

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16343

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌と骨髄間質細胞との相互作用を標的とした骨転移抑制剤の開発

研究課題名（英文）Interaction between triple negative breast cancer and bone marrow stromal cells promote bone metastasis.

研究代表者

武田 朋也（Takeda, Tomoya）

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：20734031

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）：トリプルネガティブ乳癌(TNBC; Triple negative breast cancer)の骨転移成立には、TNBCと骨髄間質細胞との相互作用が重要である。本研究では、TNBCと骨髄間質細胞との相互作用に関与する因子としてケモカイン受容体CXCR4を見出した。さらに、CXCR4を阻害することでTNBCの骨転移を抑制することを明らかにした。以上より、CXCR4が骨髄間質細胞と相互作用することで、TNBCの骨転移を亢進している可能性が示唆された。そして、CXCR4を阻害する薬剤がTNBCの骨転移を抑制する新たな治療薬となる可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプルネガティブ乳癌(TNBC)は、早期に肺や骨などの遠隔転移を認める予後不良の悪性腫瘍である。特に、骨転移は転移性TNBC患者の約70%で認め、TNBC患者の予後を著しく悪化させる要因となっている。本研究において、ケモカイン受容体であるCXCR4がTNBCの骨転移に関与することを明らかにし、CXCR4を阻害することでTNBCの骨転移を抑制できることを見出した。これらの成果はTNBCの骨転移を抑制する治療法開発につながり、TNBC患者の予後改善に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）： Interactions between triple negative breast cancer (TNBC) and bone marrow stromal cells play the important role in bone metastasis. In this study, we clarified that CXCR4, chemokine receptor, involve the interactions between TNBC and bone marrow stromal cells. In addition, the inhibition of CXCR4 suppressed the bone metastasis of TNBC. Therefore, CXCR4 induce interactions between TNBC and bone marrow stromal cells, and promote bone metastasis of TNBC. Targeting CXCR4 may be valuable for developing therapeutic strategies against bone metastasis of TNBC.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 骨転移 骨微小環境 ケモカイン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トリプルネガティブ乳癌(TNBC ; Triple negative breast cancer)は、早期に肺や骨などの遠隔転移を認める予後不良の悪性腫瘍である。特に、骨転移は転移性 TNBC 患者の約 70%で認め、TNBC 患者の予後を著しく悪化させる要因となっている。そのため、TNBC の骨転移を抑制することが臨床上重要である。

骨転移の成立には、がん細胞と骨髄間質細胞との相互作用が重要である。骨髄間質細胞は様々な増殖因子やサイトカインを産生することで、がん細胞の骨への遊走、定着及び浸潤に関与する。しかし、骨微小環境中には多種の増殖因子やケモカインなどが存在し、どの因子が TNBC の骨転移に関与しているかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨転移における骨髄間質細胞と相互作用する TNBC 骨高転移株の受容体を明らかにする。さらに、同定した受容体が TNBC の骨転移を抑制する治療標的分子となり得るか評価する。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞株

マウス由来 TNBC 細胞株 4T1 及び 4T1 から作成した TNBC 骨高転移株 4T1-B を用い、HEPES、L-グルタミン、ペニシリン・ストレプトマイシン、炭酸水素ナトリウム、10% FBS を含む RPMI1640 培養液にて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

(2) 遊走能の測定

遊走能は Falcon cell culture inserts を用いて解析した。上層に 4T1 及び 4T1-B 細胞、下層に骨髄間質細胞を懸濁させた溶液を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下でインキュベートした。上層に残っている細胞を取り除き、下層に移動した細胞をディフクイック染色により固定、染色し、算定することで評価した。

(3) Real time PCR

各種条件下で培養した 4T1 及び 4T1-B 細胞の total RNA は TRIZOL Reagent により抽出した。その後、PrimeScriptTM Reverse Transcriptase を用いて cDNA の合成を行い、PCR 反応のテンプレートとした。PCR 反応は、目的遺伝子の特異的なプライマー及び TB Green Premix Ex TaqTM を用いて行った。

(4) CXCR4 siRNA による転移抑制効果の検討

使用動物は 6~8 週齢の Balb/c 系雌性マウスを用いた。CXCR4 siRNA を処理した 4T1-B 細胞を BALB/c マウスの心腔内に注射した。In Vivo Imaging System により骨の Luciferase の発光強度を測定する。

(5) 統計学的解析

上記の方法により得られた結果は平均値±標準偏差で示した。各群間の検定には ANOVA with Dunnett を用い、 $p < 0.05$ のとき有意差があったとした。

4. 研究成果

(1) TNBC 骨高転移株と骨髄間質細胞との相互作用の解析

TNBC 細胞と骨髄間質細胞との相互作用を明らかにするために、骨髄間質細胞と共培養した TNBC 骨高転移株 4T1-B の遊走能を測定した。骨髄間質細胞と共培養した 4T1-B 細胞は親株である 4T1 細胞より遊走能の亢進を認めた (図 1)。

