

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293429

研究課題名(和文) 癌骨破壊病変の癌関連線維芽細胞の血管新生・骨吸収調節機構の解析と治療標的の探索

研究課題名(英文) Role of cancer-associated fibroblasts on the regulation of angiogenesis and bone resorption

研究代表者

佐々木 朗 (SASAKI, AKIRA)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00170663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌の骨破壊における骨微小環境の癌関連線維芽細胞は血管新生や破骨細胞の制御に重要と考えられる。骨の癌関連線維芽細胞の網羅的遺伝子解析の結果、RANKLや血管新生因子(VEGF, MMPs, IL-X, TNF, PGEなど)の発現更新を認めた。各種血管新生阻害薬のスクリーニングから、候補となった銅イオンを制御するAmmonium tetrathiomolybdate(TM)は口腔癌骨破壊モデルの破骨細胞形成を抑制し、さらにCetuximabの抗腫瘍効果を増強し骨破壊を抑制した。In vitroでは骨系細胞のRANKLの抑制と血管新生阻害を介して破骨細胞形成を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the bone microenvironment of cancer induced bone destruction, the cancer-related fibroblasts play an important role on the regulation between angiogenesis and osteoclast formation and activity. As a result, exhaustive genetic analysis of cancer-related fibroblasts in bone, we showed that these cells highly express the RANKL and angiogenesis factor (VEGF, MMPs, IL-X, TNF, PGE, etc.). The copper ion regulator, ammonium tetrathiomolybdate (TM), which was candidates from screening of various angiogenesis inhibitors, inhibited the osteoclasts formation of the oral cancer bone destruction model and reinforced antitumor effect of Cetuximab in cancer bone destruction. In vitro study, TM inhibited osteoclasts formation through the suppression of angiogenesis and RANKL expression in osteoblast and osteocytes.

研究分野：外科系歯学

キーワード：血管新生阻害薬 骨破壊 破骨細胞 骨微小環境 口腔扁平上皮癌 癌関連線維芽細胞 口腔扁平上皮癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔領域悪性腫瘍の顎骨への浸潤、骨破壊は、予後を左右する大きな負の要因となっている。癌の骨への浸潤・増殖は、癌により誘発された破骨細胞が活発に骨吸収を起こし、骨吸収によって生じた部分に腫瘍が進展していく。これは骨臓器に特異的な病態であり、破骨細胞性骨吸収を標的とした治療の開発が進んでいる。一方、破骨細胞性骨吸収は、血管新生と関連して認められることが多く、血管新生は骨形成のみならず破骨細胞性骨吸収と相互に密接な関係にあることが示唆される。申請者らも、ある種の血管新生因子が破骨細胞形成や骨吸収を促進することを明らかにし、血管新生を標的とした治療法に関する検討を行ってきた。

(2) 癌治療においては腫瘍周囲を取り巻く癌微小環境における血管新生は有力な治療標的となっており、血管新生の分子機構の解明にともない、様々な作用機序や標的分子に対する新規血管新生阻害薬が開発されてきた。しかし破骨細胞性骨吸収など骨代謝領域での役割についての情報は乏しいのが現状である。その理由として、多種の細胞によるオステオネットワークともいわれる特有の骨微小環境を形成するため解析が困難である点が挙げられる。

(3) 腫瘍組織には癌細胞のみならず線維芽細胞や間葉系幹細胞(MSC)、血管やリンパ管、免疫細胞が存在し、「癌微小環境」が構築されている。その主要な細胞集団が癌関連線維芽細胞 (CAF; cancer associated fibroblast) であり、癌幹細胞の維持、浸潤・転移、血管新生に深く関与している。癌の骨破壊環境では、癌胞巣と骨吸収部との間に、多数の血管を伴う線維性組織が豊富に介在し、破骨細胞が出現し、活発に骨吸収を行っている。これらの所見は骨転移巣など癌の骨への進展に伴って見られる細胞応

答であり、腫瘍周囲のCAFによって骨特有の微小環境 (B-CAF) が形成されていることが示唆され、この骨微小環境では、B-CAF が司令塔として破骨細胞形成や血管新生の調整に大きく関与すると考えられ、CAF を標的とした治療法の開発が期待できる。

