

平成30年6月6日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11093

研究課題名(和文) がん幹細胞マーカー分子EpCAMの骨転移に対する機能的役割

研究課題名(英文) Functional roles of the cancer stem cell marker EpCAM in cancer bone metastasis

研究代表者

平賀 徹 (Hiraga, Toru)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70322170

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)：本研究では、がん細胞が発現する上皮細胞接着分子(EpCAM)の骨転移形成に対する役割を検討した。in vitroの解析においてEpCAM陽性細胞(EpCAMpos)と陰性細胞(EpCAMneg)はそれぞれ上皮系、間葉系形質を示した。また、EpCAMposからは継時的にEpCAMnegへの分化がみられた。EpCAMposは浮遊培養系でのsphere形成、マウス乳腺内移植での腫瘍形成、および骨転移形成がいずれもEpCAMnegと比較して亢進していた。これらの結果から、乳がん細胞におけるEpCAM発現は、がん幹細胞様形質と関連し、腫瘍形成能の亢進を介して骨転移形成を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we examined the roles of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in the development of cancer bone metastasis. EpCAM-negative (EpCAMneg) and EpCAM-positive (EpCAMpos) populations isolated from cancer cell lines exhibited mesenchymal and epithelial phenotypes, respectively. Flow cytometric analysis revealed that EpCAMpos, but not EpCAMneg, cells possessed self-renewal and differentiation potentials. Tumorsphere formation in vitro and tumorigenicity in the mammary fat pad of mice were significantly greater in EpCAMpos cells than in EpCAMneg cells. Furthermore, the development of bone metastases was markedly increased in mice inoculated with EpCAMpos cells. These results suggest that the expression of EpCAM in cancer cells is associated with cancer stem-like phenotypes, which contribute to the promotion of bone metastases by enhancing tumorigenicity.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：がん 骨転移 がん幹細胞 EpCAM

1. 研究開始当初の背景

がん患者を死に至らしめる最大の原因である転移のメカニズムの解明は、がん研究において最も重要な課題である。骨は肺、肝とならんでがんが最も転移しやすい臓器の一つである。がんの骨転移は、様々な合併症を引き起こし、患者の QOL を著しく低下させるのみならず、生命予後にも重大な影響を与える。にもかかわらず、骨転移に対する効果的な治療法は確立されていない。

近年、がん組織中には幹細胞様の性格を示す「がん幹細胞」が存在するとの概念が提唱されている。がん幹細胞は、「腫瘍内において、自己複製能と腫瘍を構成する様々な分化系統のがん細胞を生み出す能力を併せ持つ細胞」と定義されている。現在、がん幹細胞の同定・分離には数多くの分子がマーカーとして報告されている。これらのうち、Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM、上皮細胞接着分子)は複数のがん種において重要ながん幹細胞マーカーとして報告されている。

EpCAM は当初、その名の通り細胞接着分子として報告されたが、その後、細胞内シグナル伝達、遊走、増殖、分化、転移など多くの細胞機能に関与することが明らかにされている。また、多くのがん種において発現が認められており、EpCAM 高発現は予後不良因子の一つとされている。さらに、EpCAM は血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells, CTC) や播種性腫瘍細胞 (disseminated tumor cells, DTC) のマーカーの一つとしても臨床的に用いられている。CTC/DTC ががん幹細胞様の性質を示すことや、DTC が骨髄で高頻度に検出されることなどの知見から、「がん細胞の EpCAM 発現」、「がん幹細胞」、「骨転移」、の三者が密接に関連していることが示唆される。

以上の所見から、EpCAM ががん幹細胞の同定・分離のための単なるマーカーにとどまらず、骨転移の成立・進展に積極的に関与する機能分子として働くことが推測される。さらには、EpCAM が骨転移に対する効果的な治療法確立のための重要な標的となり得る可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、骨転移の成立・進展に対する EpCAM 陽性がん幹細胞の関与を明らかにすること、および、EpCAM を標的とした治療につながる知見を得ること、を目的として、「EpCAM が単なるがん幹細胞のマーカー分子ではなく、機能分子としてがんの骨転移に対し促進的に働く」という作業仮説に基づき、骨転移に対する EpCAM 陽性がん細胞の関与を分子、細胞、及び個体レベルで明らかにするために、以下の検討を行った。

- (1) 骨転移性がん細胞株の EpCAM 発現
- (2) EpCAM 低/高発現がん細胞の分離
- (3) EpCAM 低/高発現がん細胞の in vitro 性状解析
- (4) EpCAM 陽性がん細胞のがん幹細胞様形

