

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390516

研究課題名（和文）血管新生因子 *angiogenin* を分子標的とした癌の骨破壊制御に関する基礎的検討研究課題名（英文）Investigation of mechanism of angiogenesis factor, *angiogenin*, as a molecular target against cancer-induced bone destruction

研究代表者

佐々木 朗 (SASAKI AKIRA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00170663

研究成果の概要（和文）：破骨細胞性骨吸収は癌の骨浸潤や骨転移に重要な役割を果たす。我々は骨吸収機序と血管新生との関連を示してきた。本研究では血管新生因子 *angiogenin* (ANG) を分子標的とした癌の骨破壊に対する治療の有用性、制御機構の解析を行った。その結果、癌細胞の ANG 発現を抑制によるマウス癌骨破壊モデルにおける有用性ならびに ANG が破骨細胞性骨吸収を促進することがわかり、ANG を分子標的とした治療法が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Osteoclastic bone resorption plays an important role on cancer-induced bone diseases like bone metastases or cancer bone invasion. We have been previously demonstrated that the interaction between angiogenesis and osteoclastic bone resorption. In the present study, we examined the *Angiogenin* (ANG) is and has been shown to play a role in both tumor angiogenesis and cancer cell proliferation during cancer development. Osteolytic bone invasion in nude mice model was suppressed by ANG RNAi transfection. Moreover, ANG stimulated osteoclast formation and activity in bone marrow culture system. These results suggest that ANG could be a molecular target for cancer-induced osteolysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	6,700,000	2,010,000	8,710,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：血管新生因子, *angiogenin*, 骨破壊, 骨浸潤, 破骨細胞, 口腔扁平上皮癌,

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔領域悪性腫瘍の顎骨への骨浸潤、骨破壊はしばしば認められ、予後を左右する大きな負の要因となっており、その制御は臨床上極めて重要な課題である。癌の骨への浸潤・増殖は、癌により誘発された破骨細胞が活発に骨吸収を起こし、骨吸収によって生じた部分に腫瘍が進展していくため、破骨細胞性骨吸収を標的とした治療により癌の骨破壊を制御できる可能性が示唆される。

(2) 破骨細胞性骨吸収は、血管新生(因子)と関連して認められることが多く、申請者らは、ある種の血管新生因子を標的とした治療は、癌の増殖や転移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可能性を報告してきた。

(3) angiogenin (ANG)は世界で最初に分離された分子量14kDaのリボヌクレアーゼ活性を持つ血管新生因子であるが、ヒト口腔扁平上皮癌細胞では低酸素状況など環境の変化によってANGが上昇すること、ANGがVEGFやbFGFの発現調節に大きく関与すること、ANGの抑制により腫瘍増殖抑制効果を示すことを確認している。

(4) 以上の背景より、ANGを分子標的とした治療は、癌の骨浸潤・骨破壊においても、1) 癌の増殖抑制、2) 血管新生阻害、3) 破骨細胞性骨吸収阻害による治療の効果が期待できるが、骨転移や骨浸潤など骨に特徴的な癌誘発性骨破壊に対するANGの関わりについては全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

癌の顎骨浸潤や骨転移などの癌誘発性骨破壊に対するANGの分子標的治療の有用性

を検索し、その制御機構の解析を骨代謝学と腫瘍学の両面から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大腿骨内へ癌細胞を直接注入する骨破壊モデルならびに骨転移モデルによるマウス骨破壊実験動物モデルを作製し、癌の骨破壊病変に対してRNA interferenceによるANG遺伝子のノックダウンした癌細胞を用いてANGによる治療的効果を検証する。

(2) ANGの骨髄細胞の破骨細胞分化誘導能や骨吸収活性など骨代謝における検討。

(3) ANGのノックダウンにより連動する遺伝子群の網羅的解析

(4) 骨微小環境 *in vitro* 再現モデル下での癌細胞のANGならびに関連因子の遺伝子発現制御を検証し骨浸潤部におけるANGの病態解明

4. 研究成果

(1) ANGの分泌レベルの高いヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2にANG siRNA発現プラスミドDNAを遺伝子導入してANGをノックダウンしたRNAi transfectant(以下、ANG-RNAi)の作製を行った(図1)。

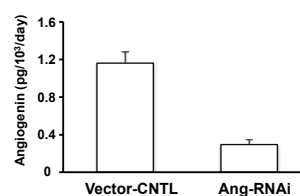


図1: ANGの発現量

(2) マウスの骨破壊実験モデルに対するRNA interferenceによるANG遺伝子のノックダウンによる治療的効果の検証。

① エックス線学的評価

HSC-2細胞においてANGの発現をノック

ダウンすると、皮下腫瘍移植モデルでは腫瘍の増殖のみならず血管新生も抑制された(データ省略)。癌細胞を直接注入した大腿骨骨髓腔内注射モデルでは、ANG-RNAi 群では対象群と比較して癌による骨破壊が抑制された(図2)。

