

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590058

研究課題名（和文）がんの増殖と骨転移におけるプロスタグランジン E の役割解明と創薬展開

研究課題名（英文）Roles of prostaglandin E on the growth and bone metastasis of cancer.

研究代表者

宮浦 千里 (MIYAURA CHISATO)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：20138382

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、悪性黒色腫、乳がん、前立腺がんを骨へ高率に転移する株として確立、マウスへ移植して、骨転移と皮下固形腫瘍形成の In vivo 解析を実施した。PGE に依存した血管新生と浸潤および骨転移に着目した解析において、PGE レセプター作働薬の内、EP4 アンタゴニストが増殖・血管新生・転移に対して有効性を示し、創薬展開の可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

This proposal investigated roles of prostaglandin E (PGE) on the growth, angiogenesis, and bone loss associated with bone metastasis of cancer. In the mouse models of tumor growth and bone metastasis, PGE produced by host cells is essential and EP4 antagonist suppresses the growth and metastasis of cancer in vitro and in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プロスタグランジン E、がんの骨転移、固形腫瘍、がん

1. 研究開始当初の背景

がんの転移は術後の予後を左右する要因として、克服すべき重要課題となっている。研究代表者の宮浦は、がんの骨転移に着目して研究し、炎症調節因子であるプロスタグランジン E (PGE) ががんの転移や増殖を左右することを見出した。特に、骨転移は骨破壊を伴うが、PGE 合成の最終ステップを司る膜型

PGE 合成酵素 (mPGES) 欠損マウスを用いた研究成果から、宿主細胞が産生する PGE が骨転移と骨破壊を制御することを見出した。そこで、mPGES 欠損マウスを用いてメラノーマの移入実験を行なったところ、mPGES 欠損マウスでは骨転移が軽微となり骨破壊も起こらず、肺への転移も極めて起こりにくいことを見出した。したがって、がん細胞の転移巣の形成と組織破壊、血管新生、骨破壊などの過

程に宿主細胞が産生する PGE が必須因子なっていると考えられる。

本課題の開始にあたり、申請者は使用するがん細胞として、メラノーマに加えて、乳がんと前立腺がんに着目した。乳がんは女性のがんとして若年齢から発症し、骨転移しやすいことが知られている。一方、前立腺がんは男性の癌として患者数が増加の一途を辿っており、乳がんと同様に、骨転移しやすいことが知られている。

これら3種のがん細胞に着目して、その増殖・浸潤・血管新生・骨転移と骨破壊について、In vitro 解析ならびに In vivo 解析を行なう計画とした。研究に使用するがん細胞として、これまでに In vivo 移植実験で骨転移が確認できている、マウス B16 メラノーマ、マウス乳がん細胞(4T1)、ヒト前立腺がん細胞(LNCaP)を用いることとした。

標的細胞にける PGE の作用は、4 種の PGE レセプターサブタイプ (EP1~EP4) を介して発現することが報告されている。申請者らは、骨組織では、骨芽細胞が EP4 を発現しており、EP4 受容体を介したシグナルにより、PGE の骨吸収作用が発揮されることを報告してきた。そこで、本課題において、がん細胞の増殖・浸潤・血管新生・転移における PGE の作用がどの受容体を介するかを明らかにするために、EP1~EP4 に対する選択的アンタゴニストの影響を調べることにした。これにより、有効性を示したアンタゴニストががんの転移抑制を目的とする新たな創薬展開に発展することを狙っている。

2. 研究の目的

(1) B16 メラノーマの腫瘍形成における宿主由来 PGE の役割を解明するために、mPGES 遺伝子欠損マウスを用いて、血管新生制御因子の解析をすると共に B16 移植実験を行なう。

(2) マウス乳がん細胞(4T1)を用いて、増殖・浸潤・骨転移と骨破壊に及ぼす PGE の作用を解明すると共に、EP1~EP4 アンタゴニスト投与による骨転移・骨破壊への治療効果を検証する。

(3) ヒト前立腺がん細胞(LNCaP)を用い、ヌードマウスに移入して、高率に骨転移する実験系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 固形腫瘍形成における宿主 PGE の役割

