

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10438

研究課題名(和文) がんの骨・肺転移におけるCathepsin Kの役割の解明

研究課題名(英文) The role of cathepsin K in the bone and lung metastases

研究代表者

小澤 英史 (KOZAWA, EIJI)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・研究員

研究者番号：60635572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Cathepsin Kは骨転移の際に破骨細胞や腫瘍細胞、腫瘍周囲にある貪食細胞や線維芽細胞から産生され、骨基質破壊に関与すると考えられている。我々はマウス骨転移モデルを作製するために、乳癌細胞と肺癌細胞をマウスの脛骨に注射して、溶骨性病変が形成されるのを確認した。2週と4週間目にレントゲン撮影を行い、骨破壊が2週間で進行し、両群に優位な差はみられなかった。ひとの肺原発腫瘍と転移性肺腫瘍の骨浸潤例は50例で、骨軟部腫瘍の骨浸潤例は19例であった。これらの予後は5年全生存率57.7%であった。悪性腫瘍の骨浸潤を組織学的に評価した結果、術前MRIでは感度100%であり、特異度96%であった。

研究成果の概要(英文)：CatK synthesized by osteoclasts and/or tumor cells, tumor microenvironmental macrophage/fibroblasts to be an obvious candidate for a key enzyme involved in the destruction of bone matrix. To establish a murine bone metastasis model, a needle with syringe was used to inject MDA-MB-231 cells and Lewis lung cancer cells into the tibia of mice. Osteolytic lesions progressed markedly at tibia of mice. Scion image analysis revealed that the size of the osteolytic increased from 2 to 4 weeks. The expansion of bone lytic areas of tibia with Lewis lung cancer progressed rapidly for 2 weeks. Histological stain for bone tumor was performed. The sample included 50 patients with lung tumors and 19 patients with musculoskeletal tumors. The overall 5-year survival rate of the patients was 57.7%. Pre-operative MRI evaluation is helpful to determine whether tumors should be resected with adjacent bone or not.

研究分野：整形外科

キーワード：腫瘍 カテプシンK 乳癌 癌骨転移 遠隔転移 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の骨転移に対し破骨細胞を制御する製剤が臨床で使用され、その効果が確認され、骨転移症例の骨関連事象が減少し QOL 維持に重要な役割を果たしている。破骨細胞からは蛋白分解酵素である Cathepsin K (CatK) が産生され、それを抑制することにより同様な効果が期待されている。さらに、CatK は癌細胞にも存在し、腫瘍細胞の移動能にも関与していることが報告されている。腫瘍間質の腫瘍関連マクロファージ (TAM) や腫瘍関連線維芽細胞 (TAF) から CatK が産生され、骨転移巣の形成や拡大に重要な役割を果たすことが解明されてきている。癌患者に対し CatK を阻害すると破骨細胞から産生される CatK 抑制効果による骨関連事象の減少や骨破壊進行の抑制が期待され、腫瘍細胞や腫瘍間質細胞から産生される CatK を制御できれば、腫瘍の進展も抑制するような抗腫瘍効果も期待される。CatK 阻害剤はすでに骨粗鬆症治療剤として第 1 層試験が行われている。

(2) 乳癌や肺癌、前立腺癌において腫瘍細胞に CatK が存在していることが確認されているが、乳癌ではサブタイプごとに発現がことなる報告もあり、サブタイプごとの発現の違いはわかっていない。腫瘍微小環境において炎症反応、血管新生、免疫制御、遠隔転移、血管侵入、がん細胞浸潤などに関与する腫瘍随伴マクロファージ (TAM) の役割が報告され、CatK が発現している。ここで CatK がどのような働きをし、骨転移や骨破壊にどのように関与しているか、また予後との関係は解明されていない。

(3) CatK は様々な疾患への関与が報告され、整形外科領域においては変形性関節症に関与している報告がある。我々は Ctsk 欠損マウスにおいて変形性膝関節症進行が抑制されることを報告した。また、ヒト変形性関節症の軟骨細胞と滑膜組織の多核巨細胞に発現上昇が認められた。軟骨や滑膜組織における局在や発現の程度は十分に調べられていなかった。CatK が変形性関節症に関与していれば、CTK 阻害剤がその進行抑制に有効である可能性も期待される。