2. 研究の目的

申請者は、血管新生を標的とした治療は血管新生のみならず破骨細胞性骨吸収を抑制し、癌の骨破壊を制御することを明らかにし、骨浸潤・骨破壊の新規治療の確立を目的に研究を進めてきた。しかしながら新規に開発される血管新生阻害薬の作用機序や標的分子は多岐にわたっているため、全ての血管新生阻害薬が破骨細胞性骨吸収の抑制効果を有している訳ではない。本研究では、CAF の血管新生と破骨細胞性骨吸収に共通の調節遺伝子を探索すること。これらの情報を基に B-CAF の調節因子を標的とした治療法の開発を目的にしており、以下の点を明らかにする。①多数の各種血管新生阻害薬について破骨細胞形成ならびに骨吸収活性の抑制、抗腫瘍効果を指標にスクリーニングを行い、有効性を示す阻害薬の作用機序や標的分子について共通項を系統的に整理し、今後の創薬研究のための選択要件とする。②口腔扁平上皮癌細胞の骨髓腔内注入による癌の骨破壊動物モデルを作製し、病巣より癌関連線維芽細胞 (B-CAF) を回収・樹立し、骨破壊に関連する B-CAF の遺伝子発現をマイクロアレイによって網羅的に探索する。③応答遺伝子について B-CAF の血管新生や骨微小環境における役割について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血管新生阻害薬が破骨細胞形成に与える影響の検討

各種血管新生阻害薬のスクリーニング多数の血管新生阻害薬（80種類以上）が製造されているが、作用機序、標的分子は異なる。系統的に整理し30種程度に絞り込み、破骨細胞形成を指標にスクリーニングを行い、有用な試薬について、骨吸収活性、抗腫瘍性な創薬の可能性について検討した。下記の薬剤の濃度は血管新生抑制作用を有する至適濃度を基準に設定して検討を行った。

①血管新生阻害薬

2-Methoxyestradiol, 5-Azacytidinem, Albendazole, Ammonium tetrathiomolybdate, Apicidin, Chetomin, CI994, Colchicine, D-Penicillamine, Dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt, Nocodazole, Temozolomide, 5HPP-33, Borrelidin, TAS301, SB220025, Xanthohumol, Roxithromycine, L-azentine2-carboxy acid, IMS2186, RRD-251, Endostatin murine, FLT-3 Inhibitor, IL-12 from mouse, JNJ-10198409, Ki8751, L-Ascorbic Acid, N-Acetyl-L cysteine, SU 5416, SU1498, TNP-470

②破骨細胞形成系に対する検討

C57BL/6J マウス大腿骨から採取した骨髓細胞に M-CSF (10ng/ml) を添加し、12時間後、非接着細胞を回収し M-CSF (30ng/ml) を添加し、3日間培養を行った。接着細胞を回収し 24well にて M-CSF (30ng/ml), RANKL (50ng/ml), 血管新生阻害薬を添加し、破骨細胞形成能を破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色にて評価した。また一部の血管新生阻害薬については、骨髓間質細胞の影響を検証するために C57BL/6J マウス大腿骨から採取した骨髓細胞全体を $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で培養し、TRAP 染色にて破骨細胞形成能を評価した。一方、マウス骨髓細胞よりマイクロビース CD11b⁺ 抗体で単球・破骨前駆細胞をソーテ

ィングにより単離し、薬剤の直接的な破骨細胞形成への影響を検証した。

③口腔細胞癌、骨関連細胞の増殖能に対する検討

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3, SAS, マウス骨髓由来間葉系幹細胞 ST-2, 骨芽細胞様株 MLO-Y4, MLO-A5, C57BL/6J マウス骨髓から単離した T 細胞, 線維芽細胞を血管新生阻害薬の存在下にて培養し、72 時間後の細胞数の相対値より細胞増殖能に与える影響を検討した。なお T 細胞は脾臓中の細胞をマイクロビース CD4⁺ 抗体でソーティングし CD3 抗体と CD28 抗体にて刺激し成熟 T 細胞に分化させ使用した。骨細胞の単離はマウス長管骨をホモジナイズしコラゲナーゼにて分画 I から分画 IV を、次に EDTA にて分画 V, 再度コラゲナーゼにて分画 VI を得た。分画 V, VI を α -MEM で培養し、骨細胞の割合は、DMP-1 抗体を用いてウエスタンブロット法にて確認した。腫瘍細胞に関してはフローサイトメトリーでの評価も行った。

