

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03889

研究課題名(和文) 癌の骨破壊病変に対する銅のキレートを応用した治療戦略の構築とその制御機構の解析

研究課題名(英文) Establishment of therapeutic strategies using copper chelates for bone destruction lesions of cancer and analysis of their functional mechanisms

研究代表者

佐々木 朗 (Sasaki, Akira)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授

研究者番号：00170663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体銅を標的とした癌の骨破壊病変に対する新規治療法の開発とその制御機構の解析を目的とし、血管新生阻害作用と破骨細胞形成抑制作用を示す銅のキレート薬(Ammonium Tetrathiomolybdate; TM)の癌の骨破壊病変について、臨床材料ならびに疾患モデルを作製してその有効性を検証した。口腔癌の骨浸潤と銅関連因子の関連が示唆された。疾患モデルでは骨転移や高カルシウム血症でのTMの有効性が示されたが癌性骨痛では傾向にとどまった。骨微小環境の癌関連線維芽細胞に注目し、TMの影響について網羅的タンパク発現の検証を行ったところ主に細胞骨格やHSP蛋白の上昇が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌による骨破壊は、腫瘍先端部の骨微小環境で、破骨細胞性骨吸収が進行し腫瘍が進展する。破骨細胞性骨吸収を抑制するBP製剤やデノスマブは癌の骨破壊制御の点で成功例であったが、薬剤関連顎骨壊死などの問題点も明らかになり、新たな戦略が必要である。本研究の意義は生体微量金属である銅の多機能性に着目した点であり、既存薬である銅キレート薬TMを応用した癌の骨浸潤、骨転移薬での癌の進展の抑制、癌性骨疼痛での治療戦略は実現可能なものであり、癌患者の微量金属に関する栄養管理面での治療戦略や拡大する医療費の問題や薬剤関連顎骨壊死のリスクからの脱却という課題への基盤となる。

研究成果の概要(英文)：A copper chelator (Ammonium Tetrathiomolybdate; TM) that inhibits angiogenesis and suppresses osteoclast formation for the purpose of developing new treatment methods for cancer-induced osteolytic lesions targeting living copper and analyzing its control mechanism. We examined the expression of copper related protein on clinical materials and verified its effectiveness on the disease models for cancer-induced osteolytic lesions. A relationship between bone invasion of oral cancer and copper-related factors was suggested. In disease models, TM was shown to be effective in bone metastasis and hypercalcemia, but it remained a trend in cancer-induced bone pain. Focusing on cancer-associated fibroblasts in the bone microenvironment, exhaustive protein expression verification of the effects of TM revealed an increase in cytoskeleton and HSP proteins.

研究分野：外科系歯学

キーワード：銅キレート 口腔癌 高カルシウム血症 破骨細胞 癌性骨痛 癌の骨浸潤 骨転移 骨破壊

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の骨破壊は癌によって誘導された破骨細胞が活発に骨吸収を起こすことによって生じた部分に腫瘍が進展していく。これは骨臓器に特異的な病態であり、破骨細胞性骨吸収を標的とした治療の開発が進み、骨転移や癌誘発高カルシウム血症にビスホスホネート (BP 製剤) やデノスマブ (抗 RANKL 抗体薬) などの骨吸収阻害薬が使用されるようになってきた。しかしながら薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) のリスクがあり、癌骨破壊に対する新規治療の開発が望まれている。

(2) 生体微量元素は生命活動の維持に必須であるが、それ自体が生理機能を持つことは少なく酵素の補因子として触媒的作用に関与することが多い。生体微量元素の銅は、① 骨の形成、② 弾力組織の形成、③ 血液生成と調整、④ 色素の形成、⑤ 再生力維持、⑥ 免疫系機能維持などが知られるが、近年、銅代謝疾患である Wilson 病に用いられる銅キレート薬 (Ammonium Tetrathiomolybdate; TM) に血管新生阻害作用を有することが示され、頭頸部扁平上皮癌の増殖を抑制することが報告された (*Mol Cancer Ther* 6, 2007)。また頭頸部癌のキードラッグであるシスプラチン (CDDP) は、膜貫通領域を含む細胞内銅流入トランスポーター (CTR1) を介して細胞内に流入するが、銅のキレートにより細胞内への流入が促進され耐性を解除することが知られ、乳癌において CDDP の感受性増強に TM が有効であることが報告されている。我々は TM が、銅依存性アミノキシダーゼである Lysyl oxidase (LOX) を抑制することにより、破骨細胞性骨吸収を抑制すること、EGFR の抗体薬セツキシマブ (Cmab) の効果を促進することを報告した (*Int J Oncol* 52: 989-999, 2018)。また間質性肺炎/肺線維腫症は、頭頸部癌で適応のある Cmab や PD-1 抗体薬 (ニボルマブ)、ドセタキセルの致死的な副作用であるが、TM が LOX の抑制を介して薬剤性肺線維腫を改善することが実験レベルで報告されている。最近、LOX が骨転移指向性に関与することが示された (*Nature* 522, 2015)。すなわち原発巣の低酸素環境にある乳癌細胞から LOX が分泌されると血液を介して転移先の骨に運ばれ、NFATc 誘導性の経路で転移前の骨に溶骨性骨病変 (転移前ニッチ) を形成し、その後、乳癌の骨転移と骨内増殖が亢進する。従って口腔癌においても骨転移と同様に骨微小環境での LOX 発現の亢進が癌の骨浸潤を促進させる可能性が示唆される。LOX は銅依存性であるため、TM は骨転移の予防や顎骨浸潤を抑制できる可能性が示唆される。TM は既存薬であることや同じ生体微量元素である亜鉛と比較して銅は生体安定性も高く、薬物での血清銅の調整が容易なことから臨床への展開が期待できる (図 1)。

