

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04405

研究課題名(和文) 癌骨破壊病変の癌関連線維芽細胞とマスト細胞との相互作用による骨吸収機構の解析

研究課題名(英文) The relationship between cancer-associated fibroblast and mast cell on the osteolysis of cancer induced bone disease

研究代表者

佐々木 朗 (Sasaki, Akira)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00170663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌の骨浸潤や骨転移の骨破壊には、破骨細胞性骨吸収が重要な役割を果たす。その機序に癌骨破壊病変の骨微小環境に存在する癌関連線維芽細胞(B-CAF)が重要な役割を果たす。一方、免疫細胞であるマスト細胞は癌の血管新生や基質分解、疼痛に関わる炎症性物質の産生など多彩な機能を果たすことが知られている。本研究ではB-CAFとマスト細胞の相互作用による骨破壊機構について検討した。その結果、癌骨微小環境でマスト細胞は誘導され、その産生因子は直接的に破骨細胞形成骨吸収を促進するのみならず、B-CAFに対して骨吸収や基質分解、血管新生などを促進し相互作用を介して骨破壊に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現有の骨破壊病変に対する骨吸収阻害薬は顎骨壊死を誘発する問題があり、新たな戦略が必要である。マスト細胞が癌の進展や血管新生に関わることは知られているが、癌の骨破壊における癌関連線維芽細胞(B-CAF)とマスト細胞の相互機構に注目した報告は殆どない。研究成果は、B-CAFを標的とした新規治療の開発であり、骨微小環境でのマスト細胞の役割や局所環境でのB-CAFの応答遺伝子の探索は創薬研究の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Osteoclastic bone resorption plays an important role in bone invasion of cancer and bone destruction of bone metastases. Cancer-associated fibroblasts (B-CAF) present in the bone microenvironment of cancer bone-destructive lesion play an important role in the mechanism. On the other hand, mast cells, which are immune cells, are known to perform various functions such as angiogenesis of cancer, matrix degradation, and production of inflammatory substances related to pain. In this study, we investigated the mechanism of bone destruction by the interaction between B-CAF and mast cells. As a result, mast cells are induced in the cancer bone microenvironment, and their production factors not only directly promote osteoclastogenic bone resorption, but also induce bone resorption, matrix degradation, angiogenesis, etc. for B-CAF. It was suggested to be involved in bone destruction through facilitation and interaction.

研究分野：外科系歯学

キーワード：マスト細胞 癌骨破壊病変 癌関連線維芽細胞 血管新生 口腔扁平上皮癌 破骨細胞 骨浸潤 ケミカルメディエーター

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の骨浸潤・骨破壊には、破骨細胞性骨吸収が重要な役割を果たす。申請者はある種の血管新生因子の抑制は、血管新生のみならず破骨細胞性骨吸収を抑制し、癌の骨破壊を制御することを明らかにしてきた。またその機序に癌骨破壊病変の骨微小環境の癌関連線維芽細胞(bone-cancer associated fibroblast: B-CAF)が重要な役割を果たすと考えられる。一方、免疫細胞であるマスト細胞は癌の血管新生や基質分解、疼痛に関わる炎症性物質の産生など多彩な機能を果たすことが知られている。申請者は B-CAF と血管新生の関連を検討するなかで B-CAF に高発現する遺伝子群にマスト細胞の関与を示唆する結果を見いだしているが、癌骨微小環境における B-CAF とマスト細胞の相互機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

癌の骨浸潤や癌転移など癌の骨破壊病変の制御は臨床上、機能温存や患者の QOL を維持する上で重要な課題である。現在、デノスマブのように癌の骨破壊機構に基盤とした分子標的薬が開発され臨床応用されてきている。本研究では癌の骨破壊病変における B-CAF を舞台に繰り広げられるマスト細胞の骨微小環境における血管系、骨吸収系、神経系、腫瘍との相互的役割を検討し、骨微小環境における B-CAF を中心とした癌の骨破壊機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 癌関連線維芽細胞 (CAF: cancer association fibroblast) を作製するために、通法に従いマウス真皮由来の線維芽細胞株 3T6 とヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS を用いてトランスウェル法を使用して検証した。6well の 2 層のトランスウェル培養シャーレの上段に (SAS), 下段に (3T6) 播種して共存細胞培養を行い、メディアムを共有した状態で 3 日間培養した線維細胞を CAF (SAS+3T6 共培養) とした。3T6 が CAF となったかどうかに関しては、CAF のマーカーとして知られる α -SMA (smooth muscle actin) を用いてウエスタンブロッティングにより検討した。また一部の研究は、BALBc-nu/nu マウス脛骨骨髓腔内に口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 を移植し、1 週間後にマウスを屠殺、脛骨骨膜ならびに骨髓細胞を摘出した細胞を熱感受性細胞接着培養容器 (Up Cell) にて培養し、一時的に温度を低下させ、剥離した間葉系細胞を B-CAF として使用した。