質

- (5) EpCAM 陽性がん細胞の骨転移能
- (6) EpCAM 強制発現細胞株の樹立とその性状解析
- (7) EpCAM と細胞内シグナル

3. 研究の方法

- (1) 骨転移性がん細胞株の EpCAM 発現: 動物実験で骨転移能を有するがん細胞株 (骨転移性がん細胞株) の EpCAM 発現をフローサイトメトリーにて検討した。
- (2) EpCAM 低/高発現がん細胞の分離: マウス乳がん細胞株 Jyg-MC(A) および 4T1 から EpCAM 低/高発現それぞれの画分を Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) にて分離した。
- (3) EpCAM 低/高発現がん細胞の in vitro 性状解析: (2) の実験で分離した EpCAM 低/高発現細胞の性状について、位相差顕微鏡による細胞形態観察、real-time PCR による遺伝子発現解析、WST-8 assay による単層培養系での細胞増殖能解析、wound healing assay による細胞遊走能解析、matrigel invasion assay での細胞浸潤能解析により、比較検討した。
- (4) EpCAM 陽性がん細胞のがん幹細胞様形質: がん幹細胞様形質について、浮遊培養系での sphere 形成能、in vivo での腫瘍形成能、in vitro での分化能を指標に検討した。また、がん幹細胞マーカーの発現についても、フローサイトメトリーにて解析した。
- (5) EpCAM 陽性がん細胞の骨転移能: がん細胞の骨転移能については、マウス左室内移植モデルを用い検討した
- (6) EpCAM 強制発現細胞株の樹立とその性状解析: EpCAM 低発現がん細胞にレンチウイルスを用いて EpCAM 遺伝子を導入し、EpCAM 強制発現細胞株を樹立した。この細胞について、(3) の方法により性状解析を行った。
- (7) EpCAM と細胞内シグナル: EpCAM 発現と phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase、Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)、Wnt-beta-catenin 経路について western blot 法、または luciferase reporter assay にて検討した。

4. 研究成果

- (1) 骨転移性がん細胞株の EpCAM 発現: 骨転移性がん細胞株における EpCAM の発現レベルは様々であったが、多くの細胞株で陽性であった。
- (2) EpCAM 低/高発現がん細胞の分離: (1) の解析で Jyg-MC(A) と 4T1 という 2 種類のマウス乳がん細胞株中に EpCAM の発現レベルが明らかに異なる 2 つのポピュレーションが存在することを見出した。そして、これらの細胞株から EpCAM 低/高発現それぞれの画分を FACS にて分離することに成

- 功した。
- (3) EpCAM 低/高発現がん細胞の *in vitro* 性状解析: (2)の実験で分離した EpCAM 低/高発現細胞の性状について *in vitro* にて比較したところ、細胞形態および遺伝子発現から EpCAM 陽性細胞が上皮系、EpCAM 陰性細胞が間葉系形質を有することが示された。しかし、単層培養系での細胞増殖能、細胞遊走能、および細胞浸潤能においては両者の間に差は認められなかった。
- (4) EpCAM 陽性がん細胞のがん幹細胞様形質: EpCAM 陽性細胞は sphere 形成、およびマウス乳腺内移植での腫瘍形成が EpCAM 陰性細胞と比較して著明に亢進していた。また、単層培養系において、EpCAM 陽性細胞からは継時的に EpCAM 陰性細胞への分化がみられたが、一定の割合で EpCAM 陽性細胞は維持されていた。一方、EpCAM 陰性細胞から EpCAM 陽性細胞への分化は認められなかった。これらの結果から、EpCAM 発現がん幹細胞形質の発現と相関することが示唆された。しかし、乳がんのがん幹細胞マーカーとして広く知られている CD24、CD44 の発現については EpCAM 発現との関連は認められなかった。
- (5) EpCAM 陽性がん細胞の骨転移能: EpCAM 陽性細胞では骨転移形成の著明な促進が認められた。この結果をさらに検証するために、セルソーターによる分離を行っていない親細胞を移植し、2 週後に骨髄を回収し、骨転移がん細胞の EpCAM 発現をフローサイトメトリーにて検討した結果、転移細胞では親細胞と比較して EpCAM 陽性細胞の割合が高いことが示された。これらの結果から、EpCAM 陽性細胞が陰性細胞と比較して高い骨転移能を有することが示唆された。
- (6) EpCAM 強制発現細胞株の樹立とその性状解析: EpCAM 強制発現細胞株は細胞形態、遺伝子発現、sphere 形成、乳腺内での腫瘍増殖、および骨転移能など全ての検討項目において EpCAM 低発現がん細胞と比較して有意な差は認められなかった。よって、EpCAM 陽性細胞の形質発現には EpCAM 以外の分子が関与していることが示された。
- (7) EpCAM と細胞内シグナル: EpCAM が活性化に関与することが報告されている PI3 kinase や ERK、Wnt-beta-catenin 経路について検討したところ、EpCAM 低/高発現細胞の間に差は認められなかった。よって EpCAM 陽性細胞の骨転移亢進メカニズムに関与する細胞内シグナルについては、今後更なる検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Makoto Tanaka, Akihiro Hosoya, Hiroshi Mori, Ryoji Kayasuga, Hiroaki Nakamura, Hidehiro Ozawa. Minodronic acid induces morphological changes in osteoclasts at bone resorption sites and reaches a level required for antagonism of purinergic P2X2/3 receptors. *J Bone Miner Metab* 36:54-63, 2018. DOI: 10.1007/s00774-017-0814-y 査読有

