

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15202

研究課題名(和文) がんの骨転移に対して画期的な治療効果をもたらすエピゲノム創薬の研究

研究課題名(英文) Effect of DNA methylation inhibition on cancer metastasis

研究代表者

西川 恵三 (Nishikawa, Keizo)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：30516290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筆者らが発見したDNAメチル基転移酵素に対する阻害剤TF3を活用することで、がん細胞の骨転移に対する抑制効果を解析することを目的とする。これら治療実験を端緒に、破骨細胞のエピジェネティック制御を標的とした骨転移治療の有効性を明らかにすることで、破骨細胞のエピゲノム創薬をがん治療のための新たな基盤研究として発展させることを目標に掲げる。

研究成果の概要(英文)：We recently demonstrated that a novel inhibitor of DNA methylation, TF3, has the inhibitory effect on osteoclast differentiation, and further demonstrated that TF3 is a promising drug candidate for the treatment of osteoporosis. Several cancers that metastasize to bone negatively perturb the remodeling process through a series of interactions with osteoclasts. These interactions have been described as the "vicious cycle" of cancer metastasis in bone. In this study, we investigated the effect of perturbation of osteoclastogenesis by TF3 on cancer bone metastasis. An experimental bone metastasis model was developed by injecting mice with murine melanoma B16BL6 cells. Using the mice model, we found that TF3 has the inhibitory effect on B16BL6 cell metastasis in bone. These results suggest that TF3 is a promising drug candidate for cancer bone metastasis.

研究分野：生化学

キーワード：Osteoclast DNA methylation Dnmt3a Epigenetics metastasis Bone Cancer

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、日本における死因のトップであるが、がんによる重症化の要因の一つに遠隔転移がある。がんの転移には臓器特異性があり、近年、罹患者数が増加している前立腺がんや乳がんは、骨への転移能が極めて高い。がんの骨転移の進行には、骨吸収を司る破骨細胞とがん細胞との間で、相互に活性を増強し合う悪循環がかかわる。従って、破骨細胞を標的とした創薬は、がんの骨転移を抑える薬の開発において重要な位置づけにある。

申請者は、近年、破骨細胞分化における DNA メチル化制御の重要性を見出した研究成果を端緒にして、新たに探索した DNA メチル基転移酵素の阻害剤 TF3 が、破骨細胞形成を抑制することで骨粗鬆症病態を改善する効果をもつことを実証した (*Nature Medicine* 21, 281-7, 2015)。

## 2. 研究の目的

本研究では、がん細胞の骨転移モデルマウスを用いて、DNA メチル基転移酵素の新規阻害剤 TF3 ががん細胞の骨転移に対して治療効果をもつかどうかを検討することを目的とする。これら治療実験を端緒に、破骨細胞のエピジェネティック制御を標的とした骨転移治療の有効性を明らかにすることで、破骨細胞のエピゲノム創薬をがん治療のための新たな基盤研究として発展させることを目標に掲げる。

## 3. 研究の方法

以下の3点の研究計画を実施した。

### (1) TF3 を用いた DNA メチル基転移酵素の阻害実験

哺乳類においては、DNA メチル基転移酵素は3つのパラログ(Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b)が同定されている。そこで、各 DNA メチル基転移酵素に対する TF3 の阻害効果を検討するために、各 DNA メチル

基転移酵素の組み換えタンパク質を用いて、in vitro のメチル化アッセイを試みた。そして、当該アッセイ系に TF3 を添加することで、各 DNA メチル基転移酵素の DNA メチル化活性に対する阻害効果を比較した。

### (2) 骨転移モデルマウスの作出と TF3 を用いた治療実験

マウス悪性黒色腫細胞(B16BL6 細胞)を左心室に  $10^5$  細胞移植を行い、2週間後に骨組織を解析し、がん細胞の骨への生着の是非を解析した。実際には、骨組織のマイクロCT( $\mu$ CT)解析や脱灰骨の病理組織標本を用いることで解析を行った。さらに、当該マウスに対して TF3 の経日投与を行うことで、がんの骨転移に対する TF3 の治療効果を検討した。

