

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21016

研究課題名（和文）骨破壊病変を形成するがんの進展・骨からの血行性転移に於ける骨細胞の関与

研究課題名（英文）Role of osteocytes in the progression of malignant tumors with bone lesions

研究代表者

谷本 幸多朗（TANIMOTO, Kotaro）

徳島大学・病院・診療支援医師

研究者番号：90908188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：骨に発症するがんの進展は骨髄の微小環境（ニッチ）と密接に関連する。骨細胞は骨を構成する細胞の大部分を占め、骨髄ニッチの制御に中心的な役割を担う。骨破壊病変を形成する多発性骨髄腫では腫瘍の進展に伴い骨細胞のアポトーシスが観察されるが、その病態的意義については不明な点が多い。本研究は、骨細胞を生体内で特異的にアポトーシスを誘導することができる独自のマウス骨髄腫細胞株同種移植モデルを開発し、骨細胞のアポトーシスによって骨髄腫の増殖や転移が促進することを証明した。将来的に骨細胞のアポトーシスを防ぐことで骨への骨髄腫や他のがんの転移・進展を阻止し、予防する新規治療法を確立する基盤となるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨細胞のアポトーシスを防ぐことで骨への骨髄腫や他のがんの骨転移・進展を阻止し、予防する新規治療法を確立する可能性を示すものである。また、本研究で確立したVk12598骨髄腫細胞株は正常免疫を有する同種移植が可能であり、Dmp1-HBEGFマウスと組み合わせることで、経時的にその進行や進展部位をモニターすることができ、骨細胞のがん病態での役割やがん免疫に対する役割を解析できる独自性の高い動物モデルであった。骨細胞のアポトーシスによって誘導される候補分子を抽出したため、今後骨細胞特異的遺伝子改変マウスを用いた更なる詳細なメカニズムの解明や新規治療法の開発につなげる予定である。

研究成果の概要（英文）：The progression of tumors developing in bone is closely related to the bone marrow microenvironment (niche). Osteocytes comprise the majority of bone cells and play a central role in the regulation of the bone marrow niche. In multiple myeloma, malignancy of the plasma cells forming destructive bone lesions, apoptosis of osteocytes is observed with tumor progression. However, its pathological significance remains unclear. In this study, we developed a unique mouse myeloma cell line allogeneic transplantation model that can specifically induce apoptosis of osteocytes in vivo. Using this model, we demonstrated that apoptosis of osteocytes promotes myeloma growth and metastasis. These results are expected to provide the basis for establishing a new treatment strategy for myeloma and other bone cancers by preventing apoptosis of osteocytes.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨細胞 がんと骨病変

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨破壊病変を形成するがんの一つである多発性骨髄腫は、骨内で形質細胞が無秩序に増殖する血液がんである。骨髄での骨髄腫細胞の増殖は、正常な骨リモデリングを阻害し、破骨細胞形成の増加と骨吸収の悪化、さらに骨芽細胞の分化と骨形成の抑制を長期にわたって引き起こす。結果、骨髄腫患者は溶骨性病変を呈し病的骨折を招く。骨髄腫細胞の増殖と生存、骨破壊を誘発する骨髄腫細胞自身に好適なニッチは、骨髄腫細胞と骨髄を構成する細胞（骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、間質細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞、免疫細胞等の血液細胞）との間の相互作用で形成されるため、この理解が病態解明と治療には重要である。

骨細胞は骨構成細胞の大部分を占め、骨小腔 (lacunae) から骨細管 (canaliculae) に樹状突起を伸ばし骨内にネットワークを形成しており、様々な物質の輸送を介して骨表面の骨芽細胞や破骨細胞に司令をだして、骨髄ニッチの制御に中心的な役割を担うことが知られる。

研究代表者はこれまでに、骨破壊病変を伴うがんの一つである多発性骨髄腫患者の骨髄生検を評価し、前がん状態である意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症 (MGUS) や健常者の骨髄に比べて、多発性骨髄腫患者の骨髄では骨細胞の細胞死 (アポトーシス) が増加していることを見出した。また、申請者は免荷が骨髄腫細胞の遠隔転移や進展を促進することを以前報告しており、免荷によっても骨細胞は萎縮を示すことから、骨細胞のアポトーシスが骨髄腫細胞の遠隔転移・進展の契機となるのではないかとの着想を得た。しかし、骨細胞が骨髄腫細胞の骨髄から循環血液中への遊離や骨の特定の部位へのホーミング、腫瘍の全身への転移・増殖を制御するかは不明である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、骨髄腫細胞の遠隔転移・進展を制御する骨細胞の役割とメカニズムを、骨細胞を除去した同種移植骨髄腫マウスモデルを用い解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) C57BL/6 系統マウスに同種移植と腫瘍進展の観察が可能な骨髄腫モデルの構築