① In vivo 解析：

mPGES 欠損マウスならびに野生型マウスを用い、マウス背部に B16 メラノーマ細胞を移入し、固形腫瘍を形成させる。固形腫瘍の体

積を計測すると共に、血管新生について、Angio Sense 蛍光イメージングにより In vivo 解析する。

② 線維芽細胞による血管新生因子の産生：

皮膚線維芽細胞を mPGES 欠損マウスならびに野生型マウスから採取して初代培養する。線維芽細胞に B16 細胞を接着させて、PGE 産生を調べる。また、培養系に PGE を添加し、血管新生促進因子である VEGF の産生を調べる。

(2) 乳がんの増殖・浸潤及び骨転移・骨破壊

① 乳がん細胞の増殖と浸潤の解析：

マウス乳がん細胞(4T1)を培養し、その増殖と浸潤活性を調べる。浸潤活性はマトリックスを破壊して浸潤した細胞数を計測する。

② 骨転移モデルと骨破壊：

4T1 細胞をマウス頸骨に移入して骨転移巣モデルを確立し、移植8日後、頸骨を採取し、マイクロCTを用いて、骨3次元解析を行なう。骨転移巣における局所 PGE 産生・骨破壊・mPGES および COX-2 遺伝子誘導・血管新生について、In vivo 解析を行なう。

③ EP1~EP4 アンタゴニストの効能評価：

上記の4T1移入実験について、マウスにEP1~EP4 アンタゴニストを皮下投与し、骨破壊への有効性を評価する。

(3) 前立腺がんの骨転移系の確立

ヒト前立腺がん細胞(LNCaP)をヌードマウスに移入し、骨転移が高率に発生する細胞株を作製し、高転移実験系を確立する。

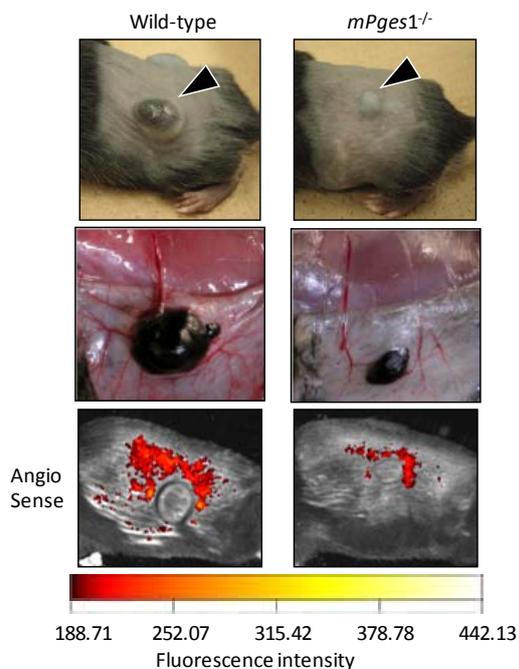


図1. mPGES-1欠損マウスにおけるB16細胞の皮下腫瘍形成および血管新生の抑制作用

4. 研究成果

(1) 固形腫瘍形成における宿主 PGE の役割

① In vivo 解析 :

がん細胞の固形腫瘍形成において、血管新生は必須である。そこで、腫瘍形成における血管新生について宿主由来の PGE 産生の影響を解析した。mPGES 欠損マウスならびに野生型マウスを用い、マウス背部に B16 メラノーマ細胞を移入し、固形腫瘍を形成させた。その結果、宿主が PGE を産生できない mPGES 欠損マウスでは、野生型マウスに比較して、B16 メラノーマの固形腫瘍形成が顕著に抑制された(図 1)。

その血管新生を調べたところ、腫瘍の栄養血管となる太い新規の血管形成が野生型マウスの固形腫瘍で観察されたが、mPGES 欠損マウスでは、形成された血管が少なく細いものであった。さらに、Angio Sense を用いた蛍光イメージング法により、血管新生を解析したところ、野生型マウスの腫瘍周囲では、顕著なシグナルが観察されたが、mPGES 欠損マウスでは、そのシグナルは軽微であった(図 1)。従って、腫瘍形成に必須な血管新生には、宿主細胞が産生する PGE が関与してい

