

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462261

研究課題名(和文) ヒアルロン酸ネットワークと破骨細胞制御による骨転移治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of bone metastasis treatment by regulating hyaluronan network and osteoclast

研究代表者

浦川 浩 (Urakawa, Hiroshi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：60584753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨転移は悪性腫瘍において患者のQOLを低下させる。ヒアルロン酸を中心とした細胞外マトリックスの制御に焦点を当て、既存の骨転移治療薬への相互作用を評価した。4-methylumbelliferone (MU)の乳がんと肺がんのセルラインに対するヒアルロン酸発現と腫瘍原性への影響を評価した。MUとゾレドロン酸の増殖能、運動能、浸潤能への影響を評価し、相乗効果についても評価した。これらの薬剤を組み合わせることによりin vivoの骨転移病変を相加的に抑制し、MUのヒアルロン酸蓄積や破骨細胞の抑制がみられた。骨修飾薬に加え、ヒアルロン酸合成を抑制することは骨転移治療のターゲットとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Bone metastases impair the quality of patients with malignancies. We focused on the co-effect of regulation of hyaluronan (HA) and bone modifying agents. We investigated the effects of 4-methylumbelliferone (MU) and/or bone modifying agents on HA expression in breast and lung cancer cell lines in addition to their tumorigenicity in vitro and in vivo. MU or zoledronic acid treatment individually suppressed proliferation, migration and invasion of breast and lung cancer cell lines, and combination treatment of MU and zoledronic acid showed synergistic effects. Combination therapy showed additive inhibitory effects on metastatic bone lesions in vivo, which paralleled the inhibition of HA accumulation by MU, and inhibition of osteoclastogenesis. These data suggest that inhibition of HA synthesis is a promising novel therapeutic candidate for bone metastasis in addition to bone modifying agents.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：転移性骨腫瘍 破骨細胞 ヒアルロン酸 骨修飾薬

1. 研究開始当初の背景

(1) がん罹患患者数とがん死亡者数は年々増加しており、それに伴い骨転移患者も増加している。骨転移は病的骨折、脊髄麻痺などの骨関連事象を引きおこし、Quality of Life (QOL)を著しく低下させる。骨関連事象を減らす目的で骨転移患者に対し、早期からビスフォスフォネートの一種であるゾレドロン酸や抗RANKLモノクローナル抗体のデノスマブが使用されるようになったが、ゾレドロン酸を使用しても約30~50%、デノスマブを使用しても約30~40%の方に骨関連事象が生じると報告されている。骨転移により高カルシウム血症、病的骨折、脊髄麻痺など様々な有害事象を生じ、患者のQOLが著しく障害するため、骨転移を制御する治療の開発が望まれている。

(2) 我々は間葉系悪性腫瘍においてヒアルロン酸の発現や機能の抑制が抗腫瘍効果を示すことや、ヒアルロン酸が豊富な細胞周囲マトリックスが薬剤の透過性を阻害することを報告し、ヒアルロン酸をターゲットとした悪性腫瘍治療が可能であることを見出した。これらの研究成果をもとに、ヒト乳がん骨転移モデルにおいて、ヒアルロン酸合成阻害薬の4-Methylumbelliferone(4-MU)が抗腫瘍効果や骨転移の進展抑制効果があることを示し報告した。現在、骨転移に対する保存的治療として行われている破骨細胞機能や分化を抑制するゾレドロン酸やデノスマブなどの治療に対するヒアルロン酸をターゲットとしたがん骨転移治療の影響を調べることは、今後、ヒアルロン酸合成阻害薬を臨床応用する際に重要な基礎データとなる。

2. 研究の目的

本研究はヒアルロン酸を中心とした細胞外マトリックスの制御に焦点を当て、既存の骨転移治療薬への相互作用を明らかとし、臨床

への応用を可能とすることを目的とする。

- (1) がん細胞におけるヒアルロン酸合成酵素のmRNAやヒアルロン酸やヒアルロン酸合成酵素の蛋白発現、ヒアルロン酸発現の評価
- (2) がん細胞に対し、4-MUおよびゾレドロン酸を用いた場合の増殖能、運動能、浸潤能、アポトーシスの評価
- (3) 破骨細胞分化させた培養骨髄細胞に対する4-MU投与の影響の評価
- (4) マウス骨転移モデルを用いた4-MUとゾレドロン酸の共投与の影響の評価