### (3) 腫瘍モデルの作製と TF3 抗腫瘍効果の検討

アザシチジン化合物は、DNA メチル化制御の阻害剤として汎用され、近年では、抗がん剤として既に上市されている。そこで、TF3 の抗腫瘍効果の是非を検討した。B16BL6 細胞を皮下移植後、TF3 の経日投与を行うことで、抗腫瘍効果の是非を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) TF3 を用いた DNA メチル基転移酵素の阻害実験

TF3 はいずれの DNA メチル基転移酵素に対しても酵素活性を抑制する効果をもつことが明らかとなった。しかし、TF3 は、Dnmt1 と比べて、Dnmt3a および Dnmt3b に対してより高い阻害効果をもつことが明らかとなった(図1)。以上の結果から、TF3 は Dnmt3 に対して特異的な阻害剤であることが考えられる。

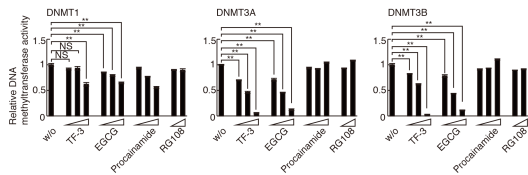


図1 DNAメチル基転移酵素の酵素活性に対する阻害実験

## (2)骨転移モデルマウスの作出と TF3 を用いた治療実験

B16BL6 細胞を移植後に骨組織を観察したところ、悪性黒色腫細胞が骨に生着した病態が観察された。そこで、当該骨転移モデルマウスに対して TF3 の経日投与を行った。その結果、TF3 投与群においては、骨組織内の B16BL6 細胞の数が有意に減少する結果が得られた(図 2)。以上の結果から、がんの骨転移に対して、

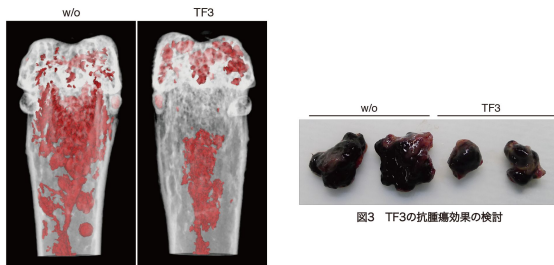


図2 がんの骨転移モデルに対するTF3の治療効果

DNA メチル基転移酵素は有効な創薬標的となることが示唆される。

## (3)腫瘍モデルの作製と TF3 抗腫瘍効果の検討

TF3 非投与群においては、顕著な腫瘍増大が観察された。一方、TF3 投与群においては、腫瘍増大が有意に軽減されることが明らかとなった(図 3)。以上の結果から、TF3 は、がんの骨転移抑制に加えて、抗腫瘍効果をあわせもつことが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Sakaguchi Y, Nishikawa K, Seno S, Matsuda H, Takayanagi H and Ishii M, Roles of enhancer RNAs in RANKL-induced osteoclast differentiation identified by

genome wide cap analysis of gene expression using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports* 14, 7504, 2018.

## \*Corresponding author

2. Baba M, Endoh M, Ma W, Toyama H, Hirayama A, Nishikawa K, Takubo K, Hano H, Hasumi H, Umemoto T, Hashimoto M, Irie N, Esumi C, Kataoka M, Nakagata N, Soga T, Yao M, Kamba T, Minami T, Ishii M and Suda T, Foliculin regulates osteoclastogenesis through metabolic regulation. *Journal Bone and Mineral Research in press*.
3. Iwamoto Y, Nishikawa K, Imai R, Furuya M, Uenaka M, Ohta Y, Morihana T, Itoi-Ochi S, Penninger JM, Katayama I, Inohara H and Ishii M, Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction. *Molecular and Cellular Biology* 36, 1610-20, 2016.