Hiroki Wakabayashi, Satoshi Wakisaka, Toru Hiraga, Kenji Hata, Riko Nishimura, Makoto Tominaga, Toshiyuki Yoneda. Decreased sensory nerve excitation and bone pain associated with mouse Lewis lung cancer in TRPV1-deficient mice. *J Bone Miner Metab (in press)* DOI: 10.1007/s00774-017-0842-7 査読有

Kanji Horibe, Akihiro Hosoya, Toru Hiraga, Hiroaki Nakamura. Expression and localization of CRAMP in rat tooth germ and during reparative dentin formation. *Clin Oral Invest (in press)* DOI: 10.1007/s00784-018-2353-x 査読有

Toru Hiraga, Tadashi Ninomiya. Establishment and characterization of a C57BL/6 mouse model of bone metastasis of breast cancer. *J Bone Miner Metab (in press)* DOI: 10.1007/s00774-018-0927-y 査読有

Yohsuke Yoshioka, Eiki Yamachika, Makoto Nakanishi, Tadashi Ninomiya, Kazuki Nakatsuji, Masakazu Matsubara, Norifumi Moritani, Yasuhiro Kobayashi, Tatsuo Fujii, Seiji Iida. Molecular alterations of newly formed mandibular bone caused by zoledronate. *Int J Oral Maxillofac Surg (in press)* DOI: 10.1016/j.ijom.2018.02.002. 査読有

Anna Karolina Kozłowska, Paytsar Topchyan, Kawaljit Kaur, Han-Ching Tseng, Antonia Teruel, Toru Hiraga, Anahid Jewett. Differentiation by NK cells is a prerequisite for effective targeting of cancer stem cells/poorly differentiated tumors by chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *J Cancer* 8: 537-554, 2017. DOI: 10.7150/jca.15989 査読有

Mengyu Yang, Atsushi Arai, Nobuyuki Udagawa, Toru Hiraga, Zhao Lijuan, Susumu Ito, Toshihisa Komori, Takeshi Moriishi, Koichi Matsuo, Kouji Shimoda, Ali H. Zahalka, Yasuhiro Kobayashi, Naoyuki Takahashi, Toshihide Mizoguchi. Osteogenic factor Runx2 marks a subset of leptin receptor-positive cells that sit atop the bone marrow stromal cell hierarchy. *Sci Rep* 7: 4928, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-05401-1 査読有

Yuki Ozaki, Masanori Koide, Yuriko

Furuya, Tadashi Ninomiya, Hisataka Yasuda, Midori Nakamura, Yasuhiro Kobayashi, Naoyuki Takahashi, Nobuo Yoshinari, Nobuyuki Udagawa. Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. PLoS One, 12:e0184904, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0184904 査読有

Akira Yukita, Miroku Hara, Akihiro Hosoya, Hiroaki Nakamura. Relationship between localization of proteoglycans and induction of neurotrophic factors in mouse dental pulp. J Oral Biosci 59:31-37, 2017. DOI: 10.1016/j.job.2016.10.001 査読有

Akihiro Hosoya, Akira Takahama, Hiroaki Nakamura. Localization of RELM- α /FIZZ2 is associated with cementum formation. Anat Rec 300:1865-1874, 2017. DOI: 10.1002/ar.23636 査読有

