兼 会計報告書)

2023年6月12日

公益財団法人 シオノ健康財団
理事長 塩野谷 貫一 殿

個人の方

氏名 中村 信久



団体の方

団体名

代表者



貴財団より助成いただいた活動が完了いたしましたので、下記のとおり報告します。

活動内容	3次元培養骨肉腫細胞の毛細血管網の形成促進作用におけるケメリン/ケメリン受容体の役割
------	--

※今後の連絡に必要となりますので、全ての項目にご記入ください。

提出者に関する事項	(フリガナ) 氏名又は団体名	ナカムラ ノブヒサ 中村 信久	生年月日 又は設立年月日	
	(フリガナ) 提出担当者	ナカムラ ノブヒサ 中村 信久		
	住所			
	連絡先 ・ 郵送先	〒464-0086 愛知県名古屋市中千種区末盛通2-11 (TEL) 052-759-2307 (FAX) 052-759-2168 (E-mail) nnaka@dpc.agu.ac.jp		

※提出後の住所・連絡先変更の際は、速やかに事務局までご連絡ください。

I. 活動成果及び今後の課題

(注) 各項目の記述には必要な分量のスペースを使ってください。

(1) 活動成果
新規アディポサイトカインであるケメリンは樹状細胞やマクロファージの走化性因子として知られていたが、最近の研究では、乳がんの一部と血中ケメリン値との強い相関が認められ (Song Y Et al; Sci Rep. 2021;22:6564)、ケメリンによる腫瘍血管新生の活性化を引き起こす可能性を示唆している。
さらに我々は、ケメリンが培養内皮細胞の増殖・遊走能をケメリン受容体であるケモカイン様受容体 1 (CMKLR1) を介して促進すること、マウスの生体においてケメリンが血管新生能を持つことを初めて報告した (Nakamura N et al; Physiol Rep. 2018; 6:e13962)。この報告は癌の血管新生におけるケメリンおよびケメリン受容体の関連を示唆するものである。
一方で、非上皮性悪性腫瘍である肉腫の血管新生とケメリンに関する基礎研究は未だに無く、肉腫に関する新たなメカニズムの解明と安全な肉腫血管新生阻害剤の開発が待たれている。
今回の研究目的は肉腫の血管新生においてケメリンがどのような影響を及ぼしているのかを検討することであり、初めての研究となる。
本研究では、まずヒト骨肉腫細胞の 2 次元培養におけるケメリンの細胞増殖能および遊走能を確認することと、3 次元培養プレートを用いてヒト骨肉腫細胞がスフェロイド形成を行うか否かを検討するために下記の実験を行った。
[方法]
1. ヒト骨肉腫細胞を用いたケメリンの増殖能の検討
ヒト骨肉腫培養細胞である Saos-2 は American Type Culture Collection (ATCC) から入手し、5%FBS-DMEM 培地にて培養・継代を行った後、96 穴プレートにて無血清培地にて 24 時間培養した。人組み換えケメリン蛋白 (R&D 社) 及びポジティブコントロールとしてヒト組み換え血管内皮増殖因子 (VEGF-165 : R&D 社) を添加し 72 時間後の増殖能を Cell-counting kit 8 (同仁堂社) を用いてプロトコールに従い染色し、マイクロプレートリーダー (Spark 10M:TECAN 社) を用いて 450 nm の吸光度を測定し、細胞増殖能を評価した。
2. ヒト骨肉腫細胞を用いたケメリンの遊走能の検討
Saos-2 を無血清培地にて 24 時間培養した後、 $\phi 8 \mu m$ 径のボイデンチャンバー内に 1×10^6 個を播種し、ケメリン (10 nM) 及び VEGF (5 nM) を走化性因子として 24 穴ウェルの下部に注入し、12 時間後に $\phi 8 \mu m$ のトランスウェルを通過した SAOS-2 を DAPI (Sigma-Aldrich 社) および Alexa Fluor 568 結合ファロイジン (Thermo Fisher 社) にて標識後、蛍光顕微鏡 (BZ-X700:キーエンス社) を使用してフィルターの下面で移動した細胞数を計数することによって、ケメリン及び VEGF 刺激による遊走能を定量化した。
3. 3 次元培養プレートを用いたヒト骨肉腫細胞のスフェロイド形成の観察
SPHERICAL PLATE 5D (水戸工業社製) を用いて Saos-2 をマイクロウェル 1well あたり 500 個播種し、7 日後に球形の細胞塊を形成した SAOS-2 を 4% パラホルムアルデヒドで固定し 0.05%-Triton X-100 で透過処理した後、Alexa Fluor 488 結合ファロイジン、DAPI およびヨウ化プロピジウム (Sigma 社) にて染色し、蛍光顕微鏡 (BZ-X700) を用いてスフェロイドの形態を観察した。

〔結果〕
1. ヒト骨肉腫細胞を用いたケメリンの増殖能の検討
ケメリン刺激において SAOS-2 はコントロールに比し 1.14 倍、VEGF 刺激はコントロールに比しては
1.13 倍の増殖能の増加と、ケメリンは VEGF と同等に Saos-2 の増殖能の促進効果が認められた。(図 1)
2. ヒト骨肉腫細胞を用いたケメリンの遊走能の検討
ボイデンチャンバーアッセイを用いた遊走能の検討では、ケメリン刺激において SAOS-2 はコントロールに比し 2.3 倍、VEGF 刺激はコントロールに比しては 2.5 倍の遊走能の増加を認め、ケメリンは VEGF と
同等に Saos-2 の遊走能の促進効果が認められた。(図 2)
3. 3次元培養プレートを用いたヒト骨肉腫細胞のスフェロイド形成の観察
3次元培養プレートを用いて SAOS-2 のスフェロイド形成の経時的変化を観察したところ、およそ 7 日
後に細胞が凝集しスフェロイドが形成されていく様子を確認することができた。また 3次元培養プレー
トから回収したスフェロイドの細胞塊を DAPI、ヨウ化プロピジウム (PI)、ファロイジンで蛍光染色を
行ったところ、細胞塊に均一にアクチンの分布が認められる一方、中心部に PI 陽性の死細胞がある
スフェロイドも確認できた。(図 3)
(2) 今後の課題
昨年度は二次元培養におけるケメリンの Saos-2 に対する細胞増殖能及び遊走能を確認したが、今後は
3次元培養におけるケメリンの役割を解析する予定である。さらに Saos-2 に血管内皮細胞を被覆する
ことによって、腫瘍増大効果が促進されるか否かを評価するとともに、ケメリン刺激がどのように影響
するかを検討する必要がある。
本研究では肉腫血管新生の進展機序にケメリンが強く関与することで、スフェロイドの腫瘍増大を促
進することが期待され、腫瘍サイズを定量化することによって従来の 2次元培養では困難であったがん
の血管新生・腫瘍増大に関する新たな機序を解明することが期待される。
また、VEGF だけでなく血管新生抑制因子としての抗ケメリン抗体または抗ケメリン受容体抗体の創薬
が臨床的重要性として期待され、ケメリンおよびケメリン受容体を治療ターゲットとすることで骨肉腫
に限らず、その他の軟部悪性腫瘍の治療に寄与できるものと考えられ、新たな治療オプションを提供す
ることが期待される。