2. 研究の目的

(1) 肺癌や乳癌、前立腺癌における CatK の発現や局在、発現している細胞の種類を調べる。

(2) CatK が乳癌や肺癌で骨転移に果たす役割を解析することにより、現在、治験が進んでいる CatK 阻害剤などの CatK を標的とした新規骨転移治療法の開発における基礎的データを蓄積すること。

(3) 整形外科代表的疾患である変形性関節症の軟骨と滑膜組織に CatK の関与が報

告されており、CatK 阻害剤の効果における基礎的データを蓄積すること。悪性腫瘍が骨に浸潤性増殖する際に破骨細胞と CatK がどのように関与するか調べる。

(4) 悪性腫瘍が骨に浸潤性増殖する際に破骨細胞と CatK がどのように関与するか調べる。

3. 研究の方法

(1) 癌骨転移マウスモデルの作製
肺癌と乳癌細胞を使用して骨転移マウスモデルを作製し、破骨細胞や腫瘍細胞から産生される CatK の役割を明らかにすることだった。最初に C57BL/6 野生型マウスに癌細胞を右脛骨内に注射し骨転移モデルを作成して骨破壊の経過を観察した。

(2) 骨転移部位の評価
軟 X 線にて右脛骨に溶骨性転移巣が形成されたことを確認し、1 週間ごとに撮影し溶骨部の大きさを測定した。組織学的検討は還流固定後、パラフィン切片を作成し CatK、RANKL、TRAP による破骨細胞染色、RANK、OPG、PTHrp を染色し、細胞の局在や形態、腫瘍内や周囲など染色される細胞の局在を調べた。

(3) 正常組織における CatK と Cathepsin 類の発現をみるためにヒト大腿骨骨頭軟骨と股関節滑膜細胞を採取した。大腿骨頸部骨折にて人工骨頭置換術を施行した際に採取した大腿骨骨頭軟骨をコントロール群として、変形性股関節症にて人工関節置換術を行った際に採取した大腿骨骨頭軟骨を変形性関節症群とした。一緒に滑膜組織も採取した。軟骨は免疫染色し染色細胞数を数えた。また、軟骨を酵素で分解し軟骨細胞を採取しアルジネートゲルで 3 次元培養したのち、細胞を処理して real-time PCR にて mRNA、ELISA にて蛋白発現を解析した。

(4) 悪性腫瘍が骨に浸潤性増殖する際に破骨細胞と CatK がどのように関与するか調べた。まずは、基礎的データとして、ひとの肺癌や肉腫の肋骨や椎体などの胸壁浸潤例を集めて解析した。また、ひとの四肢軟部肉腫の骨浸潤例についての特徴も調べた。

4. 研究成果

(1) 最初に 7 週齢雌の野生型マウス (C57BL/6) の脛骨にルイス肺癌細胞を注射し骨転移モデルを作った。投与後 2 週間でレントゲン上骨病変が確認できたものを採用し、4 週間目でレントゲン撮影と組織を採取した (図 1)。次に Ctsk^{-/-} と Ctsk^{+/+} マウスの脛骨に同様に肺癌細胞を摂取したが、CatK 欠損マウスでも腫瘍の進行がはやく、脛骨が残らないほど骨破壊が進行したのもみられ、Image J による溶骨性病変の範囲を比較したが差を認めなかった。

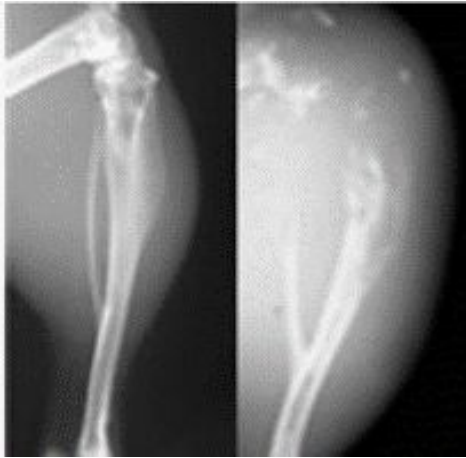


図 1. ルイス肺癌細胞をマウスの脛骨に注射し 2 週間後 (左) に軟エックス線にて溶骨性病変を確認し、4 週間後に組織を採取した (右)。

(2) 組織による骨破壊の評価、CatK、RANKL、TRAP による破骨細胞染色、RANK、OPG、PTHrp を染色し、細胞の局在や形態、腫瘍内や周囲など染色される細胞の局在を調べたが、明らかな違いを認めなかった。そこで、MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞を 4 週齢 BALB/C nu/nu mice の脛骨に同様に注射して摂取した。2 週間で溶骨性病変を形成したものを 4 週間目に組織採取した (図 2)。