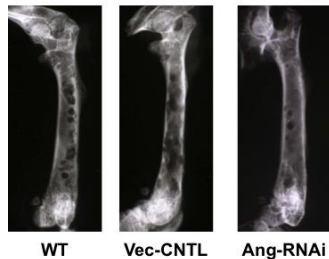


図2 大腿骨への癌細胞注入モデルの検討

また X 線透過像を示した骨吸収部の面積を画像解析装置 Luminavision を用いて検討したところ有為差をもって ANG 発現の抑制により骨破壊が抑制された(図3)。

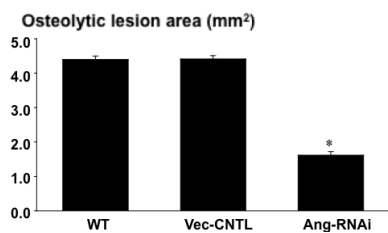


図3 : 癌骨破壊病変の面積の検討

②組織学的検討

対象群では骨髓腔内に癌細胞が増殖し、周囲骨の骨破壊が認められた。また骨破壊を示す骨表面に沿って破骨細胞マーカーである酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色陽性細胞がならび活発に骨吸収を起していた。一方、ANG-RNAi 群では、癌細胞による骨内での増殖は対象群と比較して少なく、対象群で見られた癌細胞の活発な増殖はみられなかった。血管内皮細胞のマーカーである CD34 陽性細胞も認められなかった。TRAP 染色陽性細胞も対象群と比較して著明に減少しており、癌細胞の産生する ANG 発現の抑制により骨内での癌細胞の抑制は著明に抑制された。またこの抑制効果は破骨細

胞性骨吸収の抑制により起こった可能性が示唆された(図4)。

(3) ANG による破骨細胞形成ならびに骨吸収活性に対する影響

①破骨細胞形成に対する ANG の影響

C57black マウス大腿骨より得た骨髓細胞に破骨細胞活性化因子である RANKL を添加した破骨細胞形成系に ANG を添加して培養し、TRAP 染色を行い多形核の TRAP 陽性細胞数を検討した。破骨細胞形成に与える影響を検討した。その結果、図5(左)のように ANG は濃度依存性に破骨細胞形成を促進した。またその細胞数を測定すると有意に破骨細胞形成を促進した(図6)。

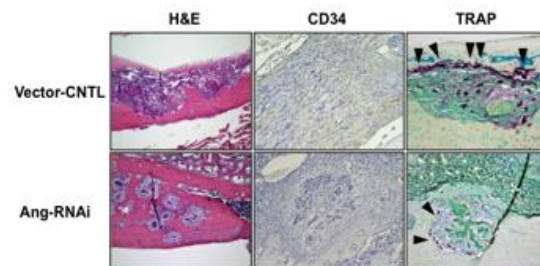


図4 : 癌の骨破壊部の組織像

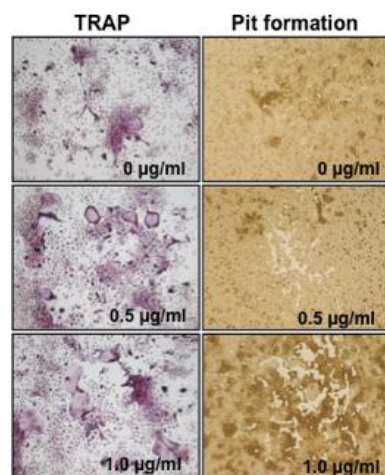


図5 : ANG による破骨細胞形成ならびに骨吸収窩

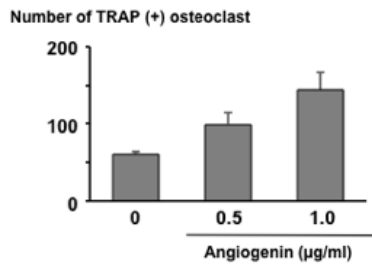


図6：ANGによるTRAP陽性破骨細胞形成数への影響

②破骨細胞性骨吸収活性化に対する影響

同様にハイドロキシアパタイトコートしたガラス面に破骨細胞を播種してその吸収窩の面積を測定するとANGの濃度依存性に吸収窩の面積は増加した。これらの結果、ANGは破骨細胞性骨吸収に関与することが示された。

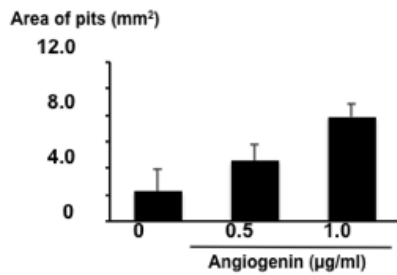


図7：ANGによる破骨細胞による吸収窩の面積

破骨細胞形成系での検討では、ANG-RNAi処理で破骨細胞形成は抑制された（データ省略）。またANGの破骨細胞誘導支持細胞である骨髄間質細胞ST2に対するANGの効果を検討したが、1.0µg以下の濃度のANGを添加するとST2細胞のANG遺伝子発現の濃度依存的亢進が見られたがRANKLやOPGの発現には変化がなかった。