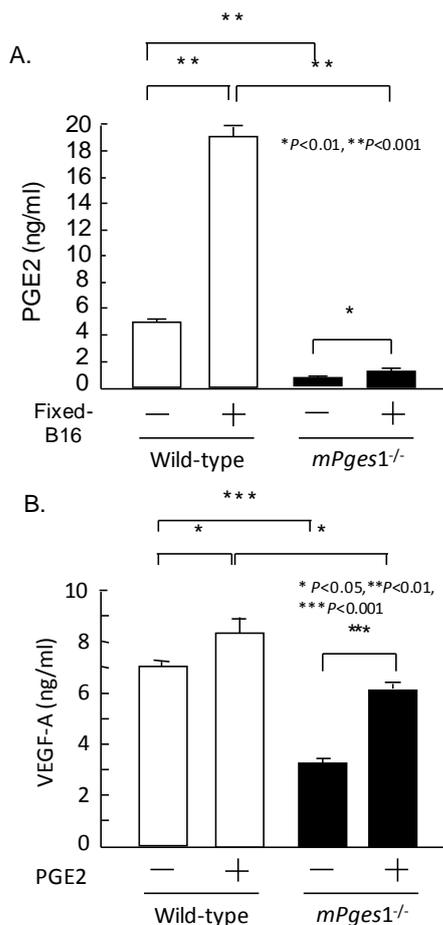


図2. 皮膚線維芽細胞の PGE₂ 産生における B16 細胞共培養および mPGES-1 欠損の影響

ると考えられる。

② 線維芽細胞による VEGF 産生と PGE :

皮膚線維芽細胞を mPGES 欠損マウスならびに野生型マウスから採取して初代培養した。それら細胞に固定した B16 細胞を接着させて、PGE 産生を調べたところ、野生型マウス由来細胞では、B16 との接着により PGE 産生が顕著に増加した。一方、mPGES 欠損マウス由来の皮膚線維芽細胞は、ほとんど PGE を産生できず、B16 との接着によっても変化しなかった(図 2 上段)。次に、皮膚線維芽細胞の培養系に PGE 添加したところ、野生型マウス由来の細胞では、血管新生因子である VEGF の産生が上昇した。一方、mPGES 欠損マウス由来の皮膚線維芽細胞では、VEGF の産生量が低く、PGE 添加により上昇したが、野生型のコントロールレベルであった(図 2 下段)。従って、宿主細胞ががん細胞に接着すると PGE を産生し、その PGE は VEGF 産生を促して、血管新生を促進すると考えられる。このカスケードが mPGES 欠損マウス由来細胞で低下していることは、宿主由来の PGE が腫瘍の増加に必須な血管新生を制御していると考えられる。

(2) 乳がんの増殖・浸潤及び骨転移・骨破壊における PGE の役割及び EP アンタゴニストの創薬展開

① 乳がんの増殖と浸潤における PGE 作用 :

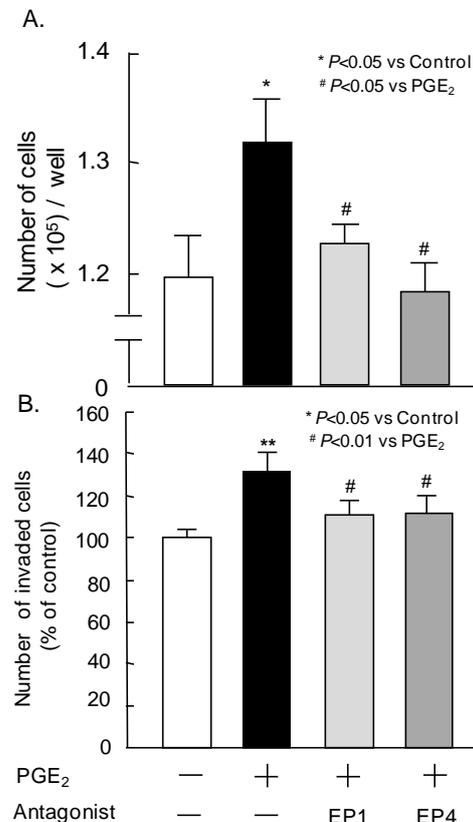


図3. 4T1 の増殖、浸潤に対する PGE₂ および EP1/EP4 アンタゴニストの影響

マウス乳がん細胞(4T1)を培養し、その増殖と浸潤活性に対する PGE の影響を調べた。その結果、4T1 細胞の増殖は PGE 添加により有意に上昇し、EP1 アンタゴニストあるいは EP4 アンタゴニストを併用添加すると、PGE による増殖亢進が抑制された。4T1 細胞の浸潤活性は、PGE 添加により有意に促進された。その効果は、EP1 アンタゴニストあるいは EP4 アンタゴニストの併用添加により部分的かつ有意に抑制された(図 3)。

