

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670841

研究課題名(和文) インターフェロン分解による腫瘍細胞骨転移促進機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pro-metastatic property of interferon degradation

研究代表者

菅崎 弘幸 (Kanzaki, Hiroyuki)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：30333826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ADAMファミリーは腫瘍細胞で高発現されていること、発現量と予後不良度が相関していることが報告されている。また腫瘍細胞は破骨細胞形成を促進し腫瘍細胞周囲での骨吸収を亢進させて骨転移を促す機構が報告されている。本研究では腫瘍細胞による骨吸収抑制性サイトカインであるインターフェロンガンマ分解機構と骨転移能の関連を検索した。

骨吸収抑制性サイトカインならびに腫瘍免疫制御サイトカインとして知られるインターフェロンガンマがADAM17によって分解されることを発見した。

研究成果の概要(英文)：ADAM family enzymes, which are highly expressed in cancer cells, were reported as the prognostic factor of tumor. In addition, some cancer cells favor to metastasize into bone marrow through the induction of osteoclastic bone resorption around cancer cells.

In the present study, we investigated the degradation mechanism of interferon gamma, which shows anti-osteoclastogenic and anti-tumorigenic property, by cancer cells. We discovered ADAM 17 degrades interferon gamma for the first time.

研究分野：骨代謝

キーワード：インターフェロン 腫瘍免疫 サイトカイン 破骨細胞 ADAM17 TACE

1. 研究開始当初の背景

乳がんや前立腺がんなど一部の腫瘍は骨転移を容易に起こし、予後が不良となることが多い。そのためガンは先進国における死因の第1位となっており、その予防・治療法の確立が望まれている。

腫瘍細胞はRANKLなどの破骨細胞分化促進因子を産生し、破骨細胞形成を支持することで腫瘍細胞周囲での骨吸収を促進させて骨転移を行いやすくすることが報告されている(Clin Calcium. 2011;21(8):1159-66)。

さらにRANKL発現量が高いほど骨転移が行われやすいことも報告されている(J Clin Oncol. 2001;19(15):3562-71)。

また申請者は留学先(University of Texas Health Science Center San Antonio)で前立腺ガン骨形成性骨転移の分子生物学的制御機構解明のプロジェクトに参加し、骨形成性骨転移モデル動物へのゾレドロン酸投与により破骨細胞の骨吸収活性を阻害することで骨形成性骨転移を阻止できるデータを得ており、これは骨形成性骨転移においても骨吸収促進がその過程に重要な役割を果たしていることを示唆する。

この骨吸収に関わる破骨細胞はRANKLなどの破骨細胞分化促進因子による正の制御(Biochem Biophys Res Commun. 1999;256(3):449-55)と、インターフェロン

など骨吸収抑制性サイトカインによる負の制御(Nature. 2000;408(6812):600-5)を受けている。

またインターフェロンは、腫瘍組織局所に浸潤したNK細胞から分泌され抗腫瘍免疫において重要なサイトカインであり(Ann Rev Immunol, 2002,20:323-70)、腫瘍組織局

所ではインターフェロン濃度がある程度高いことが推察される。従って、浸潤した腫瘍細胞周囲でインターフェロン濃度が高い条件下では骨吸収が行われにくくそれによって骨転移も妨げられるが、何らかの条件下でインターフェロンが不活性化されれば、骨吸収阻害を免れ骨転移が容易化する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ガンは先進国における死因の1位となっており、その予防・治療法の確立が望まれているが乳がんや前立腺がんなど一部の腫瘍は骨転移を容易に起こし、予後が不良となることが多い。

我々は骨吸収抑制性サイトカインとして知られるインターフェロンがADAM17によって分解されることを発見した。

ADAMファミリーは腫瘍細胞で高発現されていること、発現量と予後不良度が関連していることが報告されている。

また、腫瘍細胞は破骨細胞形成を促進し腫瘍細胞周囲での骨吸収を亢進させて骨転移を促す機構が報告されている。

本研究では腫瘍細胞による骨吸収抑制性サイトカインであるインターフェロン分解機構と骨転移能の関連を検索する。

3. 研究の方法

概要

本研究課題では、腫瘍に発現されるADAMファミリーが腫瘍骨転移を促進していると仮説を立て、骨転移しやすい腫瘍細胞と骨転移しにくい腫瘍細胞間でのADAMファミリー発現の相違と、それに伴うインターフェロン

分解能や骨吸収促進能の相違を比較検討し、将来的に ADAM ファミリーが腫瘍転移抑制の分子標的となりうるかどうかの基礎的データ収集を行う。

具体的な方法

in vitro における候補分子探索

骨転移しやすい腫瘍細胞として乳がん細胞株である MDA-MB-453、骨転移しにくい腫瘍細胞として乳がん細胞株 MCF-7 を用いて、はじめに IFNG 分解能を比較する。