図 2. MDA-MB-231 をマウスの脛骨に注射し 2 週間後 (左) に軟エックス線にて溶骨性病変を確認し、4 週間後に組織を採取した (右)。

CatK 免疫染色し腫瘍内に染色される細胞を確認し、破壊された骨周囲に破骨細胞を多く認めた、骨破壊に破骨細胞が関与していることが示唆された。

(3) ヒト軟骨・滑膜細胞に CatK が存在することがわかり、ヒトの関節より軟骨・滑膜組織を採取し mRNA と蛋白の発現を解析した。結果、ヒトの変形性股関節症では軟骨と滑膜細胞から CatK が多く発現しており、これらの疾患の進行への関与が疑われた。

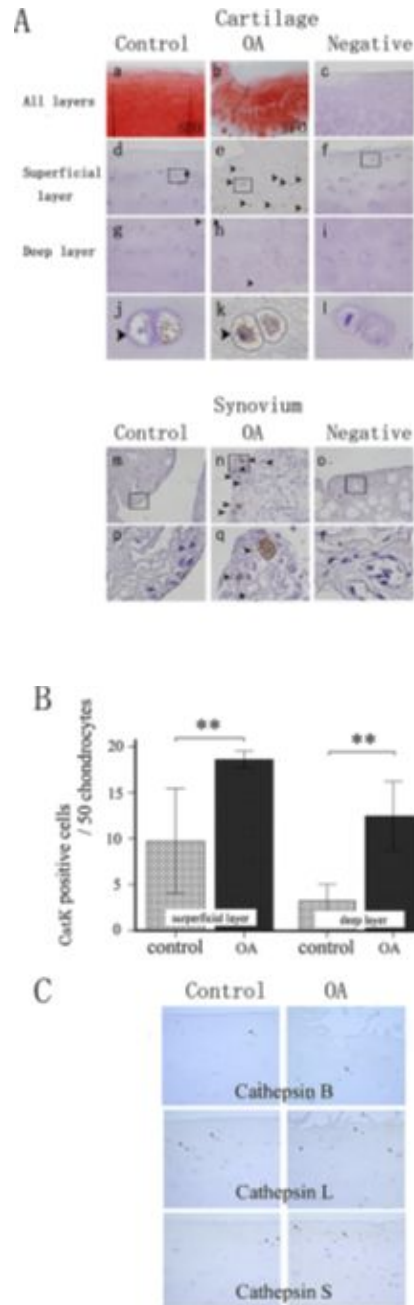


図 3. (A) 大腿骨骨頭軟骨 (コントロール) と変形性股関節症 (OA) 軟骨に対し CatK 免疫染色を行った (a-l)。また、同様に滑膜も免疫染色した (m-r)。軟骨組織をサフラニン O 染色した (a: コントロール軟骨、b: OA 軟骨)。d と e, f は軟骨表層で、g と h, i は軟骨深層であり j と k, l はそれぞれ d と e, f の拡大像を示した。CatK は軟骨細胞に染色されていることがわかった (矢頭)。特に軟骨表層において軟骨細胞が強く染色され、損傷のある部位に存在する軟骨はよく染色されていた (m-r)。滑膜組織 (m と n, o) と拡大像 (p と q, r) を示す。特に OA の滑膜内にある多核巨細胞と線維芽細胞が CatK に強く染色された (矢頭)。(B) CatK 陽性細胞 (/50 軟骨細胞) を 3 つの異なる箇所を集計した。コントロールと比べて明らかに染色された軟骨細胞数が多くみられた (mean ± SD; **p < 0.01)。(C)

CatB と CatL, CatS の免疫染色を行い、軟骨細胞にわずかに染色されるのみであることを確認した。

(4) これまでは骨転移モデルをマウスで作成して来たが、脛骨に腫瘍を投与する状況はひとにおいては骨転移というよりは骨浸潤に状態が似ているため、ひとの肺癌や肉腫の肋骨や椎体などの胸壁浸潤例を後方視的に集めて特徴を調べた。また軟部悪性腫瘍については四肢の骨浸潤例も集めて特徴を調べた。今後、骨への腫瘍浸潤部の CatK、RANKL、TRAP を調査するための基礎的データとしたい。