## 〔学会発表〕(計 16 件)

1. 西川恵三、画期的な骨粗しょう症の予防・治療を目指した機能性食品開発につながる基礎研究、BioJapan2017 バイオインダストリー奨励賞受賞講演 横浜 2017年 10月 11日
2. 西川恵三、破骨細胞の代謝リプログラミングの重要性、第 45 回日本臨床免疫学会総会 東京 2017年 9月 29日 予定
3. 西川恵三、破骨細胞の代謝制御と創薬応用、第 59 回 歯科基礎医学会

- 学術大会 松本 2017年9月18日
4. 西川恵三、細胞内代謝を介した破骨細胞制御の研究、第35回日本骨代学会学術集会 奨励賞受賞講演 福岡 2017年7月28日
  5. 西川恵三、細胞内代謝を介した新たな破骨細胞制御の解明と創薬応用、第7回 SENRI の会 大阪 2017年1月13日
  6. 西川恵三、骨髄内酸素環境に適応するための破骨細胞制御機構の実体、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム 横浜 2016年11月30日
  7. 西川恵三、破骨細胞のエピジェネティクスの研究と創薬への応用、第46回アステラス病態代謝研究報告会 東京 2016年10月15日
  8. 西川恵三、破骨細胞制御における一炭素単位転移の役割、第31回日本整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム 福岡 2016年10月13日
  9. 西川恵三、骨粗鬆症の予防・治療を可能にする食品由来機能性化合物の解析、第2回ロッセ財団若手研究者の集い 東京 2016年9月5日
  10. 西川恵三、SAM のイメージング、第12回生体イメージング研究会 京都 2016年8月8日
  11. 西川恵三、破骨細胞のライブイメージングの現状、第1回イメージング・プローブ技術セミナー (新学術領域研究酸素生物学主催) 京都 2016年8月3日
  12. 西川恵三、骨代謝制御における1炭素単位転移反応の重要性、第37回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 京都 2016年6月17日
  13. 西川恵三、破骨細胞の代謝リプログラミングの役割の研究、第68回日本細胞生物学会 ワークショップ 京都 2016年6月16日
  14. 西川恵三、転写代謝を介した新たな骨代謝制御の解明と創薬応用、同志社大学 第3回遺伝情報セミナー 京都 2016年6月10日
  15. 西川恵三、骨髄内酸素環境に対する応答システムとしての一炭素単位転移の役割、酸素生物学班会議 東京 2016年5月28日
  16. 西川恵三、画期的な骨粗しょう症の予防・治療につながる機能性食品の探索と利用法の研究、三島海雲学術賞選考会 東京 2016年4月8日
- [ 図書 ] (計 10 件)
1. Sakaguchi Y and Nishikawa K Generation of mice carrying reporter for live bone imaging *Clinical Calcium* 28 201-210, 2018.
  2. Nishikawa K Immunometabolism: the role of metabolic reprogramming in macrophage lineage cells *Japanese Journal of Clinical Immunology* 40 1-7, 2017.
  3. 西川恵三 マクロファージの代謝リプログラミングと制御 **マクロファージのすべて (松島綱治 編集)** 259, 389-396, 2016.
  4. Kikuta J, Nishikawa K and Ishii M Macrophage dynamics during bone resorption and chronic inflammation *Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation* (Masayuki Miyasaka and Kiyoshi Takatsu edition) 2016 133-145.
  5. 西川恵三 フードケミカルエピジェ

ネティクスによる骨粗鬆症予防～紅茶成分テアフラビンが DNA メチル化制御を抑制する～ **実験医学** 35, 114-6, 2016.

6. 西川恵三 海外文献紹介 *The Bone* 30, 2016.
7. 阪口友香子、西川恵三 注目の海外文献 *Clinical Calcium* 26, 100-101, 2016.
8. Keizo Nishikawa Elucidation of the role of metabolic reprogramming in osteoclast differentiation *Clinical Calcium* 26, 713-719, 2016.
9. 西川恵三、石井優 細胞内代謝を基軸とした新たな破骨細胞制御 **医学のあゆみ** 257, 1328-29, 2016.
10. 西川恵三 代謝リプログラミングを基軸とした破骨細胞分化制御 *Osteo Lipid Vascular&Endocrinology* 6, 24-27, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西川 恵三 (NISHIKAWA KEIZO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：30516290

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし