

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659870

研究課題名（和文） がん細胞が発現する骨微小環境クロストーク遺伝子の同定

研究課題名（英文） Identification of genes involved in biological crosstalk between cancer and bone

研究代表者

米田 俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：80142313

研究成果の概要（和文）：

がんの骨転移成立過程においては、転移がん細胞と骨微小環境との生物学的クロストークの重要性が認識されている。本研究では、このクロストークの実体を分子レベルで理解することを目的に、骨微小環境に定着した乳がん細胞に誘導される分子の同定と骨転移過程におけるその役割について検討した。その結果 158 個の遺伝子を骨微小環境とのクロストークによって発現が上昇する遺伝子として同定した。その中で、骨から放出された TGF- $\beta$  によって発現が上昇する NEDD9 は乳がんの骨転移成立・進展に関与すること示唆された。本研究で用いた遺伝子プロファイリングにより骨-がん細胞のクロストークに関与する遺伝子の同定が可能となり、それらの遺伝子の解析は骨転移の分子標的治療の開発に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Crosstalk between cancer cells and bone microenvironments is critical to the development and progression of bone metastases. To determine the molecular basis of bone metastasis, we attempted to uncover the molecules that are expressed in breast cancer cells under the influences of bone microenvironments. We have identified 154 genes by microarray analysis. We found that docking protein NEDD9 that is up-regulated by bone-derived TGF- $\beta$  is critical to the development of bone metastasis. Further determination of the function of genes identified by this study may lead to design new molecular therapeutic approaches for the treatment of bone metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨転移、乳癌細胞、

## 1. 研究開始当初の背景

抗癌療法の格段の進歩により、原発癌自体での癌患者が死亡することは稀となり、ほとんどの場合他臓器への遠隔転移が死亡の最大の原因となっている。したがって、現在および今後の癌治療の最大の目標は臓器転移の制御であるといっても過言ではない。乳癌、前立

腺癌をはじめとする固形癌の進行期においては骨への転移が見られる。骨転移は直接生命を脅かすことは少ないが、激しい痛みと運動制限を伴うため、患者の QOL は著しく低下する。乳癌はすでに我が国の女性において発生率が第 1 位となっており、骨転移の治療は今後その重要性が増すと予測される。

骨は血流という観点からすると必ずしも転移が好発する部位とは考えにくく、骨転移は癌細胞と転移先臓器である骨微小環境との相互作用（クロストーク）の上に成立する病変と捉えることができる。実際、最近では骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネートが骨転移治療に用いられ良好な治療効果を得ているが、ビスフォスフォネートは抗腫瘍効果をほとんど有しない。したがって、骨転移の病態メカニズムの解明と治療・創薬への応用には、癌細胞と骨微小環境との生物学的相互作用を分子レベルで理解する必要がある。

骨微小環境には骨芽細胞や破骨細胞に加えて、血液細胞、骨髄ストローマ細胞、脂肪細胞が存在しており、細胞接着因子を介した直接的相互作用、または分泌タンパクを介した間接的相互作用の存在が推察される（図参照）。さらに、生理的条件下において骨は生体の中でもっとも多様、かつ豊富に増殖因子を含む組織であり、特に破骨細胞が骨を吸収することにより骨に放出される IGF や TGF- $\beta$  の量は他の組織と比べて抜きん出て多い。骨微小環境下に存在する転移癌細胞は、このような骨特異的な環境とのクロストークにより、骨選択的転移能を獲得していると予測されるその一つのモデルとして、TGF- $\beta$  を介した転移癌細胞と破骨細胞の悪性サイクルモデルが提唱されている。しかし複雑な骨微小環境の生物学的特性を考慮した場合、この悪性サイクルのみが骨転移の進展に関与していると考えるのは不可能であり、他の経路を介したクロストークの存在が強く推察される。そして、そういった骨微小環境を理解するには試験管内の情報だけではなく、生体内において分子が時間的・空間的にどのような機能動態を取っているかを知る必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究においては生体内で転移癌細胞と骨微小環境が形成するクロストークの詳細を分子レベルで解明することを最大の目的に、まず生体内の骨微小環境下における転移癌細胞のみを FACS を用いて直接分離する実験系の確立を行う。得られたサンプルを、In Vitro での細胞培養ステップを経ることなくその遺伝子動態を解析し、癌細胞と骨の直接的ならびに間接的相互作用の全貌を明らかにする。そして、転移好発臓器の一つである骨とはどのような環境であり、その環境を転移癌細胞がどのように利用し、変化、適応するのか、一方変化した転移癌細胞は骨環境をどのようにコントロールするのかを In Vivo

