

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07567

研究課題名(和文)骨転移した乳がん細胞選択的に発現亢進するレセプター分子の病態生理学的役割の解析

研究課題名(英文)Analysing the pathophysiological role of receptor molecules selectively upregulated in bone metastatic breast cancer

研究代表者

佐々木 宗一郎 (Sasaki, Soichiro)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：50583473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨転移では、がん細胞によって構築される線維芽細胞を主体とした微小環境の形成が重要である。本研究課題では骨微小環境での線維芽細胞とがん細胞との相互作用に着目し、がん細胞に発現するGタンパク会合型受容体であるGPR56の機能解析を行った。骨内投与モデルでは、GPR56発現レベルと骨内での増殖能には有意な相関が見られた。さらに、自然骨転移モデルでGPR56発現を誘導的に抑制すると、骨転移巣形成は有意に減弱した。以上の結果、GPR56は骨転移巣形成における線維芽細胞と腫瘍細胞との相互作用を媒介する重要な分子であり、乳がんの骨転移に対する新たな治療標的となる可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行期の乳がん患者の70%以上に骨転移の合併が認められ、癌罹患率の増加と治療成績の向上に伴って骨転移を併発する患者数も増加の一途にある。骨転移は他の臓器への転移と異なり、生活の質に影響は与えるが生命予後に直結することは少ないと考えられており、現在の治療法は対症療法が中心となっている。近年、骨転移したがん細胞が悪性化し、他の臓器への再転移能を獲得することが報告された。生命予後に直接的に関わる臓器への転移を促進させる温床としての骨転移巣の可能性を勘案すると、対症療法に留まらない骨転移の根本的な治療法を目指した本研究課題は来るべき超高齢化社会において大きな社会的意義へと繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Forming a fibroblast-dominated microenvironment constructed by cancer cells is crucial for bone metastasis. In this research project, we focused on the interaction between fibroblasts and cancer cells in the bone microenvironment. We analyzed the function of GPR56, a G protein-associated receptor expressed in cancer cells. A significant correlation was found between GPR56 expression levels and the ability to form bone metastases in an intra-bone injection model. In addition, inducible suppression of GPR56 expression in the spontaneous bone metastasis model significantly decreased the tumor foci formation, even after bone metastases had developed. These results suggest that GPR56 is a crucial molecule mediating the interaction between fibroblasts and tumor cells in bone metastasis formation and may be a novel therapeutic target for bone metastasis in breast cancer.

研究分野：がん転移

キーワード：乳がん 骨転移 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の乳がん罹患者数は年間約 77,000 人で、骨転移の合併は 70%以上の進行期の乳がん患者に認められ、Quality of Life のみならず生命予後も悪化させる。骨転移に対しては、骨転移部位で活性化している破骨細胞の機能を抑制する治療薬が用いられているが、骨内のがん細胞の増殖そのものに対しては抑制作用を示さない。したがって、骨内のがん細胞の増殖を直接的に抑制する新規の骨転移治療薬の開発が望まれている。

我々はマウス・トリプルネガティブ乳がん細胞株である 4T1 株から、同種マウスの乳房脂肪組織(同所)移植後に骨に自然転移する亜株、4T1.3 クローンを樹立した。4T1.3 クローンは、親株と比較し、原発部位での増殖速度、血中から骨髄への浸潤能に差異は認められなかったが、骨内に接種した際に親株に比べて高い腫瘍形成能を示した。したがって、4T1.3 クローンの骨への高い転移能は、転移先である骨内での生着能・増殖能が高いことによると考えられた。4T1.3 クローンの骨内での増殖に伴い、骨内への腫瘍関連線維芽細胞(CAF)の集積が見られ、CAF の集積抑制により、骨内に接種した 4T1.3 クローンの増殖が減弱することを明らかにした (Cancer Lett 2016; 378: 23)。