Vk\*Myk マウス由来 Vk12598 骨髄腫細胞株は正常免疫を有する同種移植が可能であり、遺伝子改変動物と組み合わせることで分子メカニズムをより正確に解析できると期待される (Blood. 120(2): 376-385, 2012)。しかし、その増殖は生体内でのみ可能であり、この取り扱いや修飾・応用には困難が多いと予測される。まずはリアルタイムで腫瘍進展をモニターすることが可能となるように GFP-Luc、RFP-Luc、iRFP720-Luc を発現させた Vk12598 細胞の作成し、生体内で増殖かつ IVIS で腫瘍進展をモニターすることができるモデルの構築を行なった。

#### (2) 骨細胞を死滅除去した同種移植骨髄腫マウスモデルの作成と腫瘍進展の観察

成熟した骨細胞にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現させた Dmp1-HBEGF マウス (Cell Metab. 5(6): 464-75, 2007) に Vk12598 骨髄腫細胞を播種し、骨細胞を生体内で特異的にアポトーシスを誘導することができる独自の同種移植骨髄腫マウスモデルを作成を試みた。Dmp1-HBEGF マウスに GFP-Luc を発現させた Vk12598 細胞を片側脛骨に移植し、ジフテリア毒素 (DT) を投与して骨細胞をアポトーシスさせ、IVIS イメージングと腫瘍マーカにより、腫瘍の位置と成長を経時的に追跡し、骨細胞のアポトーシスが骨髄腫の腫瘍進展や増殖を促進するか観察した。

#### (3) 骨細胞が制御する骨髄腫進展の原因因子の特定を試みる

骨細胞による骨髄腫進展制御メカニズムを解明するため、担がんマウスの骨細胞で発現が変動する分子網羅的解析をマイクロアレイで行った。

### 4. 研究成果

Vk\*Myk マウス由来 Vk12598 骨髄腫細胞は Mayo Clinic の Prof. Leif Bergsagel から供与を受け、C57BL/6 系統への生着と増殖を確認し、Vk12598 細胞が産生する M 蛋白のサブクラス IgG2b の増加を確認した。また、Live imaging のために Vk12598 細胞に GFP-Luc、RFP-Luc、iRFP720-Luc をそれぞれ発現させた Vk12598 細胞の作成しマウス生体内で増殖させた。その後、蛍光ソーティングによって純度を高い細胞群の回収を行った。GFP-Luc、RFP-Luc、iRFP720-Luc を発現させた Vk12598 細胞は SCID マウス内で増殖し IVIS による増殖進展を確認することができた。しかし、C57BL/6 系統に再移植した際に、GFP-Luc については移植後 2 週までは IVIS でモニターできたもののその後 Luc シグナルの減弱が見られた。原因は不明であるものの GFP による免疫原性が考えられた。RFP-Luc、iRFP720-Luc については IVIS で経時的なモニターが可能であることを確認した。

骨細胞にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現させた Dmp1 - HBEGF マウスを理研バイオリソースセンターより入手した。ジフテリア毒素 (DT) を投与したところ骨細胞を特異的に死滅させることができた。そこで Dmp1-HBEGF マウスに Vk12598-iRFP720-Luc 骨髄腫細胞を播種し、骨細胞を

生体内で特異的にアポトーシスを誘導することができる同種移植骨髄腫マウスモデルの作成を行った。骨細胞を死滅させたマウスでは骨髄腫の増殖や転移が促進し、血中循環骨髄腫細胞の増加を認めた。このことから、原発組織から離れて血管中に入り、血流に乗って転移するプロセスに骨細胞が関与すると示唆された。

さらに、骨細胞による骨髄腫進展制御メカニズムを解明するため、担がんマウスの骨細胞で発現が変動する分子網羅的解析をマイクロアレイで行った。ピックアップした2つの分子につき、それぞれのノックアウトマウスを作成した。今後これらの骨髄腫進展における役割の解析を行う予定である。

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 Tanimoto Kotaro, Hiasa Masahiro, Tenshin Hirofumi, Teramachi Jumpei, Oda Asuka, Harada Takeshi, Higa Yoshiki, Sogabe Kimiko, Oura Masahiro, Sumitani Ryohei, Hara Tomoyo, Endo Itsuro, Matsumoto Toshio, Tanaka Eiji, Abe Masahiro	4. 巻 107
2. 論文標題 Mechanical unloading aggravates bone destruction and tumor expansion in myeloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 744-749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2021.278295	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 谷本幸多朗
2. 発表標題 力学的免荷による骨髄腫の髄外進展の促進
3. 学会等名 第83回日本血液学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本幸多朗
2. 発表標題 力学的除荷は骨髄腫の骨破壊と骨髄外進展を加速させる
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotaro Tanimoto
2. 発表標題 Mechanical unloading promotes bone destruction and myeloma tumor expansion
3. 学会等名 Cance and Bone Society 2022 (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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