Yuko Nakamichi, Nobuyuki Udagawa, Kanji Horibe, Toshihide Mizoguchi, Yoko Yamamoto, Takashi Nakamura, Akihiro Hosoya, Shigeaki Kato, Tatsuo Suda, Naoyuki Takahashi. VDR in osteoblast-lineage cells primarily mediates Vitamin D treatment-induced increase in bone mass by suppressing bone resorption. J Bone Miner Res 32:1297-1308, 2017. DOI: 10.1002/jbmr.3096 査読有

Michiko Nakatsuka, Akihiro Hosoya, Koichiro Jin, Ji-Youn Kim, Satoshi Fujita, Hironori Akiyama, Shoko Gamoh, Shunji Kumabe. Induced differentiation of rat periodontal ligament-derived cells using growth factor cocktail. J Dent Oral Health 3:96, 2017. DOI: なし
<http://scionline.org/fulltext/induced-differentiation-of-rat-periodontal-ligament-derived-cells-using-growth-factor-cocktails/21639> 査読有

Toru Hiraga, Susumu Ito, Hiroaki Nakamura. EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation. Int J Cancer 138: 1698-1708, 2016. DOI: 10.1002/ijc.29921 査読有

Toru Hiraga. Targeted agents in preclinical and early clinical development for the treatment of cancer bone metastases. Expert Opin Investig Drugs 25: 319-334, 2016. DOI: 10.1517/13543784.2016.1142972 査読有

Toru Hiraga, Hiroaki Nakamura. Comparable roles of CD44v8-10 and CD44s in the development of bone metastases in a mouse model. Oncol Lett 12: 2962-2969, 2016. DOI:

10.3892/ol.2016.4985 査読有

Yoshimi Shigetani, Naoto Ohkura, Kunihiro Yoshiba, Hayato Ohshima, Akihiro Hosoya, Nagako Yoshiba, Takashi Okiji. GaAIs laser-induced pulp mineralization involves DMP1 and osteopontin expression. Oral Dis 22: 399-405, 2016. DOI: 10.1016/j.joen.2011.09.016 査読有

Akihiro Hosoya, Hiroaki Nakamura. Ability of stem and progenitor cells in the dental pulp to form hard tissue. Jpn Dent Sci Rev 51: 75-83, 2015 DOI:10.1016/j.jdsr.2015.03.002 査読有

Nagako Yoshiba, Kunihiro Yoshiba, Naoto Ohkura, Erika Takei, Naoki Edanami, Youhei Oda, Akihiro Hosoya, Hiroaki Nakamura, Takashi Okiji. Correlation between Fibrillin-1 degradation and mRNA downregulation and myofibroblasts differentiation in cultured human dental pulp tissue. J Histochem Cytochem 63: 438-48, 2015 DOI: 10.1369/0022155415580622 査読有

平賀 徹. 固形癌骨転移の成立・進展の新しい基礎的知見. Surgery Frontier 22: 23-7, 2015 査読無

〔学会発表〕(計 35 件)

平賀 徹 Bisphosphonate の抗がん作用: 2017 Update 第 16 回松本ポーンフォーラム 2017 年

Toru Hiraga、Hiroaki Nakamura. Functional comparison between CD44s and CD44v8-10 in cancer metastasis to bone. American Society for Bone and Mineral Research 2017 2017 年

平賀 徹 がん骨転移形成における CD44v8-10 と CD44s の機能比較 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 2016 年

平賀 徹 EpCAM は乳がん細胞の癌幹細胞様および上皮細胞様形質の発現を介し骨転移を促進する 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年

平賀 徹 がん幹細胞 - 骨髄ニッチ間相互作用を介した骨転移機構 第 19 回癌と骨病変研究会 2016 年

平賀 徹, 中村浩彰 EpCAM は乳がん細胞の癌幹細胞様および上皮細胞様形質の発現を介し骨転移を促進する 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 2015 年

平賀 徹 がん骨転移のメカニズム: 骨微小環境と転移がん細胞 第 24 回日本がん転移学会学術集会 2015 年

Toru Hiraga, Susumu Ito, Hiroaki Nakamura. EpCAM promotes bone metastases of breast cancer by conferring cancer stem-like and epithelial properties. American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting 2015 年

〔図書〕(計1件)

平賀 徹、技術情報協会、痛みのメカニズムと疼痛治療薬開発、2015、総ページ数580、p143-147

6. 研究組織

(1)研究代表者

平賀 徹(HIRAGA, Toru)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号:70322170

(2)研究分担者

細矢 明宏(HOSOYA, Akihiro)
北海道医療大学・歯学部・准教授
研究者番号:70350824

二宮 禎(NINOMIYA, Tadashi)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号:00360222