

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890005

研究課題名(和文) 前骨芽細胞の破骨細胞分化ニッチェ形成に対する骨代謝ホルモンの作用

研究課題名(英文) Effect of bone metabolism hormone on osteoclast differentiation niche of pre-osteoblast

研究代表者

山田 珠希 (yamada, tamaki)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80580943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞分化に対するニッチェ形成を行う前骨芽細胞系ネットワークを微細構造学的・組織化学的に明らかにした。研究を遂行するにあたり、乳癌骨転移モデルを用いて検索を行った。骨端部では癌細胞が浸潤している周囲の骨表面にTRAPとALPの陽性細胞が多数認められ、骨破壊部位では破骨細胞と骨芽細胞の活性化を認めた。さらに、今回の研究では不明な点が多くある骨細胞にも着目して解析を行なった。癌細胞が転移した周囲の骨細胞では、骨細胞産生因子であるFGF23およびSOSTの発現の低下を示した。骨転移巣では、骨細胞も影響を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have investigated niche of pre-osteoblasts network about differentiation of osteoclasts using micromorphology and histochemical methods. We were performed by means of bone metastasis of breast cancer model. The sections of femur with osteolysis lesions indicated that metastatic breast cancer cells filled the bone marrow cavity and that numerous TRAP-positive multinucleated osteoclasts and ALP-positive osteoblasts aligned along the surface of the cortical bone. Furthermore, in this study, we focused attention on osteocytes which remained poorly understood. In osteocytes-derived factors, both sclerostin and FGF23, immunohistochemical examination revealed that these factors showed weak expression in osteocytes adjacent to bone metastases compared with those adjacent to bone marrow. This result that osteocyte was affected by cancer cells in bone metastasis foci.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学形態系基礎歯科学

キーワード：前骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 破骨細胞の前駆細胞は造血幹細胞に由来し、RANK/RANKL シグナルなどをはじめとする様々な因子で誘導されることが知られている。しかし、生体内において、破骨細胞前駆細胞がどの経路で骨に進入し、どのように分化・成熟するかを明らかにすることは組織学的に重要な課題と思われる。近年、腫瘍巣での破骨細胞の分化・形成において、腫瘍細胞の PTHrP/EGF シグナルが重要な役割を果たすことが報告されている。また、従来の研究の研究より、破骨細胞前駆細胞は前骨芽細胞性ネットワークの中に局在することが多く、前骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞が細胞間で接触を行うことが知られている。

(2) 乳癌や前立腺癌などの骨転移性癌は PTH を過剰に産生し、前骨芽細胞系ネットワークを活性化し、骨転移巣での骨浸潤に関与していることが知られている。近年では、骨浸潤により引き起こされた骨関連事象(痛み、病的骨折など)が問題視されており、これに対して種々の治療薬法の開発がなされている。しかしながら、骨転移巣環境下での癌と骨浸潤を担う前骨芽細胞系ネットワーク間の相互作用の詳細な機序は未だ解明されていないのが現状である。こうした背景から、癌がどのようにして前骨芽細胞系ネットワークに働きかけ、骨浸潤に重要な役割を持つ破骨細胞を分化誘導し活性化させるのかを理解することは重要な課題と考える。

## 2. 研究の目的

破骨細胞分化誘導に重要な役割をもつ前骨芽細胞系ニッチの形成機序に関して分子生物学的さらには組織化学的に解明し、臨床に貢献することを目的とする。骨転移巣における骨代謝を理解することは癌の骨浸潤により引き起こされる骨関連事象の改善だけでなく、骨粗しょう症や骨関連疾患等の病態を把握することが可能であり、それら疾患治療に貢献することを目的とする。

## 3. 研究の方法

免疫不全モデルマウスに骨指向性をもつヒト乳癌細胞を投与し、モデルマウスの下肢骨に転移巣及び骨破壊像を樹立した。その後分子生物学的手法や組織化学的手法を用いて、癌と骨代謝関連群の相互関係や前骨芽細胞系ネットワークの作用に関して検索した。

### (1) 材料

8週齢の BALB/cAJI-nu/nu マウス

MDA-MB-231: ヒト乳癌細胞

研究を実施するにあたり、上記材料を用いて、マウスにヒト乳癌細胞骨転移モデルを作製した。

### (2) 方法

方法としては、マウスの左心室に 26G のシリンジを用いて、 $10^5$  個/ $100 \mu\text{l}$  (PBS 内) に調整した細胞浮遊液を注射した。注射後はマウスを麻酔し、鎮静状態が得られたのち、4~6 週後に軟エックス線を撮影し、骨の転移及び破壊像を確認した。破壊像が確認されたのち、4%パラホルムアルデヒドを用いて、灌流固定及び浸漬固定し、通法に従い、脱灰後パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。その後種々の抗体を用いて組織染色を行なった。また、分子生物学的解析をする目的で癌が骨転移した下肢骨のサンプルを凍結させ、RNA を抽出し、遺伝子解析を行った。検索因子として、TRAP/ALP、FGF23、SOST、DMP-1 を標的因子とした。これらの因子により、骨代謝関連細胞群である骨芽細胞、破骨細胞および骨細胞について組織化学的に解析した。

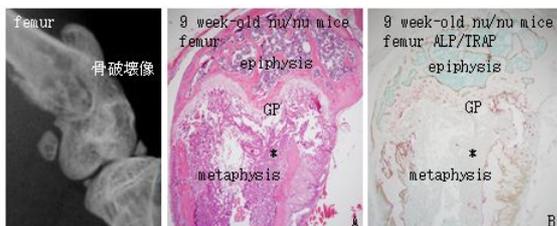
### (3) 期間

マウスに癌細胞を注射し、骨の転移巣が樹立するまでの期間: 4~6 週

骨転移したサンプルはマウスの下肢骨を使用し、脱灰までの期間: 4~6 週

ヒト乳癌細胞と骨転移巣における種々の骨代謝関連細胞との局在や相互関係を検索するには、骨転移巣を樹立し、それからさらに脱灰操作を必要とするため、ある一定の期間

を要した。

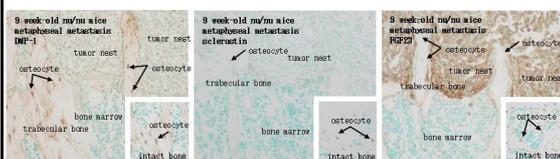


大腿骨の骨幹端及び骨幹には乳癌転移巣を認める (A, B\*)。転移巣周囲の骨表面には多数のTRAP陽性破骨細胞 (赤) 及びALP陽性骨芽細胞 (茶) を認め、骨吸収が活発であることを示す (B)。

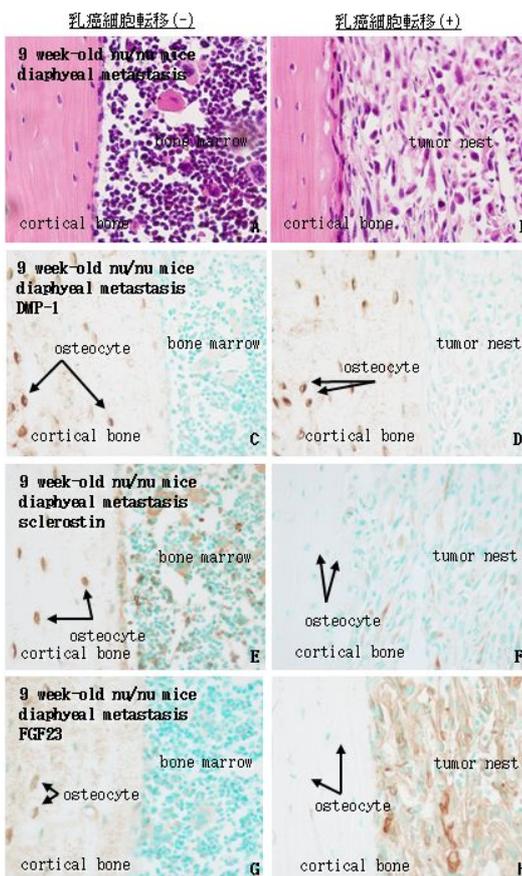
#### 4. 研究成果

ヒト乳癌細胞を免疫不全モデルマウスに注射4週後からマウスの上腕及び下肢骨に骨転移巣が樹立された。このことにより乳癌細胞は骨指向性があると考えられた。骨転移は軟エックス線上での明らかな骨破壊像により確認した。同部位を用いて、解析サンプルとした。下肢骨 (主に大腿骨) への転移巣をサンプルとして解析したが、骨端、骨幹端及び骨幹にヒト乳癌細胞が浸潤し、骨破壊像を呈していた。骨端部では癌細胞が浸潤している周囲の骨表面に TRAP と ALP の陽性細胞が多数認められ、骨破壊を行なっている様相が確認された。さらに骨破壊が進行した骨幹端及び骨幹では骨破壊が著しく、骨梁が喪失し、その代わりにおそらくは代替として類骨様の組織の増生を一部に認めた。こうした骨破壊が進行した部位では TRAP と ALP の陽性細胞を認められなかった。TRAP と ALP の組織染色像から、骨破壊の初期では破骨細胞と骨芽細胞の活性化を認めるが、骨破壊の後期、すなわち一通り骨破壊が終了した時期には両者の活性化を認められず、骨破壊から一転骨増生を認める結果が得られた。今回使用したヒト乳癌細胞は通常は主に骨細胞が産生するといわれている FGF23 を産生していることが判明した。FGF23 は腎臓に作用し、リンの再吸収を抑制すると言われている。今回使用した乳癌細胞が FGF23 を過剰に発現することで、癌による低リン血症やくる病・骨軟化症を引き起こし、癌自身が骨に転移しやすい環境を樹立したと推察された。今回の研究では

不明な点が多くある骨細胞に着目して解析を行なった。近年、骨細胞の骨代謝調節や骨基質ミネラル調節における多数の成果が報告されており、骨代謝の主役の一つとして骨細胞があげられる。乳癌細胞が転移した周囲の骨細胞においては、骨細胞産生因子として知られている FGF23 および SOST の発現の低下を示した。乳癌細胞が転移することにより、骨細胞に影響を及ぼしていることが示唆された。すなわち、骨細胞が乳癌細胞と相互作用している可能性があり、今後は何故 FGF23 や SOST などの骨細胞産生因子の発現が低下しているのかを詳細に検索する必要がある。



腫瘍に隣接した一次骨梁における骨細胞産生因子 (DMP-1: 左, sclerostin: 中央, および FGF23: 右) の免疫染色像。各パネルの白枠内は、正常な骨梁における骨細胞産生因子の局在を示す。腫瘍に隣接した一次骨梁の骨細胞は DMP-1 陽性であるが、スクレロスタンおよび FGF23 陽性反応を示さない。



腫瘍に隣接した皮質骨における骨細胞産生因子 (DMP-1: D, sclerostin: F, および FGF23: H) の免疫染色像。各左パネル (C, E, G) は、正常な皮質骨における骨細胞産生因子の局在を示す。腫瘍に隣接した皮質骨の骨細胞は DMP-1 陽性であるが、スクレロスタンおよび FGF23 は陽性反応を示さない。

## 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)

[学会発表](計2件)

山田 珠希：乳癌骨転移巣における骨細胞産生因子の組織化学的解析、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月20日～9月22日、岡山コンベンションセンター（岡山県）

山田 珠希：乳癌骨転移巣における骨細胞産生因子の組織学的解析、第67回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2013年5月22日～5月24日、栃木県総合文化センター（栃木県）

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 珠希 (YAMADA, Tamaki)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：80580943