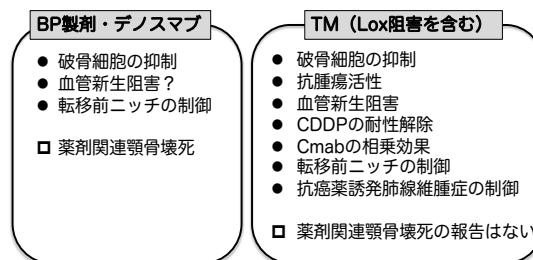


図1：期待できる薬物効果の比較 (研究段階を含む)

2. 研究の目的

(1) 口腔癌の骨浸潤部位について銅代謝と癌の骨破壊に関連する因子の発現を臨床病理学的に検索し明らかにする。

(2) 銅キレート薬である TM には血管新生阻害作用を有することが報告されており、我々は既に破骨細胞形成抑制を有すること、銅依存性アミノキシダーゼである Lysyl oxidase (LOX) の抑制を介して RANKL 発現を抑制することを報告している。本課題では TM が各種の癌に誘発される骨疾患動物実験モデルにおける有効性を明らかにすることを目的とした。

(3) 癌の骨破壊に癌関連線維芽細胞 (CAF: cancer associated fibroblast) に関与する遺伝子の網羅的解析をこれまで検討を行ってきたが、本課題では、TM が与えるタンパク発現の網羅的解析を行い TM に関連する今後の標的因子へ基盤知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌での臨床病理学的検討

岡山大学病院口腔外科で治療を行った口腔癌の顎骨浸潤した手術材料のうち術前治療歴のない外科切除標本より組織標本作製し、細胞外銅流出トランスポーター (ATP7B)、破骨細胞誘導因子 RANKL、銅依存性アミノキシダーゼである Lysyl oxidase (LOX) 発現に関して免疫組織学的検索を行った。

(2) 各種癌関連骨破壊病変動物モデルに対する TM の効果の検討

① 口腔癌による高カルシウム血症モデルに対する TM の効果の検討

担癌高カルシウム血症モデルは高カルシウム血症を引き起こすヒト口腔扁平上皮癌細胞

株 T3M-clone2 (m-CSF 産生細胞：理研細胞バンクより供与) 1.0×10^7 個を 5 週齢の BALB/c-nu/nu マウス皮下に移植し作製した。血清カルシウム濃度は電解質測定器 STAX-5 inspire (Techno Medica®) を用いて測定した。また移植腫瘍の体積についても経時的に測定した。

- ② 非担癌性高カルシウム血症モデルに対する TM の効果の検討
副甲状腺関連蛋白 PTHrP を装填した浸透圧ポンプ (ALZET®) を、5 週齢の BALB/c-nu/nu ノードマウス背部皮下に移植し、非担癌性の高カルシウム血症モデルを作製し TM を経口投与し血清カルシウム濃度を測定した。
- ③ 癌骨破壊 (骨転移) 動物実験モデルに対する TM の効果の検討
5 週齢の BALB/c-nu/nu ノードマウスの腓骨に口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 を移植し、腫瘍生着後に TM を投与開始し (1 mg/day, 週 3 回)、3 週間後にマウスを屠殺して後肢を摘出後、骨破壊病変を軟 X 線検査 (Sofron®) ならびに CT 画像検査 (SKYSCAN®) を行い評価した。
- ④ 癌骨破壊病変に誘発される癌性骨痛に対する TM の効果の検討
骨痛はマウスの疼痛行動評価に使用されている機械的知覚過敏 (von Frey テスト) で計測した。研究分担者の奥井はノードマウスの脛骨に注入した癌細胞がその増大に伴って経時的に機械的知覚過敏 (骨痛) を示すことを見だし、癌細胞からの酸放出が骨痛に関与することを報告している (Hiasa M, Okui T, et al, *Cancer Res*, 2018)。本課題ではこの骨痛評価法を用いて TM の効果を検討した。