次に ADAM ファミリー発現量をリアルタイム PCR アレイにて比較解析する。MDA-MB-453 で高発現、MCF-7 で低発現の ADAM ファミリー中の候補が、IFNG 分解能を有するかどうかをリコンビナントタンパク質を用いて反応させ、SDS-PAGE gel で展開し IFNG 分解の有無を確認する。

つぎにその ADAM ファミリー分子について shRNA 発現ベクターを作製し、MDA-MB-453 における安定発現株を構築する。

構築された ADAM ファミリー候補分子ノックダウン株と親株間で IFNG 分解能を比較し shRNA 安定発現株において IFNG 分解能が低下していることを確認後、IFNG 産生免疫系細胞との共存培養を行い、各腫瘍細胞株の破骨細胞分化支持能を比較する。

また、ADAM ファミリー候補分子に対するモノクローナル中和抗体を作製し、その力価を比較検討する。

最も高力価なモノクローナル中和抗体を in vitro 培養系に添加し、リコンビナント IFNG 分解阻害能と破骨細胞分化支持能を計測する。

in vivo における候補分子検証

ヌードマウスへ MDA-MB-453 親株、MDA-MB-453 ADAM ファミリー候補分子ノックダウン株、MCF-7 を注入し、骨転移の有無とその頻度を比較検討する。

また、骨転移腫瘍組織局所における IFNG 濃度を ELISA にて測定する。

腫瘍組織切片において TRAP 染色を行い、破骨細胞数の相違を計測する。同じく組織切片において、腫瘍組織周囲に集積した免疫系細胞 (NK cell, cytotoxic T cell など) の分布とその数を計測する。

また、作製した ADAM ファミリー候補分子に対するモノクローナル中和抗体を MDA-MB-453 親株を接種したヌードマウスへ注射し、その効果を観察する。

4. 研究成果

得られた結果は次の通りである。

(1) リコンビナントタンパク質を用いたアッセイで、ADAM17 がインターフェロン にたいしてエンドペプチターゼとして働いた。

(2) おなじ ADAM ファミリー酵素である ADAM10 はインターフェロン に対してエンドペプチターゼとしての機能を示さなかった。

(3) 口腔ガン細胞セルライン HSCs や乳ガン細胞 MDA はリコンビナントインターフェロン を分解した。

(4) (3) の分解能はセルラインによって異なっていた。

(5) (3) の分解能は抗 ADAM17 中和抗体ならびに特異的・非特異的 ADAM17 阻害剤によって阻害された。

以上のことから、各セルラインが発現する ADAM17 がインターフェロン を分解していることが示唆された。インターフェロン は

破骨細胞分化阻害サイトカインや腫瘍免疫サイトカインとして知られていることから、(1)インターフェロン が分解されることで破骨細胞分化阻害が抑制され、破骨細胞分化が促進される状況となり骨転移に先んじて生ずる骨破壊が起こりやすい環境となることが類推される。

(2) またインターフェロン は腫瘍免疫を制御するサイトカインとしても知られていることから、腫瘍細胞周囲でインターフェロン が分解されることで NK 細胞の活性化が阻害されることによってホストの抗腫瘍能が低下し、腫瘍が増殖しやすい環境下になることもあわせて類推された。

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2件)

1. Kanzaki H, Shinohara F, Itohiya-Kasuya K, Ishikawa M, Nakamura Y: **Nrf2 Activation Attenuates Both Orthodontic Tooth Movement and Relapse**. Journal of Dental Research 94:787-794, 2015 (査読有り)
2. Kanzaki H, Shinohara F, Kajiya M, Fukaya S, Miyamoto Y, Nakamura Y: **Nuclear nrf2 induction by protein transduction attenuates osteoclastogenesis**. Free Radic Biol Med 77:239-248, 2014 (査読有り)

[学会発表](計2件)

1. Hiroyuki Kanzaki, Fumiaki Shinohara,

Masazumi Matsuzawa, and Yoshiki Nakamura: **Chemical Bach1 inhibition attenuates osteoclastogenesis**. IADR 2015 年 3 月 11 日~2015 年 3 月 14 日 Hynes Convention center (Boston, MA, USA)

2. 菅崎弘幸, 篠原文明, 中村芳樹: **Nrf2 活性化による抗酸化ストレス酵素群発現誘導は破骨細胞分化阻害を介して歯の移動を抑制する**。日本矯正歯科学会 2014 年 10 月 20 日~2014 年 10 月 22 日 幕張メッセ(千葉、幕張)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅崎 弘幸 (Kanzaki Hiroyuki)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号 : 30333826

(2)研究分担者

篠原 文明 (Shinohara Fumiaki)

東北大学・歯学研究科・非常勤講師

研究者番号 : 80400258