2) 破骨細胞形成誘導に対する炎症性サイトカインならびにマスト細胞の影響

スクリーニングとしては、4~8 週令の C57Black マウスの脛骨・大腿骨から骨髓を採取し α -MEM (10ng/ml, M-CSF 添加) で 1 日培養後、浮遊細胞を回収し 48 穴のプレートに 4×10^5 個ずつ播種した。30ng/ml の M-CSF と 50ng/ml の Receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL) をコントロール以外のすべての培養液に添加した。培養上清 (CM) や各種ケミカルメディエーターなどの検討は目的にあわせて濃度を設定して添加した。形成された破骨細胞は酒石酸抵抗性酸フラスファターゼ (TRAP) 染色により、TRAP 陽性多形核細胞を指標に確認した。

3) 遺伝子の解析については、破骨細胞形成誘導の検証の結果、その誘導能が高く、またマスト細胞から分泌量が高い PGE2 ならびに MIP1 α 、マスト細胞腫 P815 細胞の CM、コントロールのそれぞれをヒト線維芽細胞初代培養株 (PCS-460-010) に添加した。それぞれの遺伝子応答を検討するために 24 時間後に RNeasy Mini Kit(Qiagen, USA) を用いて mRNA を回収し、DNA micro array (Agilent, Tokyo) を用いて網羅的に遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

1) マスト細胞の脱顆粒の影響: 4 週令 C57/Black マウス骨髓細胞を flush し CD11b 抗体でネガティブソーティングを行なった細胞を IL-3 で刺激することでマスト細胞を誘導した。同細胞 Neuron Growth Factor (NGF) にて刺激したのちに細胞内の IL-6, VEGF, PGE2 タンパク量を検討したところ、細胞内の IL-6, VEGF はコントロール細胞と比較し減少していた。これはマスト細胞が NGF 刺激により脱顆粒することによって細胞内の増殖因子が放出したことを示唆する。B-CAF 細胞 (骨由来癌関連線維芽細胞) についても検討を行った。BALBc-nu/nu マウス脛骨骨髓腔内に口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 を移植し、1 週間後にマウスを屠殺、脛骨骨膜ならびに骨髓細胞を摘出した。摘出した細胞を熱感受性細胞接着培養容器 (Up Cell) にて培養し、一時的に温度を低下させ、剥離した間葉系細胞を B-CAF として発現遺伝子にマイクロアレイ検索で NGF の発現が増強しておりマスト細胞の脱顆粒に関与していることが示唆された。

2) 癌関連線維芽細胞とマスト細胞の骨吸収作用の比較検討: マスト細胞株 P815 (マスト細胞腫), 3T6 (線維芽細胞株), SAS (口腔扁平上皮癌細胞株), B-CAF (SAS と 3T6 共培養) より培養上清 (CM) を用意し、BALB/c-nu/nu マウス脛骨・大腿骨から骨髓を採取し α -MEM (10ng/ml, M-CSF 添加) で一日培養後、浮遊細胞を回収し、30ng/ml の M-CSF と 50ng/ml の RANKL をコントロール以外のすべてのメディアムに添加した破骨細胞形成系に対して CM が

30% ずつの濃度になるように、それぞれの CM を添加し破骨細胞形成を TRAP 染色により確認した。P815 (CM) 群, SAS (CM) 群では破骨細胞の誘導促進を認めた。3T6 (CM) 群, CAF (CM) 群では差は認めなかった。以上の結果は、癌骨破壊病変の局所環境において骨吸収系を誘導するのは主に癌細胞ならびにマスト細胞から産生される因子の可能性が考えられたが、マスト細胞については、既知の因子について検討を行い、B-CAF の培養上清については、単独では破骨細胞の誘導は強く結果となったため、マスト細胞との相互作用が必要な可能性が示唆された。それについてはマイクロアレイ検索を行った。