(3) 銅キレートに応答する癌関連線維芽細胞のタンパク発現の網羅的解析

本課題では既存の銅キレート薬 TM について生体銅を標的とした癌の骨破壊病変に対する新規治療の開発とその制御機構の解析と目的としているが、銅キレート剤 TM に応答する癌関連線維芽細胞 (CAF: cancer associated fibroblast)、線維芽細胞、破骨細胞形成を支持するマウス骨髄間質細胞 ST2 の発現タンパクの網羅的解析を ESI-イオントラップ型質量分析システムを用いて LC-MS/MS 測定プロテオーム解析を行った。CAF はヒト歯肉線維芽細胞株 HGF にヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 を用いた 2 層式共存培養法を用いて作製し、 α -SMA の発現をウエスタンブロットにてその発現を指標に分離した (以下、HGF-CAF)。対象は①HGF-control, ②HGF-TM, ③HGF-CAF-control, ④HGF-CAF-TM, 破骨細胞誘導を有する⑤骨髄間質細胞株 ST2 ならびに⑥ST2-TM とした。
なお銅キレート剤 TM は濃度を $5\mu\text{M}$ とし 48 時間処理後、細胞を回収しサンプルとした。

4. 研究成果

(1) 口腔癌の骨浸潤実験モデルによる TM の効果の臨床病理学的検討

岡山大学病院口腔外科 (口腔顎顔面外科部門) で治療を行った口腔癌の顎骨浸潤した手術材料を用いて免疫組織学的検索を行った。下記に代表的な組織像を示す (図 2)。

上段は歯肉癌の初期進展癌、中段は中程度進展癌、下段は高度進展癌の組織像を示す。腫瘍の進行度に伴い銅キレートに関連するトランスポーター (ATP7B)、破骨細胞誘導因子 RANKL、銅依存性アミノキシダーゼである Lysyl oxidase (LOX) 発現白発現が増加する傾向にあり、癌の骨破壊と銅関連因子の発現は相関する可能性が示唆された。

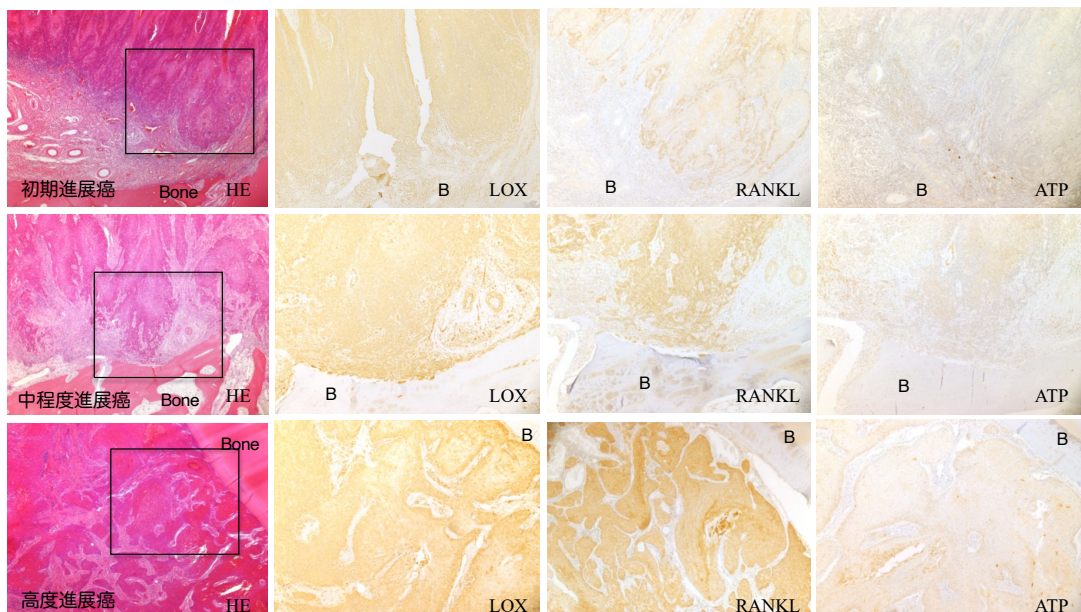


図 2：臨床材料における病理組織学的検討

(2) 各種がん骨破壊病変に関する TM の効果の検討

① 口腔癌による高カルシウム血症モデルに対する検討

高カルシウム血症を誘発する口腔癌細胞 T3M をヌードマウスの背部皮下に移植し、血清カルシウム値の上昇後に TM を投与する治療的投与（プロトコル 1）と、上昇する前から投与する予防的投与（プロトコル 2）について検討した（図 3）。