②骨転移モデルと骨破壊：

4T1 細胞をマウス頸骨に移入して骨転移巣モデルを確立し、移植 8 日後、頸骨を採取した。マイクロCTを用いて、骨3次元解析を行なったところ、頸骨近位部の海綿骨が骨吸収亢進により顕著に消失し、骨破壊が観察された(図 4)。骨転移巣では、局所 PGE 産生・骨吸収・mPGES および COX-2 遺伝子誘導が観察された。

③EP1~EP4 アンタゴニストの効能評価：

4T1 移入実験において、マウスに EP4 アンタゴニストを皮下投与し、骨破壊への有効性を評価した。マイクロCT解析において、乳がん細胞による海綿骨の破壊は EP4 アンタゴニストの投与によりほぼ完全に正常化しており、顕著な骨破壊抑制効果を示した(図 4)。

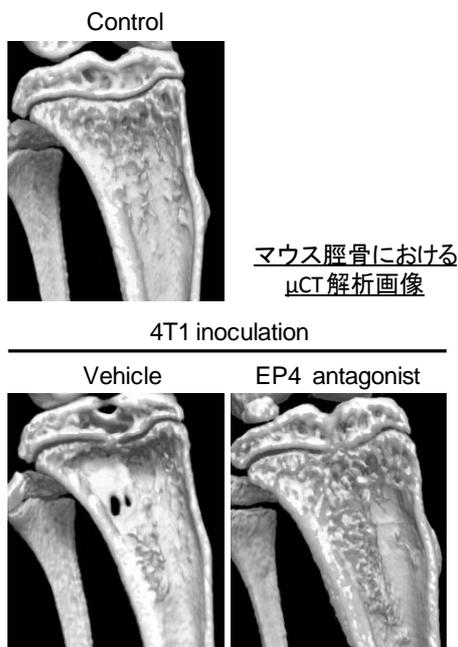


図4. 4T1 細胞の骨破壊に対する EP4 アンタゴニストの作用

(3) ヒト前立腺がん骨転移系の確立

ヒト前立腺がん細胞(LNCaP)をヌードマウスに移入し、骨転移と骨転移が高率に発生する細胞株を確立した。転移巣では、顕著に

骨破壊が観察された。また、前立腺癌では、乳がんの場合と異なり、移入する細胞数によっては、部分的に骨形成が促進される傾向が認められた。

(4) 考察

本研究課題ではメラノーマ、乳がんおよび前立腺がんについて、その増殖・浸潤を培養系で検討すると共に、血管新生と骨転移・骨破壊について、マウス移入系 In vivo 解析を行なった。特に、PGE を産生できないマウスとして mPGES 欠損マウスを用いた解析によって、宿主細胞が産生する PGE の役割を解析した。その結果、当該マウスでは、腫瘍形成が顕著に抑制され、血管新生因子 VEGF の産生も低下していたことから、宿主が産生する PGE ががんの増殖・転移に大きく影響することを明らかにした。

また、乳がんと前立腺がんはヒト症例において、骨転移やすく、骨破壊による骨関連事象が予後悪化の要因となっている。本研究では、乳がんおよび前立腺がんを移入した骨組織では顕著な骨破壊が起こること、乳がんによる骨破壊は EP4 アンタゴニストの投与で改善することを見出した。従って、EP4 アンタゴニストが新たな転移抑制剤となる可能性を示している。今後は、全身転移系において、各種臓器への転移への有効性を評価する必要がある。これらデータの蓄積により、EP4 アンタゴニストによる創薬展開が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Nishide Y, Tadaishi M, Kobori M, Tousen Y, Kato M, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y.: Possible role of S-sequol on bone loss via amelioration of inflammatory indices in ovariectomized mice. J. Clin. Biochem. Nutr. In Press 2013 査読有
2. Matsumoto C, Ashida N, Yokoyama S, Tominari T, Hirata M, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Inada M, Miyaura C: The protective effects of β -cryptoxanthin on inflammatory bone resorption in a mouse experimental model of periodontitis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77(4):860-862, 2013 査読有
3. Nishide Y, Tousen Y, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y: Bi-phasic effect of equol on adipocyte differentiation of MC3T3-L1 cells. Biosci. Biotechnol.