で解明する。

## 3. 研究の方法

本研究はまず、①骨転移巣ならびに原発巣から癌細胞を直接分離し細胞培養を経ずに解析を行った。そして、②骨微小環境により発現が変動する遺伝子を骨微小環境クロストーク遺伝子として同定し、骨転移におけるその機能的役割を In Vitro、In Vivo の両面から解析した。

### ①骨転移巣ならびに原発巣からの癌細胞の直接分離とその遺伝子プロファイリング

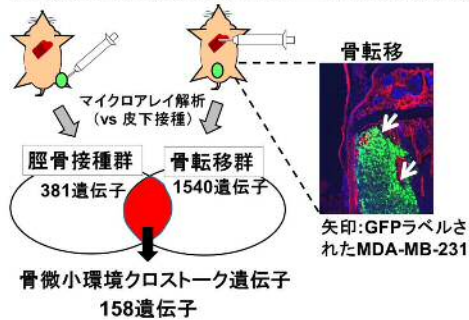
GFP ラベルした骨転移能を有するヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞をヌードマウス脛骨髄腔内に接種し骨環境に癌細胞を定住させた（脛骨接種群）。また、骨指向性 MDA-MB-231 細胞クローンを GFP ラベルした後、ヌードマウス左心室に接種し骨転移巣を形成させた（骨転移群）。コントロールとして GFP ラベルした MDA-MB-231 細胞を乳腺接種した皮下腫瘍を形成させた（皮下接種群）。皮下接種群、脛骨接種群および骨転移群のそれぞれから、GFP 陽性の癌細胞のみを BD 社製 FACS Aria を用いて分離し、通法に従って RNA を回収しマイクロアレイ解析を行った。本研究では骨微小環境を保ったままの遺伝子発現を解析するために、In Vitro での細胞培養を行わない。

骨微小環境で発現が上昇する遺伝子を絞り込んだ後、骨転移過程におけるこれら遺伝子の機能的役割について検討を行った。具体的には、免疫染色法による発現の確認、レンチウイルスによる過剰発現または shRNA による遺伝子ノックダウンが骨転移に及ぼす影響、また癌細胞特性への影響などについて検討した。本研究では、可能な限り In Vivo での解析を行うために、骨転移の定量的評価はルシフェラーゼ遺伝子を用いた in vivo 発光イメージングにより行った。

## 4. 研究成果

遺伝子プロファイリングを行った結果皮下接種群と比較して発現量が 2 倍以上に上昇した遺伝子が脛骨接種群で 381 個、骨転移群で 1540 個同定され、両群に重複する 158 個の遺伝子を骨微小環境クロストーク遺伝子として同定された。（図参照）

＜骨微小環境と癌のクロストーク遺伝子の同定＞



158 遺伝子の中にはすでに骨転移への関与が報告されている PTHrP、COX-2 および SMAD7 が含まれており、我々のクローニングシステムが有効であることを意味する。

遺伝子プロファイリングにより同定された遺伝子群を発現上昇率の高さおよび機能別分類から、①細胞接着因子としてプロトカドヘリン・10(PCDHB10) および Integrin・5(ITB5)、②分泌タンパクとして EGF ファミリーに属する Epregrulin(EREG)、③転写因子として DEC1 および核内受容体 NR4A3、④細胞遊走に関与する因子として NEDD9 を絞り込んだ。