4T1.3 クローンと CAF の我々の遺伝子発現データから、骨内の 4T1.3 クローンで発現亢進しているレセプター遺伝子と、CAF で発現亢進しているレセプター遺伝子の組み合わせの抽出を試みた。その結果、4T1.3 クローンでは細胞接着型 G タンパク共役受容体 (ADGR) の一つである GPR56/ADGRG1 の発現が、CAF では GPR56/ADGRG1 に対するリガンドである 3 型コラーゲンの発現が亢進していることを見出した。さらに、4T1.3 クローンの GPR56/ADGRG1 遺伝子を欠失させると、原発巣の増殖速度には変化を及ぼすことなく、骨転移巣形成が著明に減弱した。以上の結果は、乳がんの骨転移過程において、GPR56/ADGRG1 が重要な役割を果たしている可能性を強く示唆していると考えられる。しかし、GPR56/ADGRG1 の発がん過程における役割については矛盾した報告がなされているうえに、細胞シグナル伝達機構については不明な点が多くある。本研究計画では、骨転移過程での GPR56/ADGRG1 の役割の検証を通して標的分子としての妥当性を実証するとともに、GPR56/ADGRG1 の細胞内シグナル伝達機構を解明し、GPR56/ADGRG1 を分子標的とした、骨転移に対する新たな戦略開発の基盤形成を目指し、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、GPR56/ADGRG1 の骨転移での役割の検証を通して、標的分子としての妥当性を実証するとともにリガンドとの結合機構の解明を目指した。GPR56/ADGRG1 の骨転移巣におけるがん増殖への寄与を明らかとすることで、骨内のがん細胞の増殖そのものを抑制するという新たなコンセプトに基づいた、新たな骨転移治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するために、以下の方法で解析を遂行した。

(1) 乳がん骨転移過程での GPR56/ADGRG1 の病態生理学的役割の解明

骨への自然転移を起こさないマウス乳がん細胞株 TS/A から樹立した高骨転移株 TS/A.3 を用いて *In vitro* 培養条件や 骨髄内 / 肺などの転移巣における GPR56/ADGRG1 の発現をフローサイトメトリー法にて確認した。

GPR56/ADGRG1 の発現を欠失させた TS/A 由来の骨転移株を作成し、*in vitro* での評価ならびに同所移植モデルでの自然骨転移能と直接モデルによる *in vivo* での腫瘍形成能を評価した。

GPR56/ADGRG1 を過剰発現させた TS/A の親株を用いて 同様の解析を実施した。

GPR56/ADGRG1 発現をテトラサイクリン誘導性に欠失できる高骨転移株を樹立し、自然骨転移モデルを用いて、 同様の解析を実施した。

ヒト乳がん患者の骨転移試料を用いて、GPR56/ADGRG1 発現を免疫染色にて評価した。

(2) GPR56/ADGRG1 の活性化機構の解明

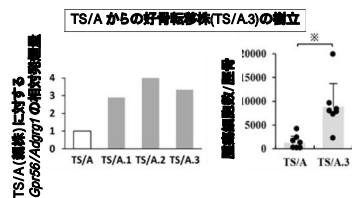
シグナル伝達過程における GPR56/ADGRG1 の GAIN 領域での切断の必要性を明らかにするために、野生型ならびに変異型 GPR56/ADGRG1 を強発現する親株を樹立した。骨髄内環境における増殖能を骨内投与モデルならびに同所移植モデルで検討した。

で樹立した細胞株を用いて、GPR56/ADGRG1 のリガンドとして 3 型コラーゲンを用いて *in vitro* での増殖能を評価した。

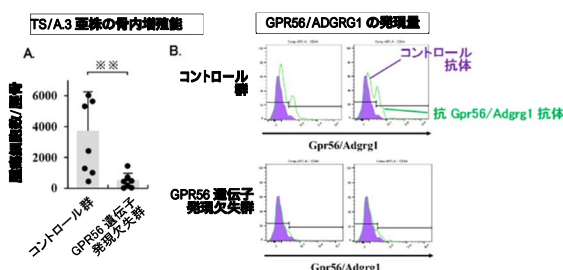
4. 研究成果

(1) マウス乳がん細胞株 TS/A を用いて骨内への直接投与により、高い骨髄内増殖能を有する

TS/A.3 を樹立した。樹立には骨内投与、回収・培養、再投与の工程を3回繰り返した。TS/A.3 亜株では親株と比較して *Gpr56/Adgrg1* の mRNA の発現亢進が見られ、骨内に投与した際に骨髄内での増殖が亢進していた(右図)。また、TS/A.3 は親株と比較して同所移植モデルによる肺転移巣形成能に有意な差は認められなかった。