Table 1. 胸壁浸潤を来した症例の特徴

	Total (%)	Lung Tumor (%)	Bone and soft tissue tumor (%)	p
No. of patients	69	50	19	
Sex				
Male	59 (85.5)	46 (92.0)	13 (68.4)	0.02
Female	10 (14.5)	4 (8.0)	6 (31.6)	
Average age at surgery (range)	62	66 (43-79)	52 (13-72)	< 0.01
Average follow up period (range) Mo	36	32 (1-113)	48 (4-146)	0.08
Average blood loss (range) ml	451	480 (35-2500)	308 (10-1100)	0.32
Average operation time (range) min	318	308 (118-598)	367 (125-625)	0.13
Outcome				
CDF	36 (52.2)	23 (46.0)	13 (68.4)	
AWD	8 (11.6)	4 (8.0)	4 (21.1)	
DOD	24 (34.8)	22 (44.0)	2 (10.5)	
DOODs	1 (1.4)	1 (2.0)	0	

肺原発腫瘍と転移性肺腫瘍が骨浸潤していたのは 50 例で、骨軟部腫瘍が骨浸潤していたのは 19 例であった。これらの予後は以下の図 4 に示すように予後に差があった。

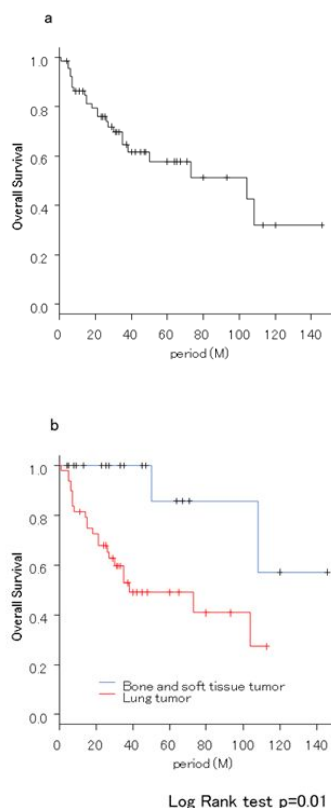


図 4. 胸壁浸潤した悪性腫瘍の予後。(a) 全生存率、(b) 肺原発性腫瘍と骨軟部原発性腫瘍の全生存率。

Table 2. 骨浸潤を来した四肢軟部肉腫の特徴

	Non-adjacent (n=52)	Adjacent (n=26)	Bone invasion (n=5)	p
Histology				<0.001
Liposarcoma	18	12	0	
MFH	11	4	0	
Leiomyosarcoma	3	2	1	
MPNST	2	1	2	
Size <5cm	15	1	1	<0.005
≥5cm	14	17	4	

悪性腫瘍の骨浸潤を組織学的に評価した結果、術前 MRI では感度 100%であり、特異度 96%、陽性的中率 83%、陰性的中率 100%であることがわかった。

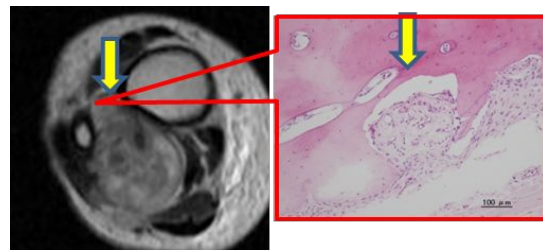


図 5. 単純 MRI、T2 強調画像にて腓骨と脛骨に接して存在する下腿軟部肉腫を認めた。肉腫と接した腓骨皮質に T2 強調画像で高輝度変化を認めた (左: 黄色矢印)。同部の組織像では腓骨皮質への腫瘍細胞浸潤を確認した (右: 黄色矢印)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 鈴木周一郎, 筑紫聡, 吉田雅博, 小澤英史
臨床経験 腫瘍用人工関節感染に対して再置換術を行った 6 例の治療経験
臨床整形外、査読有、52 巻、2017、551-556

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 大田剛広, 杉浦英志, 山田健志, 山田芳久, 筑紫聡, 浦川浩, 小澤英史, 生田国大, 濱田俊介, 石黒直樹, 西田佳弘、PVNS90 例における治療成績の検討。第 88 回日本整形外科学会学術総会、2015 年
2. 大田剛広, 杉浦英志, 山田健志, 山田芳久, 筑紫聡, 浦川浩, 小澤英史, 生田国大, 濱田俊介, 石黒直樹, 西田佳弘: 上腕部、前腕部軟部肉腫における治療成績