3) マスト細胞の各種産生因子による破骨細胞形成誘導の検討:

マスト細胞 (P815 細胞) が脱顆粒や産生によって放出されるヒスタミン等のケミカルメディエーターや産生因子のなかで、どの物質が破骨細胞誘導を促進しているか確認するために、ヒスタミン, PGE2, IL-3, IL-6, MIP1 α のリコンビナントタンパクを用い、ヒスタミン, PGE2, IL-3, IL-6, MIP1 α をそれぞれ 25ng/ml の濃度で添加し 5 日後に破骨細胞の形成を確認した。IL-6, PGE2, MIP1 α , ヒスタミンの順でコントロール群と比較して破骨細胞様の TRAP 陽性多形核細胞の形成促進を認めたが IL-3 では差を殆ど認めなかった。

4) 免疫組織化学的検証: ヒト下顎歯肉扁平上皮癌の手術標本を使用し、マスト細胞のマーカである ENPP, PDGFR, c-kit の免疫染色を行ったところ、図 1A で示すようマスト細胞成長因子として知られる c-Kit は腫瘍の粘膜側ではほとんど発現していなかったが、深部進展に伴い発現強度が増加し、癌の骨吸収界面においては骨芽細胞、破骨細胞周囲の間質細胞に強い発現を認めた (図 1B)。

さらに ENPP は骨界面の脂肪、間質細胞に発現することが明らかになった。さらに PDGFR 陽性細胞は腫瘍全体に散在し存在することが明らかになり、マスト細胞が骨破壊病変に影響を与えることが示唆された。

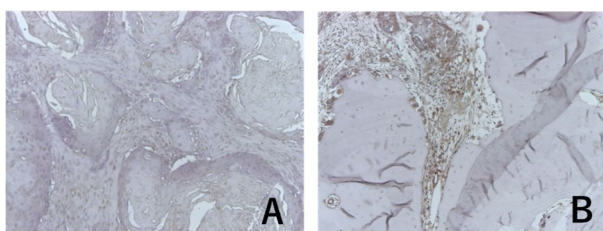


図1: c-Kit の免疫組織学的染色所見

5) マイクロアレイの GO 解析, Pathway 解析の結果

マスト細胞の培養上清が骨内の線維芽細胞の腫瘍増殖因子産生を介して骨微小環境内の細胞に与える影響を検討するため、ヒト初代培養線維芽細胞に P815 マスト細胞株の培養上清ならびにマスト細胞産生因子 PGE2, MIP1 α を添加し mRNA を回収し DNA アレイにて遺伝子解析を行った。マスト細胞培養上清添加により線維芽細胞における遺伝子発現変化を認めた。

近年、腫瘍近傍の線維芽細胞が破骨細胞誘導を促進することが明らかになりつつある。本検討においてもマスト細胞培養上清による刺激により線維芽細胞における最も重要な破骨細胞誘導因子である (RANKL 発現が増強し、また RANKL のデコイレセプターであり中和抗体としての機能を有する osteoprotegerin (OPG) 発現が減少しており線維芽細胞が誘導する破骨細胞形成はマスト細胞により誘導されることが示唆された (図 2)。

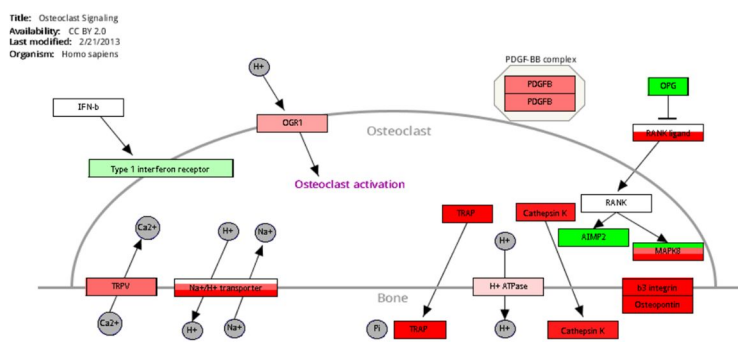


図2: 破骨細胞性シグナルへの影響

マスト細胞による刺激は線維芽細胞における TGF- β , TNF の発現を著明に増強させ、骨微小環境における腫瘍細胞の増殖能、転移能等の表現系に影響を与えることが示唆された (図 3 は TNF pathway 解析結果のみ示す)。