免疫染色により骨転移巣において NEDD9 の強い発現が認められたが、乳腺部の腫瘍には NEDD9 の発現は見られなかった。shRNA による NEDD9 のノックダウンは骨転移を有意に減少させる一方で、NEDD9 の過剰発現は骨転移巣における破骨細胞数を増加させ骨転移を促進した。NEDD9 は TGFβにより著明な発現誘導が見られ、またその過剰発現は乳がん細胞の細胞遊走能を亢進したことから、NEDD9 はがん細胞の上皮間葉転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) に関与していると推察された。ヒト乳がん細胞 MCF-7 に NEDD9 を過剰発現させたところ、MCF-7 細胞の上皮細胞形態は間葉系細胞形態へと変化し、また上皮系マーカーの E-Cadherin の発現も抑制された。さらに興味深いことに、最も強力なビスホスネートであるゾレドロン酸投与は、骨内で増殖する MDA-MB-231 乳がん細胞での NEDD9 発現を減少させた。以上の結果より骨微小環境下において TGFβにより発現誘導される NEDD9 は乳がん細胞の EMT を促進することにより乳がん細胞の転移能を高めることが示唆された。

本研究は骨微小環境と転移癌細胞の相互作用をより生体に近い状態で解析することが可能となり、新たな治療法の開発においても臨

床に近い有用な基礎的知見となることが期待される。

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 3 件)

1. Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases. Hiraga T, Myoui A, Hashimoto N, Sasaki A, Hata K, Morita Y, Yoshikawa H, Rosen CJ, Mundy GR, Yoneda T *Cancer Research* 72 2012 4238-4249 査読有り

2. Stathmin is involved in the cooperative effect of zoledronic acid and gefitinib on bone homing breastcancer cells in vitro Oda M, Iwaya K, Kikuchi R, Kobayashi T, Yoneda T, Nishikawa, Matsubara O, Kohno N. *J Bone Oncol* 1 2012 40-46 査読有り

3. The α3 isoform vacuolar type ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells Nishisho T, Hata K, Nakanishi M, Morita Y, Sun-Wada GH, Wada Y, Yasui N, Yoneda T. *Mol Cancer Res* 9(7) 2011 845-855 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1. 田中宗一

骨内での癌細胞の上皮間葉転換EMTにおける脱ユビキチン化酵素USP45の役割  
第15回癌と骨病変研究会 2012年11月2日 東京

2. 米田俊之 骨転移の分子メカニズム

第27回日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演)  
2012年10月26日～2012年10月27日 名古屋

3. 米田俊之 骨転移メカニズムとそのマネージメント

第57回日本口腔外科学会総会・学術大会 (招待講演) 2012年10月19日～2012年10月21日 横浜

4. Soichi Tanaka, Kenji Hata, Toshiyuki Yoneda

The De-ubiquitinating Enzyme USP45 Is Critical to Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) in Breast Cancer Cells Colonized Bone

米国骨代謝学会 2012年10月12～15日 ミネアポリス

5. 米田俊之 骨微小環境と癌  
第30回日本骨代謝学会（招待講演）  
2012年07月19日～2012年07月21日 東京

6. 米田俊之 骨は癌の隠れ家  
第112回日本外科学会定期学術集会（招待講演）  
2012年04月12日～2012年04月14日 千葉

7. Kenji Hata, Yoshihiro Morita, Jin Mushiake, Masako Nakanishi, Toshihiko Nishisho, Toshiyuki Yoneda  
The adaptor protein NEDD9 is a novel regulator of cancer and bone crosstalk in breast cancer metastasis to bone  
2011 CIBD meeting 2011年12月4日 Chicago, USA

8. 波多賢二, 森田祥弘, 中西雅子, 西庄俊彦, 虫明仁, 由良義明, 米田俊之  
NEDD9は乳がん細胞の上皮間葉転換を促進する癌と骨病変研究会 2011年11月18日 東京

9. 米田俊之 骨は癌細胞のチューター  
第29回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）  
2011年7月30日 大阪

〔図書〕（計1件）

1. 米田俊之、田中宗一、波多賢二  
「がん骨転移のバイオロジーとマネジメント」医薬ジャーナル 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米田 俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)  
大阪大学・歯学研究科・招へい教員  
研究者番号：80142313

### (3) 連携研究者

波多 賢二 (HATA KENJI)  
大阪大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号：80444496

田中 宗一 (TANAKA SOICHI)  
大阪大学・歯学研究科・助教  
研究者番号：20548200