- Biochem. 77(1): 201-204, 2013 査読有
4. Matsumoto C, Oda T, Yokoyama S, Tominari T, Hirata M, Miyaura C, Inada M: Toll-like receptor 2 heterodimers, TLR2/6 and TLR2/1, induce prostaglandin E production by osteoblasts, osteoclast formation and inflammatory periodontitis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 428(1) :110-115, 2012 査読有
 5. Toriseva M, Matti Laato M, Carpén O, Ruohonen ST, Savontaus E, Inada M, Krane SM, Kähäri VM: MMP-13 Regulates Growth of Wound Granulation Tissue and Modulates Gene Expression Signatures Involved in Inflammation, Proteolysis, and Cell Viability. PLoS One. 7: e42596, 2012 査読有
 6. Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Inada M, Miyaura C: Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis. J. Pharmacol. Sci. 119(4): 390-394, 2012 査読有
 7. Kobayashi M, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, Inada M and Miyaura C: The correlation between postmenopausal osteoporosis and inflammatory periodontitis regarding bone loss in experimental models. Exp. Anim. 61(2):183-187, 2012 査読有
 8. Kobayashi M, Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, Inada M and Miyaura C: Capsaicin, a TRPV1 ligand, suppresses bone resorption by inhibiting the prostaglandin E production of osteoblasts, and attenuates the inflammatory bone loss induced by lipopolysaccharide. ISRN. Phamacol. 2012: 439860, 2012 査読有 doi: 10.5402/2012/439860.
 9. Harada S, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Takita M, Inada M, Miyaura C: Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, suppresses bone resorption by inhibiting NF κ B-dependent prostaglandin E synthesis in osteoblasts, and prevents bone loss due to estrogen deficiency. J. Pharmacol. Sci. ;115(1):89-93, 2011 査読有
 10. Hirata M, Kobayashi M, Matsumoto C, Miyaura C, Asakura T, Inada M: Cell

Shape and Matrix Production of Fibroblasts cultured on fibroin-organized scaffold with type-II -turn structured (Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly)_n sequences. J. Health Sci. 56(6): 738-744, 2010 査読有

[学会発表] (計 54 件)

1. 増田光章, 横山智史, 渡邊健太, 平田美智子, 宮浦千里, 稲田全規: In Vivo イメージングによる乳癌増殖の経時的な全身解析法, 第 85 回日本生化学会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡国際会議場
2. 横山智史, 松本千穂, 平田美智子, 丸山隆幸, 宮浦千里, 稲田全規: 乳癌骨転移における宿主反応と PGE2/EP4 シグナルの関与, 第 85 回日本生化学会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡国際会議場
3. Yokoyama S, Watanabe K, Hirata M, Matsumoto C, Maruyama T, Miyaura C, Inada M: PGE2 Regulates Breast Cancer Proliferation and Osteoblastic RANKL Production in a Part of Bone Metastasis through its Receptor Subtype of EP4. American Society For Bone and Mineral Research 2012, 2012 年 10 月 12 日~15 日, Minneapolis Convention Center, Minnesota, USA
4. Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Miyaura C, Inada M: Angiogenesis with Bone Malignant Melanoma Induces Production of Prostaglandin E2 in Host Stromal Cells. American Society For Bone and Mineral Research 2012, 2012 年 10 月 12 日~15 日, Minneapolis Convention Center, Minnesota, USA
5. Takita M, Yokoyama S, Inada M, Miyaura C: Host-derived Prostaglandin E Regulates Bone Metastases of Malignant Melanoma through Angiogenesis. American Society For Bone and Mineral Research 2011, 2011 年 9 月 16 日~20 日, San Diego Convention Center, California, USA
6. Yokoyama S, Takita T, Maruyama T, Miyaura C, Inada M: Role of Prostaglandin E Receptor EP4 in Breast Cancer Growth and Osteolysis Due to Bone Metastasis, American Society For Bone and Mineral Research 2010, 2010 年 10 月 15-19 日, Ontario, Canada

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮浦 千里 (MIYAURA CHISATO)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：20138382

(2)研究分担者

稲田 全規 (INADA MASAKI)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80401454

平田 美智子 (HIRATA MICHIKO)
東京農工大学・大学院工学研究院・講師
研究者番号：40544060

(3)連携研究者

なし