TS/A.3 の *Gpr56/Adgrg1* 遺伝子を欠失させた細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いた骨髄内投与モデルでの検討では、GPR56/ADGRG1 の発現欠失により骨髄内の腫瘍細胞の増殖は抑制された(右図)。



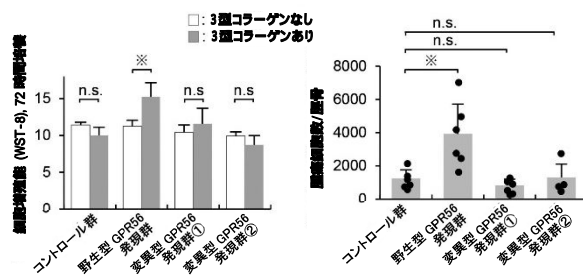
GPR56/ADGRG1 を強発現させた TS/A 親株を用いて、骨転移能の評価を行った。通常の培養条件では発現の有無によって増殖能に有意な差は認められなかったが、リガンド下の培養では、受容体分子を強発現させた細胞株の増殖能は有意に亢進した。さらに、骨内投与モデルでは GPR56/ADGRG1 の強発現株でコントロール株と比較して、骨髄内での増殖の亢進がみられた。一方、同所移植モデルによる検討を行ったが、GPR56/ADGRG1 ならびにコントロールベクター強発現株ともに自然骨転移は確認されなかった。



骨転移を伴う乳がん患者 6 検体に対して、GPR56/ADGRG1 抗体染色による発現検討を行った。その結果、6 検体中 3 検体で発現が確認された。一方、年齢・サブタイプ(ER, HER2)・化学療法の有無(CT)による発現量の違いは認められなかった。この結果より、GPR56/ADGRG1 がマウスと同様にヒトでも骨転移巣で高頻度に発現し、骨転移に関与している可能性が示唆された(左図)。

(2) (1)の検討から GPR56/ADGRG1 の発現が複数の細胞株とヒト検体で認められ骨転移過程における GPR56/ADGRG1 の関与が強く示唆されたことから、次に下流のシグナル伝達経路に着目した。GPR56/ADGRG1 はシグナル伝達において GAIN 領域での切断の必要性が報告されており、本研究課題でも骨転移過程における切断の必要性について検討した。

これまでの検討より、リガンド分子として 3 型コラーゲンが GPR56/ADGRG1 のシグナル伝達に必要であることを明らかにしている。そこで、GAIN 領域における切断が起こらない変異型の GPR56/ADGRG1 を 4T1.0 に強発現させた細胞株を樹立し、リガンド刺激時の増殖能を検討した。その結果、変異型を強発現した細胞株では 3 型コラーゲンによる増殖促進効果は認められなかった。さらに、骨髄内直接投与モデルでも変異型を強発現した細胞株はコントロール群と比べて増殖能に有意な差は認められなかった。



以上の結果は、Cancer Science 誌に既に報告した (Cancer Sci. 2021; 112(12), 4883-93)。本論文は、骨転移巣の形成において炎症性微小環境によって誘導される線維芽細胞の集積が必須であることをマウスモデルを用いて証明した論文として世界的に注目されている。本研究成果は、腫瘍細胞を直接的な標的とせず、がん微小環境の構成成分である線維芽細胞を標的とする、我々が提唱する新しい抗がん治療概念が骨転移でも応用可能であることを証明したものである。