④ 新生血管の管腔形成能の評価

Endothelial Tube Formation Assay. Cell biolabs を用いて HUVECs を ECM ゲル上で培養し、HSC-2 CM (30%), または VEGF (100nM) を添加し TM (5 μ M) 存在, 非存在下での Tubeformation を検討した。

⑤ Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) 発現への影響

MLO-Y4, MLO-A5, C57 BL/6J から単離した骨細胞, T 細胞を血管新生阻害薬の存在下にて 48 時間培養し、蛋白ならびに mRNA を回収し、RANKL 発現に与える影響をそれぞれウエスタンブロット法ならびにリアルタイム PCR にて検討した。

(2) B-CAF の遺伝子発現の網羅的解析

① B-CAF の樹立

試行錯誤を繰り返したが、最終的にマウス

脛骨骨髓中に口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 を注射法にて移植し、1 週後に全骨髓細胞を回収、細胞回収用接着プレート UPCell® で 2 日間培養後、線維芽細胞のみを回収し、1 日培養後、RNA を回収した。

② 遺伝子発現の網羅的解析

Affymetrix 社 GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array を用いて B-CAF と通常の線維芽細胞を比較して検討した。また骨髓間質細胞株 ST に対する血管新生阻害薬による遺伝子発現の変化についても検討した。

(3) 骨破壊動物モデルに対する TM の検討

① 転移動物実験モデルの作製

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 を BalbCnu/nu ノードマウス脛骨に注射して作製した癌誘発骨破壊モデルを作製した。また対照群として HSC-2 細胞の皮下移植モデルを作製した。

② 血管新生阻害薬 (TM) の治療的効果の検討 腫瘍移植後 1 週目から TM を週 5 回、1mg/mouse を経口投与し、5 週目に屠殺して癌の骨破壊ならびに抗腫瘍効果を X 線画像ならびに組織学的に検討した。また近年、注目を浴びている EGFR の分子標的治療薬であるセツキシマブ (Cet) の週二回 (1mg/kg) 併用投与についても検討した。

(4) Lysyl oxidase (LOX) 活性への影響

LOX は骨芽細胞の RANKL 発現を強力に誘導することが知られている。LOX は pro-LOX として様々な細胞から産生され BMP-1 によって活性化 LOX となる。BMP-1 は他の TGF- β ファミリーと異なり、MMP の一種であり、中心骨格に銅イオンが必須である。そこで TM の LOX 活性に与える影響を LOX Activity Kit で検討した。

4. 研究成果

(1) 多数の各種血管新生阻害薬の破骨細胞形成能のスクリーニング

2-Methoxyestradiol, 5-Azacytidine, Albendazole, Ammonium tetrathiomolybdate, Apicidin, Chetomin, CI994, Colchicine, D-Penicillamine, Dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt, Nocodazole, Temozolomide, 5HPP-33, Borrelidin, TAS301, SB220025, Xanthohumol, Roxithromycin, L-azentine2-carboxy acid, IMS2186, RRD-251, Endostatin murine, FLT-3 Inhibitor, IL-12 from mouse, JNJ-10198409, Ki8751, L-Ascorbic Acid, N-Acetyl-L cysteine, SU 5416, SU1498, TNP-470 について検討を行った。仮説通り破骨細胞形成の抑制作用を示すものが多く、30 種類中 18 種類が効果を示した。一部はすでに報告しており、今後の研究に多くの基盤データとしてのシーズを得ることが出来た (当分野の H P に公開予定)。この中で、近年、生体内金属である銅が新たな癌治療の標的として検討されているが、銅キレート作用を有する Ammonium Tetrathiomolybdate (TM) が、強力な血管新生阻害薬であり (本研究でも HUVEC の抑制効果を確認)、乳癌の再発リスクを減少させることが報告されている。また銅は生体内において約 60 % が骨に貯蔵されており、骨代謝において重要な役割を持つことが報告されている点で、特に TM に着目して検討を行った。

