

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590069

研究課題名(和文) 癌の増殖と転移におけるコラーゲン分解と3型コラゲナーゼ/MMP13の関与

研究課題名(英文) The role of collagenolytic matrix metalloproteinase 13 (MMP13) in cancer growth and metastasis.

研究代表者

稲田 全規 (MASAKI, INADA)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80401454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マトリックスメタロプロテナーゼ13(MMP13)は骨や軟骨の基質であるコラーゲンを分解する酵素であり、我々は遺伝子欠損マウス(MMP13KO)を世界に先駆けて作製した。本課題では、種々の癌種の転移と腫瘍形成において、転移能を有する癌細胞転移系を用いたメカニズム解析法を確立し、宿主が産生するMMP13の癌転移における関与を示唆した。これら知見により、MMP13阻害剤の創薬展開への可能性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Matrix metalloproteinase 13(MMP13) is key enzyme to cleave collagen, that is the substrate for bone and cartilage. Recently we generated gene deficient mice of MMP13 (MMP13KO). In this investigation, we examined the role of the host produced MMP13 in tumor metastasis and formation in various species of cancer, that was using newly establishing methods of evaluation model of cancer metastasis. These findings indicated that the potential for drug development of MMP13 inhibitors in clinical use.

研究分野：歯科医学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：MMP13 コラゲナーゼ 骨 軟骨 癌

1. 研究開始当初の背景

3 型コラーゲナーゼ (マトリックスメタロプロテナーゼ 13: MMP13) は骨・軟骨の主基質であるコラーゲンを分解する酵素である。申請者の稲田は、MMP13KO マウスを世界に先駆けて作出し、MMP13 が欠失するとコラーゲン分解に異常をきたすこと、発生期における内軟骨性骨化と血管侵入を伴った骨髄形成が遅延すること、短小かつ骨太な異常な骨の形態を示すこと、II 型コラーゲンを多く含む軟骨層の異常過形成を示すことを見出し、それら表現型を論文報告した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., J. Clin. Invest., J. Biol. Chem., Bone)。また、これまでの科学研究費の基盤研究において、骨粗鬆症の発症における MMP13 の役割を解析し、MMP13KO マウスでは骨コラーゲンの分解不全により、骨粗鬆症を発症しない可能性を見出した。MMP13KO マウスはコラーゲン分解を伴う疾患における MMP13 の役割解明に極めて有用な実験系である。申請者は、癌の転移と腫瘍形成における B16 メラノーマを用いた実験系を確立し、骨転移巣では、MMP13 やプロスタグランジン E(PGE) の産生が亢進すること (FEBS Lett.)、PGE 合成酵素 (mPGES) 欠損マウスは炎症による骨破壊を起こさず (J. Immunol.)、転移や腫瘍形成が減弱することを見出した。さらに、最近、申請者は、MMP13KO マウスに B16 メラノーマを移入したところ、皮下腫瘍形成が抑制されることを見出した。MMP13 の欠失により、腫瘍の血管新生が抑制された。したがって、癌細胞の転移巣の形成と組織破壊、血管新生、骨破壊、腫瘍形成などの過程に宿主細胞が産生する MMP13 が必須因子となっていると考えられる。これらの研究成果を基盤とし、本課題では、MMP13 欠損マウスを用いて、癌の転移と腫瘍形成における宿主由来 MMP13 の役割を解明すると共に、高率に骨と肺へ転移する癌種を用いた実験系、また新規 MMP13 阻害剤の投与効果を検証し、癌の増殖と転移阻止の創薬展開につなげたい。

2. 研究の目的:

申請者は本酵素の遺伝子欠損マウス (MMP13KO) を世界に先駆けて作成し、MMP13 が骨の組織破壊に必須な酵素であることを明らかとした。さらに近年、癌の増殖と転移における MMP13 の関与が示唆されているがその詳細は不明である。最近、申請者は悪性黒色腫を用いた癌の増殖実験において、腫瘍形成と組織破壊が MMP13KO において起こらない可能性を得た。そこで本課題では、この新知見を基盤とし、癌の転移と腫瘍形成における宿主が産生する MMP13 の関与と MMP 阻害剤の効果を明らかにする。さらに、癌の転移と腫瘍形成について、MMP13 の関与を解析し、癌の増殖と転移を標的とした新規治療薬の開発へとつなげる。本研究課題の特色は、(1) 癌の転移と腫瘍形成について、宿主が産生する MMP13 に着目した実験を行なう点、(2)