我々は、ヒト臨床サンプルを用いた結果より同様の機構がヒトでも存在する可能性を示した。一方、今回証明した GPR56/ADGRG1 はリガンドとの結合様式や、構造変化を伴う活性化機構に議論の余地がありこれまでに分子標的薬の開発は進んでいない。今回の結果より、骨転移標的分子として GPR56/ADGRG1 が再注目されることで、構造的な活性化機構の解明に基づいた新規薬剤開発が進むことが期待される。骨髄内の腫瘍細胞を直接的に排除するという新たなコンセプトに基づいた骨転移治療法の開発は、来るべき超高齢化社会で増加が想定される骨転移患者に対する新たな治療戦略へと繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamada Hiroshi, Sasaki So-Ichiro, Tani Hideki, Somekawa Mayu, Kawasuji Hitoshi, Saga Yumiko, Yoshida Yoshihiro, Yamamoto Yoshihiro, Hayakawa Yoshihiro, Morinaga Yoshitomo	4. 巻 12
2. 論文標題 Author Correction: A novel hamster model of SARS-CoV-2 respiratory infection using a pseudotyped virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25678-1	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 Yamada Hiroshi, Sasaki So-Ichiro, Tani Hideki, Somekawa Mayu, Kawasuji Hitoshi, Saga Yumiko, Yoshida Yoshihiro, Yamamoto Yoshihiro, Hayakawa Yoshihiro, Morinaga Yoshitomo	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel hamster model of SARS-CoV-2 respiratory infection using a pseudotyped virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15258-8	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 So-Ichiro Sasaki, Di Zhang, Sadahiro Iwabuchi, Yamato Tanabe, Shinichi Hashimoto, Akira Yamauchi, Katsuhiro Hayashi, Hiroyuki Tsuchiya, Yoshihiro Hayakawa, Tomohisa Baba, Naofumi Mukaida	4. 巻 112
2. 論文標題 Crucial contribution of GPR56/ADGRG1, expressed by breast cancer cells, to bone metastasis formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4883-4893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15150	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 Di Zhang, Sadahiro Iwabuchi, Tomohisa Baba, Shin-Ichi Hashimoto, Naofumi Mukaida, So-Ichiro Sasaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of a Transcription factor, Nfe2, in Breast Cancer Metastasis to Bone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 3003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12103003	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 Naofumi Mukaida, Di Zhang, So-Ichiro Sasaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts as an Indispensable Cellular Player in Bone Metastasis Process	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 2896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102896.	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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐々木宗一郎、早川芳弘
2. 発表標題 マウス乳がん自然骨転移モデルを用いた、骨髄内線維芽細胞による骨転移促進機構の解明
3. 学会等名 第31日本がん転移学会学術集会・総会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 So-ichiro Sasaki, Takeshi Susukida, Hideaki Tahara, Yoshihiro Hayakawa
2. 発表標題 Type II interferon regulates bone metastasis of breast cancer in a context-dependent manner
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木宗一郎, Zhang Di, 馬場智久, 早川芳弘, 向田直史
2. 発表標題 骨微小環境特異的マウス乳がん細胞株で発現が亢進するGpr56/Adgrg1を介した骨転移制御機構の解明
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 So-ichiro Sasaki, Di Zhang, Tomohisa Baba, Yoshihiro Hayakawa, Naofumi Mukaida.
2. 発表標題 Crucial contribution of the interactions between Gpr56/Adgrg1-expressing breast cancer cells and bone matrix to breast cancer bone metastasis.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Di Zhang, Soichiro Sasaki, Tomohisa Baba, Naofumi Mukaida
2. 発表標題 The crucial roles of transcription factor Nfe2 in murine triple negative breast cancer metastasis to bone
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soichiro Sasaki, Di Zhang, Tomohisa Baba, Naofumi M
2. 発表標題 Crucial contribution of the Gpr56/Adgrg1 in the regulation of bone metastasis in murine breast cancer model
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020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	向田 直史	金沢大学・がん進展制御研究所・教授	
	(Mukaida Naofumi)		
	(30182067)	(13301)	

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
---------	---------