(2) B-CAF 単離培養と発現遺伝子の解析 口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 を骨中に移植し、細胞回収用接着プレート UPCell® を用いて B-CAF を回収、培養して、網羅的なアレイ検索により B-CAF の発現遺伝子検索を行った。B-CAF では破骨細胞形因子である、RANKL や血管新生因子 (VEGF, MMPs, IL-X, TNF, PGE 関連など)、またマスト細胞に関連すると推察される遺伝子群が高発現を認めた。この結果、B-CAF

が破骨細胞性骨吸収や血管新生に大きく関わっていることを示唆する結果であったが、炎症性サイトカインなど疼痛関連因子も見られた。以上より、癌の骨破壊病変の標的になりうることが示唆された。

(3) 血管新生阻害薬 TM の検討

各種血管新生阻害薬の破骨細胞形成能のスクリーニング結果より新たな癌治療の標的として生体内金属である銅のキレート剤である Ammonium Tetrathiomolybdate(TM) について以下の検討を行った。

①TM の破骨細胞形成抑制能の検討

スクリーニングで用いた破骨細胞形成系での検討に加えて、C57BL/6J マウス大腿骨から採取した骨髄間質細胞を含む骨髄細胞を $1\alpha,25\text{-Dihydroxy}$ 存在下にて培養する破骨細胞形成系と CD11b+ でセルソート破骨細胞だけを単離し MCF と RANKL で破骨細胞に誘導した系で検討した。TM は濃度依存的に前者の破骨細胞形成を抑制したが、TM の濃度間に有意な差は認められなかった。

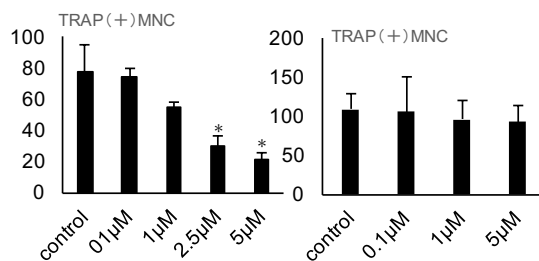


図 1 : 破骨細胞形成系での評価 (左: 骨髄細胞, 右: 単離した破骨細胞前駆細胞)

②骨微小環境を構成する細胞群の増殖ならびに RANKL 発現に与える TM の影響
ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3, SAS, マウス骨髄由来間葉系幹細胞 ST-2, 骨芽細胞様株 MLO-Y4, MLO-A5, C57BL/6J マウスから単離した T cell, fibroblast を TM 存在下にて培養し細胞増殖能に与える影響を検討したが、TM は口腔癌細胞の細胞増殖は著明に抑制したが、

MLO-A5 以外の正常細胞の細胞増殖に影響を与えなかった。一方、RANKL 発現に関しては、リンパ球系の T 細胞には影響なかったが、骨芽細胞系・骨細胞系では、PTHrP に誘導される RANKL 発現を抑制した。癌細胞の細胞周期に与える影響をフローサイトメトリーにて解析を行ったが、細胞周期には影響は与えなかった。

③TM の LOX 活性に与える影響

口腔扁平上皮癌細胞株では銅イオン添加で更新した LOX 活性抑制 TM は抑制した。

④癌骨破壊動物モデルに対する TM の検討
移植 7 日後から TM, Cetuximab の投与を開始した。4 週にてマウスを屠殺し、単純 X 線撮影 (図 2), CT 撮影を行った。TM, Cetuximab 併用群は control 群と比較して優位に骨破壊を抑制していた。

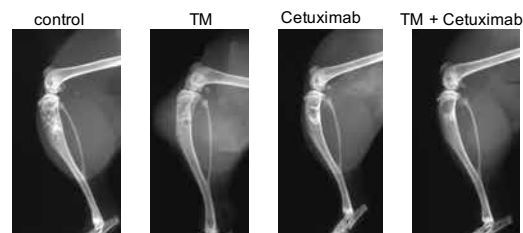


図 2 : TM の骨破壊病変に対する効果

また TM 投与にて TRAP 染色陽性破骨細胞の減少が認められ、興味あることに Cetuximab でも抑制効果を認め、併用による相乗効果を示した。また脱灰切片を CD31 免疫染色でも同様の結果を示した。