- の検討、第 48 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2015 年
3. 生田国大, 杉浦英志, 筑紫聡, 浦川浩, 小澤英史, 濱田俊介, 石黒直樹, 西田佳弘, 悪性末梢神経鞘腫瘍における治療成績と予後因子. 第 48 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2015 年
 4. 生田国大, 西田佳弘, 筑紫聡, 山田健志, 山田芳久, 浦川浩, 小澤英史, 濱田俊介, 今井礼子, 鎌田正, 石黒直樹, 骨・軟部肉腫に対する重粒子線治療成績の検討. 第 89 回日本整形外科学会学術総会、2016 年
 5. 大田剛広, 山田健志, 筑紫聡, 山田芳久, 浦川浩, 小澤英史, 生田国大, 濱田俊介, 石黒直樹, 西田佳弘, 骨巨細胞腫に対する手術治療成績の検討. 第 49 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2016 年
 6. 生田国大, 杉浦英志, 筑紫聡, 山田健志, 山田芳久, 浦川浩, 小澤英史, 濱田俊介, 石黒直樹, 西田佳弘, 骨・軟部腫瘍切除後の intercalary graft による加温処理骨再建の成績. 第 49 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2016 年
 7. 筑紫聡, 吉田雅博, 小澤英史, 鈴木周一郎, 西田佳弘, 高齢者の悪性骨軟部腫瘍に対する治療 高齢者軟部肉腫の治療成績. 第 129 回中部日本整形外科学会災害外科学会、2017 年
 8. 筑紫聡, 吉田雅博, 小澤英史, 鈴木周一郎, 西田佳弘, 上腕骨近位悪性骨腫瘍切除後の clavícula prohumero 法. 第 90 回日本整形外科学会学術集会、2017 年
 9. 小澤英史, 吉田雅博, 鈴木周一郎, 杉浦英志, 西田佳弘, 筑紫聡, 胸膜/胸膜外発生 solitary fibrous tumor の臨床的特徴. 第 50 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2017 年
 10. 筑紫聡, 吉田雅博, 小澤英史, 鈴木周一郎, 西田佳弘, 画像所見と組織学的所見からみた非円形軟部肉腫の安全な切除縁. 第 50 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2017 年
 11. 鈴木周一郎, 筑紫聡, 吉田雅博, 小澤英史, 大腿骨転移性骨腫瘍に対する手術方法の検討. 第 50 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2017 年
 12. 筑紫聡, 吉田雅博, 小澤英史, 林卓馬, 西田佳弘, 高齢者軟部肉腫の治療戦略. 第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017 年
 13. 小澤英史, 吉田雅博, 谷田部恭, 藤永一弥, 林卓馬, 筑紫聡, 肺原発性ユーイング肉腫ファミリー腫瘍の 1 症例. 第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017 年
 14. 林卓馬, 筑紫聡, 吉田雅博, 小澤英史, 坂倉 範昭, 石村大輔, 兵藤伊久夫, 坂

尾幸則、胸壁合併切除を要したがん患者の術後合併症の検討、第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017 年

15. 吉田雅博, 筑紫聡, 小澤英史, 林卓馬, 安藤正志, 山田健志, 骨軟部悪性腫瘍における Gemcitabine と Docetaxel 併用療法についての検討. 第 1 回サルコーマ治療研究学会学術集会、2018 年
16. 小澤英史, 吉田雅博, 林卓馬, 安藤正志, 水野美香, 室圭, 清水泰博, 谷田部恭, 小森康司, 本多和典, 筑紫聡, 進行性平滑筋肉腫の臨床的特徴. 第 1 回サルコーマ治療研究学会学術集会、2018 年

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤英史 (KOZAWA, Eiji)
愛知県がんセンター (研究所)・分子病態学部・研究員
研究者番号: 60635572

(2) 研究分担者

西田佳弘 (NISHIDA, Yoshihiro)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 50332698

浦川浩 (URAKAWA, Hiroshi)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号: 60584753

生田国大 (IKUTA, Kunihiro)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 40732657

濱田俊介 (HAMADA, Shunsuke)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 90747289

筑紫聡 (TSUKUSHI, Satoshi)
愛知県がんセンター (研究所)・腫瘍免疫学部・研究員
研究者番号: 90378109

(3) 連携研究者

()
研究者番号:

(4) 研究協力者

吉田雅博 (YOSHIDA, Masahiro)
林卓馬 (HAYASHI, Takuma)