MMP13 の作用メカニズム解析を癌細胞の浸潤と血管新生に着目して解明する点、(3) In vivo 発光イメージング解析法を駆使する点、(4) 癌細胞の高転移系を活用した解析法の確立 (5) 新規 MMP 阻害剤を用いた創薬展開を進める点である。転移における血管新生をコラーゲン分解に着目した解析はこれまでに類がなく、極めて独創的である。本研究により、癌の増殖と転移における MMP13 の役割の解明が進み、新規 MMP13 阻害剤を活用した創薬展開が進めば、癌の克服への道が拓ける点が極めて意義深い。

3. 研究の方法

癌細胞を MMP13 遺伝子欠損マウスあるいは野生型マウスに移入し、骨転移・肺転移と固形腫瘍形成を比較する。In vivo 解析では、発光イメージング、骨転移巣の骨吸収、肺転移のコラーゲン分解、腫瘍の血管新生を、In vitro 解析では、骨芽細胞による RANKL (破骨細胞誘導因子) 発現や線維芽細胞による血管新生誘導因子 (VEGF) 発現の MMP13 依存性を解析した。また、各種癌腫の骨および肺へ 100% の確率で転移する高転移株を株化・維持し、ヌードマウスへの移入実験を行った。骨転移・肺転移と固形腫瘍形成について In vivo 解析した。MMP13 産生と癌細胞の浸潤、VEGF 依存の血管新生に着目した In vitro 解析も行おこなった。最終年度には、研究協力者と共同開発した、MMP 阻害剤試験を実施し、骨破壊について評価して、転移抑制剤としての創薬展開を試行した。

4. 研究成果

MMP13 遺伝子欠損マウスを用いた骨転移・肺転移と固形腫瘍形成における宿主 MMP13 の役割解析を行った。マウス悪性黒色腫細胞を MMP13 遺伝子欠損マウスならびに野生型マウスに移入すると、MMP13 欠損マウスでは転移や皮下固形腫瘍の形成が顕著に抑制されることを見出した。さらに、宿主由来 MMP13 の役割解明を目的とし、詳細な In vivo 解析および In vitro 解析を行なった。

In vivo 解析では、マウスの尾静脈より B16 メラノーマ細胞を移入し、骨転移と肺転移を起こさせ、In vivo 発光イメージング解析により転移の発生と組織破壊を観察した。大腿骨を採取し、骨密度を測定し、マイクロ CT 解析および組織切片を用いた骨形態計測により、骨転移による骨破壊を定量化した結果、MMP13 欠損マウスで骨転移が起こりにくい可能性が示唆された。また、癌腫の皮下移入により固形腫瘍を形成させ、ルシフェラーゼ遺伝子導入による発光イメージングおよび、血管新生をアンジオセンス法により蛍光イメージング解析した。(図 1)。

これら実験の確立により、癌転移 In vivo イメージング評価系を確立した。

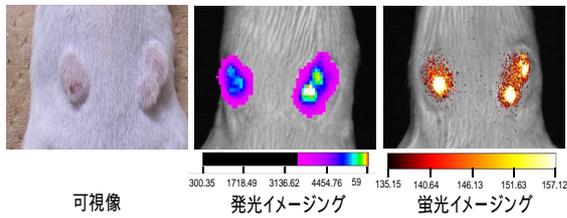


図1 . In vivo イメージング実験系の確立
(左)可視像、(中)発光イメージング (右)蛍光イメージング

続いて、In vitro メカニズム解析では、MMP13 遺伝子欠損マウスならびに野生型マウスより、骨芽細胞および皮膚線維芽細胞を採取し、初代培養した。B16 を固定し、細胞接着させると骨芽細胞からの MMP13 産生が誘導されることを見出した(図2)。破骨細胞誘導因子(RANKL)の遺伝子発現、線維芽細胞による血管新生誘導因子(VEGF)の産生を解析し、骨や肺におけるコラーゲン分解と組織破壊、血管新生における宿主細胞由来 MMP13 の役割を解析したところ、MMP13 は骨や肺におけるコラーゲン分解と組織破壊、血管新生の亢進に伴ってその発現を亢進した。