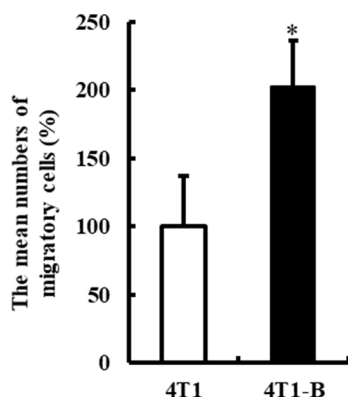


図 1 骨髄間質細胞と共培養した 4T1 及び 4T1-B 細胞の遊走能の検討

(2) TNBC 骨高転移株で高発現する受容体の探索

TNBC 骨高転移株で発現する受容体が骨髄間質細胞から産生されるリガンドと作用することで、骨への遊走能が亢進している可能性が考えられる。そこで、TNBC 骨高転移株 4T1-B で高発現する受容体を探索したところ、ケモカイン受容体 CXCR4 の発現増加を認めた (図 2)。

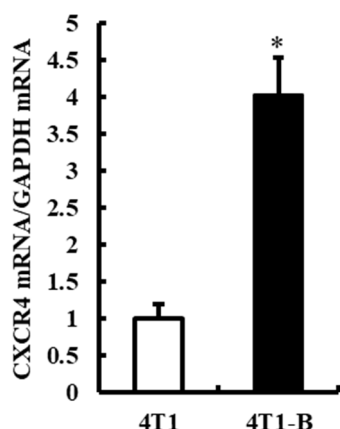


図 2 4T1 及び 4T1-B 細胞の CXCR4 の発現動態の検討

(3) CXCR4 siRNA 処理による遊走能の検討

CXCR4 が骨髄間質細胞と相互作用することで TNBC の遊走能が亢進し、骨転移が亢進している可能性が考えられる。そこで、CXCR4 siRNA 処理により、骨髄間質細胞と共培養した 4T1-B 細胞の遊走能が抑制されるか検討した。その結果、CXCR4 siRNA 処理した 4T1-B 細胞において、遊走能の低下を認めた (図 3)。

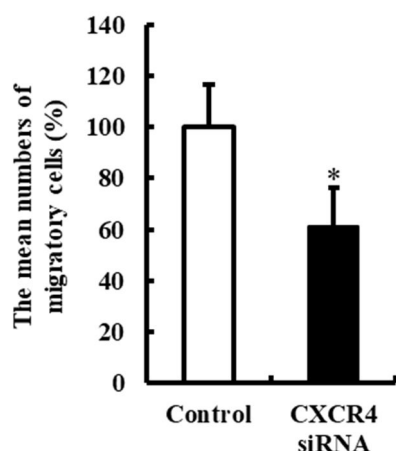


図 3 CXCR4 siRNA 処理による 4T1-B 細胞の遊走能の検討

(4) CXCR4 siRNA 処理による骨転移抑制効果の検討

CXCR4 siRNA 処理により、骨転移が抑制されるか *in vivo* で検討した。その結果、CXCR4 siRNA 処理した 4T1-B 細胞では骨転移の抑制を認めた (図 4)。

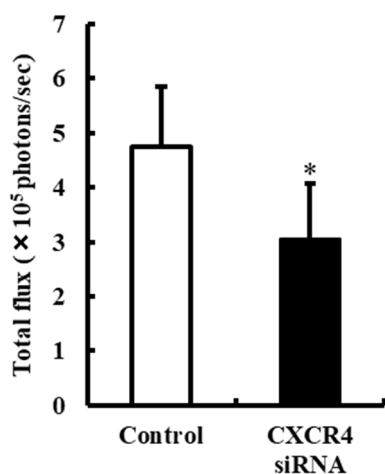


図 4 CXCR4 siRNA 処理による骨転移抑制効果の検討

以上のことから、CXCR4 が骨髄間質細胞と相互作用することで、TNBC の骨転移を亢進している可能性が示唆された。そして、CXCR4 を阻害する薬剤が TNBC の骨転移を抑制する新たな治療薬となる可能性が期待される。

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 0件）

1. 著者名 Takeda Tomoya, Tsubaki Masanobu, Asano Ryota, Itoh Tatsuki, Imano Motohiro, Satou Takao, Nishida Shozo	4. 巻 99
2. 論文標題 Dimethyl fumarate suppresses metastasis and growth of melanoma cells by inhibiting the nuclear translocation of NF- B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 168 ~ 176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Tomoya, Tsubaki Masanobu, Kato Natsuki, Genno Shuji, Ichimura Eri, Enomoto Aya, Imano Motohiro, Satou Takao, Nishida Shozo	4. 巻 -
2. 論文標題 Sorafenib treatment of metastatic melanoma with c-Kit aberration reduces tumor growth and promotes survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.13089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Tomoya, Tsubaki Masanobu, Genno Shuji, Matsuda Takuya, Yamamoto Yuuta, Kimura Akihiro, Shimizu Nao, Nishida Shozo	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of yes-associated protein suppresses migration, invasion, and metastasis in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10238-021-00738-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoya Takeda, Masanobu Tsubaki, Shuji Genno, Shozo Nishida.
2. 発表標題 Sorafenib inhibits the tumor growth and metastasis through suppression of receptor tyrosine kinase pathway in melanoma.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田朋也、椿正寛、源野秀次、山本裕太、西田升三
2. 発表標題 Sorafenibによるマルチキナーゼ阻害での悪性黒色腫での腫瘍増殖・転移抑制効果
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoya Takeda, Masanobu Tsubaki, Shozo Nishida
2. 発表標題 Dimethyl fumarate suppresses tumor growth and metastasis of metastatic melanoma by inhibiting the nuclear translocation of NF- B.
3. 学会等名 The 4rd International Cancer Research Symposium of Training Plan for Oncology Professionals
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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