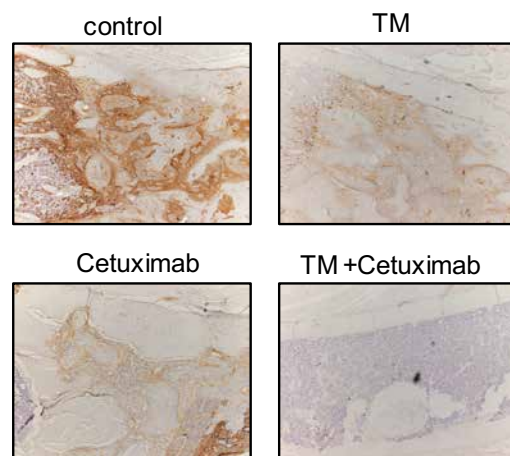


図 3 : 骨破壊病変の CD31 免疫染色像

また TM の HSC-2 細胞のヌードマウス皮下移植モデルに対する影響を検討したが、移植 14 日後から TM, Cetuximab の投与を開始した。TM, Cetuximab 併用群は Cetuximab 単剤と比較して有意に抑制作用を示した(図 2)。

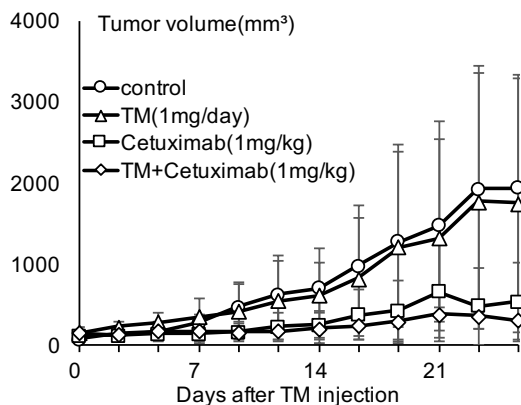


図 4 ; 皮下移植モデルの抗腫瘍効果

なお肝逸脱酵素(AST,ALT)に異常を与えなかった。以上の結果より、TM は血管新生阻害作用を有するのみならず、口腔癌細胞株の増殖能を抑制するとともに骨芽細胞の RANKL 発現を抑制することで破骨細胞形成の抑制を示すことが示唆された。また腫瘍細胞が産生する pro-LOX の活性化に銅イオンが必須であり、TM がこのメカニズムを抑制することが示唆された。TM は口腔癌骨破壊モデルマウスにおける LOX 活性抑制を介し、破骨細胞形成を抑制した。また TM は Cetuximab の抗腫瘍効果を増強した。TM は LOX 活性抑制を介し、骨芽細胞の RANKL 発現を抑制し、破骨細胞形成を抑制することが示唆され、癌骨破壊病変の治療において銅が新規のターゲットになる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 1 件)

①Takada H, Ibaragi S, Eguchi T, Okui T, Obata K, Masui M, Morisawa A, Takabatake K, Kawai H, Yoshioka N, Hassan NMM, Shimo T,

Hu GF, Nagatsuka H, Sasaki A: Semaphorin 4D promotes bone invasion in head and neck squamous cell carcinoma, Int J Oncol 2017 (accepted)

〔学会発表〕 (計 1 件)

①森澤綾香, 奥井達雄, 小畑協一, 増井正典, 佐々木朗: 骨破壊に対する血管新生阻害薬 Ammonium Tetrathiomolybdate の治療的効果の検討。第 62 回日本口腔外科学会総会, 2017 年 10 月 20-22 日, 京都

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

ホームページ等:

<http://okomfsweb.ccsv.okayama-u.ac.jp/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 朗 (SASAKI Akira)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00170663

(2) 研究分担者

志茂 剛 (SHIMO Tsuyoshi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 40362991

岸本 晃治 (KISHIMOTO Koji)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 40243480

吉岡 徳枝 (YOSHIOKA Norie)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 50362984

伊原木 聡一郎 (IBARAGI Souitiro)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 80549866

(3) 研究協力者

奥井 達雄 (OKUI Tatsuo)

森澤 綾香 (MORISAWA Ayaka)

増井 正典 (MASUI Masanori)