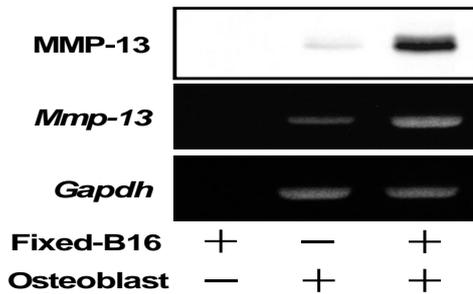


図2 . In vitro 解析系の確立
(上)MMP-13 ウェスタンブロッティング像、(下)RT-PCR 法による Mmp-13、Gapdh の mRNA 発現解析

また、癌細胞を用いた骨転移・肺転移と固形腫瘍形成の評価系の確立と評価を行った。前立腺癌細胞をマウスに移入し、転移実験を繰り返して、高確率で骨と肺に転移する細胞株を得た。それらをマウスに移入し、骨転移、肺転移および固形腫瘍における MMP13 産生・骨破壊・コラーゲン分解、血管新生について、In vivo 解析を行った。これら解析の結果より、In vivo イメージングを用いた解析法の確立と前立腺癌の移動に伴うマトリクス変化を観察する基盤の構築が可能となった(図3)。

さらに、新規 MMP 阻害剤を用いた転移抑制剤の試験として、器官培養系を用いた癌細胞と骨の接触実験による実験系を用いて試験を行った。前立腺癌細胞をマウス頭頂骨と共存培養すると、MMP13 の産生上昇とともに骨吸収が亢進し、MMP の阻害剤の投与により、

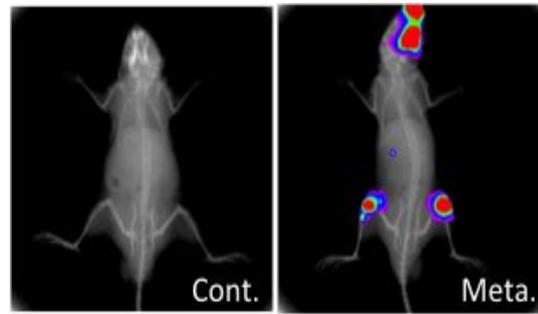


図3 . In vivo 転移系解析
(左)対照群、(右)癌転移群

骨吸収の亢進は抑制された。本研究により、癌の転移と増殖における癌細胞誘導性の宿主由来 MMP13 は組織及び骨組織破壊に与与する事が明らかとなった。

考察

MMP13は癌の浸潤転移におけるECM破壊、さらに骨や軟骨の基質であるコラーゲンを分解する酵素であり、癌転移における転移と組織破壊への関与が考えられてきた。本課題では、種々の癌種の転移と腫瘍形成において、転移能を有する癌細胞転移系を用いたメカニズム解析法を確立し、宿主が産生するMMP13の癌転移における関与を示唆した。これら知見により、癌転移における組織破壊、骨破壊の抑制を担う、MMP阻害剤の創薬展開への可能性が示唆された。

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11件)

1. Nishide Y, Tadaishi M, Kobori M, Tousein Y, Kato M, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y.: Possible role of S-equol on bone loss via amelioration of inflammatory indices in ovariectomized mice. J. Clin. Biochem. Nutr. 査読有,53(1):41-48, 2013
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 -cryptoxanthin on inflammatory bone resorption in a mouse experimental model of periodontitis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有, 77(4):860-862, 2013
3. Nishide Y, Tousein Y, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y: Bi-phasic effect of equol on adipocyte differentiation of MC3T3-L1 cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有,77(1): 201-204, 2013