さらに血管新生誘導を促進し血管透過性を増加させる VEGFA や MMP ファミリー発現は MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 全てで増強しており、マスト細胞が線維芽細胞のこれらの因子発現を介して、骨

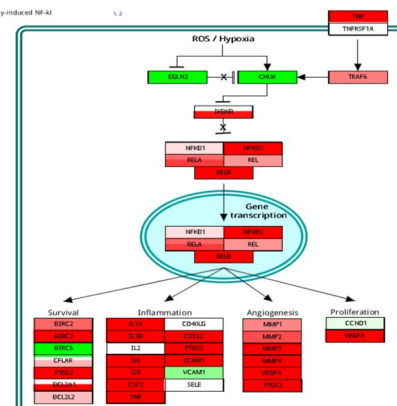


図3: TNFシグナル系への影響

破壊病変における腫瘍進展を促進することが示唆された。またこれらの因子は腫瘍の低酸素状態における解糖系を介した代謝経路への移行を促進することが知られており、高悪性腫瘍の抗がん剤抵抗性にも影響を与えることが示唆された。

マスト細胞が線維芽細胞に分子生物学的な影響を与えることが明らかになった。マスト細胞は脱顆粒によって種々のサイトカイン、因子を放出するがその引き金になるのはプロスタグランジン(PGE)である。興味深い事に PGE による刺激は線維芽細胞の PGE2 受容体の発現を正に制御し、さらに PGE 合成酵素、PTGS1(COX1)、PTGS2(COX2)といったプロスタグランジン合成に必須である因子の発現を正に制御することによりプロスタグランジン産生系の経路を刺激することが明らかになった。この結果は PGE の刺激自体が PGE 産生のポジティブフィードバックを誘発することを示唆している。

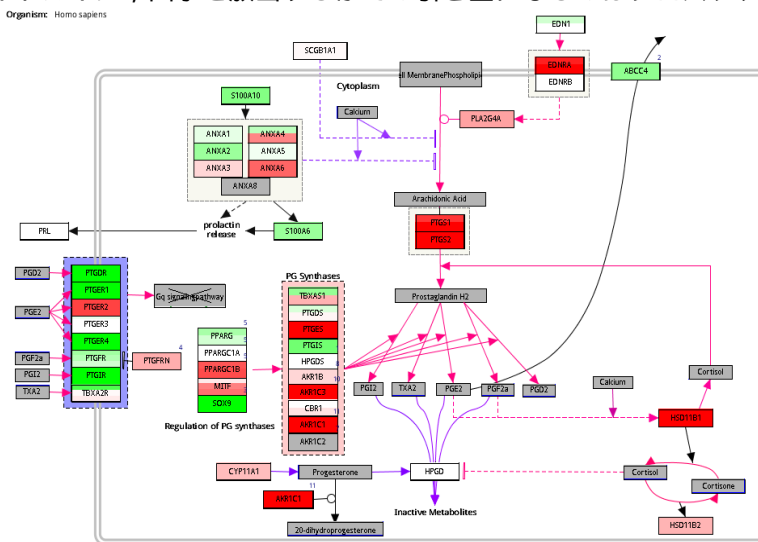


図 4 : PGE シグナル系への影響

以上の結果から、マスト細胞は、産生するケミカルメディエーターや脱顆粒により放出される PGE や MIP1 α 等を介して B-CAF と相互作用を起こしながら骨微小環境において骨吸収のみならず癌の進展に促進的に働くことが推察された。アラキドン酸を含むプロスタノイドと呼ばれる PGE などの生理活性物質の一群の代謝過程に関与するシクロオキシゲナーゼは COX 阻害薬により阻害され血管新生阻害などの報告もあり、癌の骨破壊病変においてもマスト細胞を標的とした治療の可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryumon S., Okui T.,Kunisada Y., Kishimoto K., Shimo T., Hasegawa K., Ibaragi S., Akiyama K., Thi Thu Ha N., Hassan NMM., Sasaki A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Ammonium trrathiomolybdate enhances the anti tumor effect of cisplatin via the suppression of ATPase copper transporting beta in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2611-2621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2019.7367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	岸本 晃治 (Kishimoto kouji) (40243480)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	志茂 剛 (Shimo Tsuyoshi) (40362991)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	
研究分担者	奥井 達雄 (Okui Tatsuo) (40610928)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	
研究分担者	吉岡 徳枝 (Yoshioka Norie) (50362984)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