(4) ヒト口腔扁平上皮癌細胞のANG発現のノックダウンにおける遺伝子発現プロファイリング解析の結果

① ANGを高発現するHSC2のANG-siRNA-HSC2を作製しRT²Profiler PCR Arraysを用いてPCR Arrayを行い、腫瘍の増殖、浸潤、転移に関わる遺伝子との関連性について検討した。その結果、

ANG-siRNA-HSC2においては、破骨細胞の活性に関与する integrin-β3等の幾つかの遺伝子発現が down regulateされ、ANGは破骨細胞性骨吸収を促進する遺伝子に関連していることが明らかとなった。また、腫瘍細胞の増殖に関する CMTM3 遺伝子等は発現が up regulateし、ANG-siRNA-HSC2においては腫瘍細胞の増殖の抑制に関連していることが明らかとなった。図8はその一例を示す。

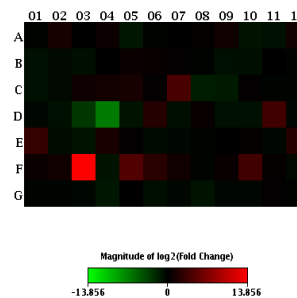


図8：Heat map of Angiogenesis

(5) 骨微小環境 in vitro 再現モデル下での癌細胞のANGならびに関連因子の発現制御状況の検証

①骨基質シャーレ (BECM) 上での検討

BECMにて培養するとANG-siRNAのHSC2にも関わらずANGの発現の回復がみられた(図9)。

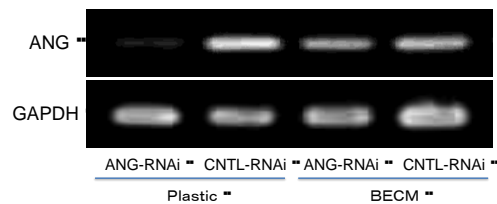


図9：ANG発現に対するBECMの影響

またマウス骨髄細胞を用いた破骨細胞形成系のANG発現をRNAiを用いてノックダウンすると破骨細胞形成を抑制した。これらの結果は癌骨破壊部での骨微小環境下ではANGが高発現し、破骨細胞性骨吸収が促進することが示唆された。

②遺伝子発現プロファイリングにおけるBECMの影響

RT²Profiler PCR Arraysを用いてPCR Arrayを行って検討を行った。ANG-siRNA-HSC2において6つの遺伝子変化を認めたが重要な候補遺伝子としてTie-2 signal伝達系と関連した遺伝子が同定された。最近、破骨細胞系におけるTie-2シグナルの役割が報告されており、またANGは血管新生因子自体の調整を行うという報告から破骨細胞における血管新生因子との関連が考えられた(図10)。

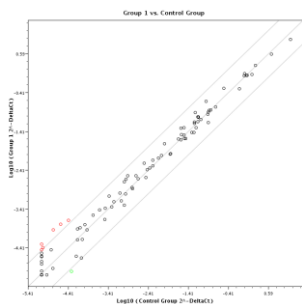


図10 PCR Arraysのプロファイリング

(6) 研究の今後の展望

本研究でANGを分子標的とした癌骨破壊病変への治療への展開が期待できると思われる。すでに我々はANGのノックアウトマウスの作製を行っており、より詳細な骨代謝系におけるANGの役割を検討し、さらにANGの選択的治療薬についての研究展開を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計7件)

- ① Aoki K : Does angiogenin have an important role in the cancer-induced osteolysis of oral squamous cell carcinoma? 9th Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery. 2010年11月27日, クアラルンプール (マレーシア)
- ② 青木香澄: 口腔扁平上皮癌における癌誘発の骨破壊に対する Angiogenin の役割。

2010年10月16日, 幕張メッセ・千葉

- ③ 吉岡徳枝, 他: 口腔扁平上皮癌の骨浸潤・骨破壊に対する angiogenin を標的とした治療の基礎的検討。第54回日本口腔外科学術総会・学術大会, 2009年10月9日, 札幌
- ④ 吉岡徳枝, 他: Angiogenin の発現抑制は口腔扁平上皮癌における癌誘発の骨破壊を抑制する。第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月3日, 横浜
- ⑤ 吉岡 徳枝, 他; 口腔扁平上皮癌における癌誘発の骨破壊に対する Angiogenin の役割。第27回日本骨代謝学会学術集会 2009年7月23日, 大阪
- ⑥ N. Yoshioka, et al. Down-regulation angiogenin suppresses cancer-induced osteolysis in oral squamous cell carcinoma. The 19th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. 2009年5月24日, 上海(中国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 朗 (SASAKI AKIRA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00170663

(2) 研究分担者

岸本 晃治 (KISHIMOTO KOJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 40243480
志茂 剛 (SHIMO TSUYOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 40362991
吉岡 徳枝 (YOSHIOKA NORIE)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 50362984