4. Miyamoto S, Koyanagi R, Nakazawa Y, Nagano A, Abiko Y, Inada M, Miyaura C, Asakura T: Bombyx mori silk fibroin scaffolds for bone regeneration studied by bone differentiation experiment. J. Biosci. Bioeng. 査読有, 115(5) : 575-578, 2012, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.11.021.
 5. 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. 査読有, 428(1):110-115, 2012, doi:10.1016/j.bbrc.2012.10.016.
 6. 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. 査読有, 7: e42596, 2012
 7. Abe J, Nagai Y, Higashikuni R, Iida K, Hirokawa T, Nagai H, Kominato K, Tsuchida T, Hirata M, Inada M, Miyaura C, Nagasawa K.: Synthesis of vitamin D(3) derivatives with nitrogen-linked substituents at A-ring C-2 and evaluation of their vitamin D receptor-mediated transcriptional activity. Org Biomol Chem. 査読有, 10(38):7826-7839, 2012, doi:10.1039/c2ob26017d
 8. 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. 査読有, 119(4): 390-394, 2012
 9. 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. 査読有, 61(2):183-187, 2012
 10. Kobayashi M, Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, Inada M and Miyaura C: Capsaicin, a TRPV1 ligand, suppresses bone resorption n by inhibiting the prostaglandin E production of osteoblasts, and attenuates the inflammatory bone loss induced by lipopolysaccharide. ISRN. Pharmacol. 査読有, 2012: 439860, 2012, doi: 10.5402/2012/439860.
 11. Harada S, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Takita M, Inada M, Miyaura C: Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, suppresses bone resorption by inhibiting NF B-dependent prostaglandin E synthesis in osteoblasts, and prevents bone loss due to estrogen deficiency. J. Pharmacol. Sci. 査読有, ;115(1):89-93, 2011
- [学会発表](計60件 6件抜粋)
1. Yokoyama S, Watanabe K, Hirata M, Matsumoto C, Maruyama T, Miyaura C, Inada M: PGE2 receptor EP4 regulates breast cancer metastasis and bone resorption through osteoblastic RANKL production. 10/4 17:45~19:00 FR0459 Plenary Sessions(口頭発表) ASBMR 2013 Annual Meeting, October 4-7, 2013 Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland, USA.
 2. Yokoyama S, Watanabe K, Hirata M, Matsumoto C, Maruyama T, Miyaura C, Inada M: PGE2 receptor EP4 regulates breast cancer metastasis and bone resorption through osteoblastic RANKL production. 10/5 12:00~14:00 PMSA0459 Poster Sessions(ポスター) ASBMR 2013 Annual Meeting, October 4-7, 2013 Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland, USA.
 3. Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Inada M, Miyaura C: Bone metastatic melanoma promotes angiogenesis with the production of prostaglandin E2 by host stromal cells. 10/7 12:00~14:00 M00148 Poster Sessions(ポスター) ASBMR 2013 Annual Meeting, October 4-7, 2013 Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland, USA.
 4. 横山智史, 瀧田守親, 萩谷 洋, 丸山隆幸, 宮浦千里, 稲田全規: 乳癌の骨転移と骨破壊には PGE/EP4 シグナルが関与する 第30回日本骨代謝学会 2012年7月21日(土) 8:00~9:00 口演 11「癌と骨病変」, 京王プラザホテル(東京都)
 5. 横山智史, 宮浦千里, 稲田全規: 乳癌骨転移における癌と宿主の双方向的な EP4 シグナルの関与, 第15回癌と骨病変研究会, 2012年11月2日, 千代田放送会館(東京都)
 6. 稲田全規: 骨粗鬆症の動物モデル解析と最近の知見, 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012年10月26日~27

日(講演 10/27),名古屋国際会議場(愛知県)

〔図書〕(計7件 4件抜粋)

1. 松本千穂、稲田全規、宮浦千里：リコペンの骨代謝調節作用とその応用 骨研究最前線：アンチエイジングシリーズ No.3 P417～423 2013
2. 松本千穂、稲田全規、宮浦千里：食品由来因子による骨の健康増進：ルテインの骨作用に着目して 内分泌・糖尿病・代謝内科：36巻4号：330 336,2013
3. 稲田全規、宮浦千里：卵巣摘出動物および精巣摘出動物 Clinical Calcium21 :164-170, 2011
4. 稲田全規、宮浦千里：サイトカインと閉経後骨粗鬆症 Clinical Calcium 20 :19-24, 2010

〔産業財産権〕

出願状況(計3件 1件抜粋)

名称：骨疾患予防又は治療用組成物
発明者：稲田全規、宮浦千里
権利者：国立大学法人東京農工大学
種類：特許
番号：特許願 2011-102052 号
取得年月日：23年4月28日
国内外の別：国内

取得状況(計4件 1件抜粋)

名称：経口摂取が可能な天然成分由来の抗がん剤
発明者：稲田全規、宮浦千里
権利者：国立大学法人東京農工大学
種類：特許
番号：特許第 5288397 号
取得年月日：25年6月14日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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