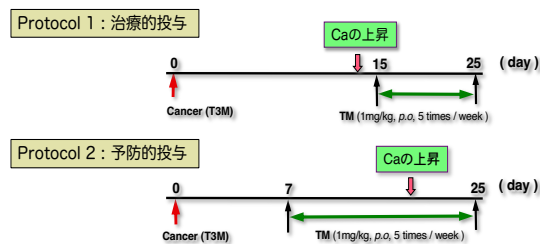


図3：プロトコル

プロトコル1ならびに2のいずれの群においても TM は腫瘍増殖の抑制効果を示した。一方、血清カルシウム値に関しても両プロトコル群で高カルシウム血症の改善を認め TM の高カルシウム血症に対する治療的効果を示すことができた。

② 非担癌性高カルシウム血症モデルに対する TM の効果の検討

TM は破骨細胞性骨吸収阻害作用(破骨細胞形成抑制)のみならず血管新生阻害作用を有していることが知られている。今回の研究成果でも TM は皮下移植した T3M の担癌モデルの腫瘍体積を抑制し抗腫瘍効果を示した。従って口腔癌移植による担癌高カルシウム血症モデルで見られた TM の高カルシウム血症の改善効果は TM の有する血管新生阻害作用によって起こった抗腫瘍効果によって二次的に高カルシウム血症が改善された可能性が示唆される。そこで PTHrP を装填した浸透圧ポンプ (ALZET®) をヌードマウス背部皮下に移植し作製した高カルシウム血症モデルを作製して TM の効果を検討した。結果にはバラツキが大きい結果となり、非担癌性高カルシウム血症モデルに対する TM の効果に有意差を見いだせなかった。申請者らは TM と同様に血管新生阻害作用を示すフマジリン誘導体 TNP-470 で非担癌性高カルシウム血症の治療的改善を確認しており、また TM は RANKL によって形成される破骨細胞形成を抑制することや口腔癌細胞株 HSC-2 の細胞培養上清によって誘発される RANKL 発現が Cu イオン存在下で促進され、それを TM が抑制することを既に明らかにしており、今回の非担癌性高カルシウム血症の結果については今後、再検証を行う必要があるが、臨床的観点から少なくとも癌に誘発される高カルシウム血症に対する TM の有用性が示唆された。

③ 癌骨破壊（骨転移）動物実験モデルに対する TM の効果の検討

5 週齢の BALB/c-nu/nu ヌードマウスの腓骨に口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 を移植し、腫瘍生着後に TM を投与開始 (1 mg/day, 週 3 回) し、3 週間後にマウスを屠殺して後肢を摘出し画像評価を行った。また骨破壊の面積は Lumina Vision® を用いて測定したところ TM は明らかに骨髓内移植された腫瘍による骨破壊を有意に抑制した (図 4)。また破骨細胞マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色で組織化学的検索を行ったところ TM 投与群で破骨細胞数は有意に抑制していた。TM の骨破壊抑制効果は申請者が既に報告している第 3 世代ビスホスホネートの乳癌骨転移動物実験モデル (*Cancer Res* 55, 1995, *Int. J. Cancer* 77, 1998) での骨破壊抑制効果と比較して効果はやや少ないことが示唆された。



図4：TMの骨転移モデルへの影響

④ 癌骨破壊病変に誘発される癌性骨痛に対する TM の効果の検討

癌性骨痛に対する TM の効果は舌癌由来の口腔扁平上皮癌細胞株 SAS をマウスの右脛骨骨髓腔内に移植し骨破壊モデルを作製し、腫瘍移植側の足底をフィラメントで加圧し、逃避行動を起こした加圧量を測定した。腫瘍移植に伴い疼痛閾値が低下となるため腫瘍移植後 7 日ならびに 9 日目の測定ではその加圧量は有意に低値になったものの、TM 投与群では加圧量の回復(増加)、すなわち癌性骨痛に対して改善傾向を示すものの有意差は認めなかった (図 5)。

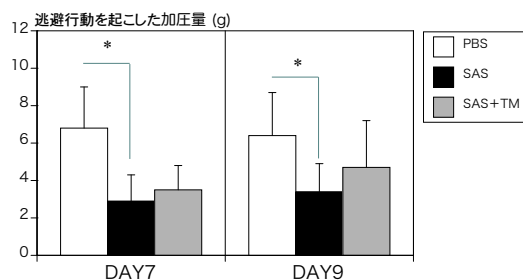


図5：癌性骨痛に対するTMの効果の検討

前述のように申請者は既に臨床応用されている第 3 世代ビスホスホネート (risedronate ならびに YH529: 開発コード) による乳癌骨転移モデルに対する臨床的有用性に関する基礎的な骨破壊抑制効果を報告している。TM の効果はこれらの既存薬の効果と同等とはいえ

ないものの動物疾患モデルで一定の有効性を示した。特にデノスマブや BP 製剤は骨破壊局所での効果であるが、生体微量元素である銅は微量にもかかわらず生命活動の維持に必須であることから TM の効果は生体恒常機構でのバランスが働く可能性があり効果が低下した可能性がある。一方で亜鉛と比較して生体安定性が高いため医療的にはコントロールし易い面がある。また申請者らは口腔癌の骨破壊病変に対する TM のシスプラチンやセツキシマブとの併用療法の有効性を明らかにしており、既存薬である TM は癌の骨破壊病変の治療に癌化学療法との併用療法や BP 製剤やデノスマブの補助療法としての展開の可能性が示唆された。今後は TM 単独治療の至適用量の検討や併用療法における臨床的有效性の検証などが必要と考えられる。

(3) 銅キレートに応答する癌関連線維芽細胞のタンパク発現の網羅的解析

発現タンパクの網羅的解析を LC-MS/MS 測定プロテオーム解析を行った。タンパクの質量解析は上位 20 位 (32~162 の解析結果) について TM 群と対象群で比較して TM により特異的に誘導されるタンパクを抽出した。TM 処理によって CAF-TM では主に細胞骨格に関連するタンパク群の増加が検出された。一方、HGF-TM では細胞骨格に関与するタンパクに加え破骨細胞分化を直接抑制する Calreticulin などのタンパクが増加し、破骨細胞形成を維持する骨随間質細胞株 ST2 では、細胞骨格に関与するタンパクに加え、骨芽細胞の細胞増殖因子やサイトカイン産生を調節する高分子量熱ショックタンパク質 HSP90 が検出されるなど TM は骨代謝系の細胞の維持に関与することが示唆された。我々は癌細胞培養液によって刺激された骨芽細胞や骨細胞の培養系での RANKL 発現を TM が銅存在下において抑制することを既に見出しており、TM は癌組織中に分布する CAF よりも骨破壊の最前線にある骨微小環境下における細胞群において破骨細胞形成の抑制に直接関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura T, Okui T, Hasegawa K, Ryumon S, Ibaragi S, Ono K, Kunisada Y, Obata K, Masui M, Shimo T, Sasaki A.	4. 巻 44
2. 論文標題 High mobility group box 1 induces bone pain associated with bone invasion in a mouse model of advanced head and neck cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2547-2558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2020.7788	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 -

1. 著者名 Sakamoto Y, Okui T, Yoneda T, Ryumon S, Nakamura T, Kawai H, Kunisada Y, Ibaragi S, MasanoriMasuia, KishoOnoa, KyoichiObataa, TsuyoshiShimod, Sasaki A	4. 巻 531
2. 論文標題 High-mobility group box 1 induces bone destruction associated with advanced oral squamous cancer via RAGE and TLR4.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.07.120	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木朗, 坂本裕美, 中野敬介, 金本栄華, 吉岡徳枝, 竜門省二, 西山明慶, 志茂 剛, 伊原木聡一郎
2. 発表標題 癌の骨破壊病変に対する銅キレートを応用した治療に関する基礎的研究
3. 学会等名 第32回日本口腔内科学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔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	志茂 剛 (Shimo Tsuyoshi) (40362991)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	

6. 研究組織（つづき）

	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	奥井 達雄 (Okui Tatsuo) (40610928)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (15201)	
研究分担者	吉岡 徳枝 (Yoshioka Norie) (50362984)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	伊原木 聡一郎 (Ibaragi Soichiro) (80549866)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	増井 正典 (Masui Masanori) (80881143)	岡山大学・歯学部・客員研究員 (15301)	
研究分担者	小野 喜章 (Ono Kisho) (30845384)	岡山大学・大学病院・医員 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関