3. 研究の方法

本研究では、がん細胞およびがん骨転移に関して、その細胞外マトリックス・細胞膜上受容体・細胞内シグナル伝達のネットワークを明らかにし、これらをターゲットとした抗がん剤感受性の新規増感法を確立するため、以下の方法でヒアルロン酸ネットワークを検証した。

- (1) 最初にごん細胞におけるヒアルロン酸合成酵素のmRNAやヒアルロン酸やヒアルロン酸合成酵素の蛋白発現、ヒアルロン酸発現をみるために、各がん細胞株(ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231、マウス肺がん細胞株ルイス肺がん細胞)を評価した。ヒアルロン酸量の評価にヒアルロン酸免疫染色とELISAによる定量(培養液、細胞周囲、細胞内)、ヒアルロン酸合成酵素(HAS2、HAS3)およびヒアルロン酸受容体CD44のmRNA発現の評価にreal time RT-PCRを行った。これらの項目について4-MU投与による

影響について評価した。

(2) MDA-MB-231 とルイス肺がん細胞において、ビスフォスフォネート製剤であるゾレドロン酸を用いた場合の Cell viability assay (MTT)、Motility assay による増殖能、運動能、Invasion assay による浸潤能、アポトーシスの評価を行った。アポトーシスの評価に TUNEL assay、Akt リン酸化の評価に Westernblot を用いた。

(3) 破骨細胞分化させた培養骨髄細胞に対する 4-MU 投与の影響を評価した。マウス骨髄由来の細胞と骨芽細胞をビタミン D3 存在下で共存培養し、破骨細胞への分化を誘導し、そこにルイス肺がん細胞を加え培養を行った。4-MU とゾレドロン酸の同時投与によるヒアルロン酸の局在をヒアルロン酸免疫染色により同定した。

(4) ルイス肺がん細胞のマウス骨転移モデルを用いて 4-MU とゾレドロン酸の共投与の影響の評価を行った。軟 X 線によりマウス脛骨の骨透亮像の拡大率を評価した。治療後の組織をヒアルロン酸免疫染色によりヒアルロン酸蓄積を評価した。

4. 研究成果

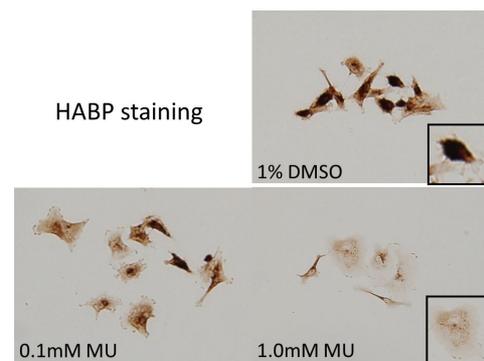
(1) がん細胞におけるヒアルロン酸合成酵素の mRNA やヒアルロン酸やヒアルロン酸合成酵素の蛋白発現、ヒアルロン酸発現の評価

MDA-MB-231

細胞のヒアルロン酸免疫染色では MU 投与後 24 時間で染色性が低下した (図

1)。MU 投与により細胞の膨化や葉状仮足の消失がみられた (図 1)。ELISA によるヒアルロン酸定量では MU の投与により 6 時間で細胞内ヒアルロン酸、12 時間で細胞周囲ヒアルロン酸が有意に抑制された。ヒアルロン酸の免疫染色では MU 投与後 24 時間で染色性が低下したが、高分子ヒアルロン酸の同時投与ではその低下は回復しなかった。MU 投与により細胞の膨化や葉状仮足の消失がみられた。ELISA によるヒアルロン酸定量では MU の投与により 6 時間で細胞内 HA、12 時間で細胞周囲 HA が有意に抑制された。培養液中 HA 量は有意差が見られないものの MU 投与により減少傾向があった。HAS2mRNA の発現は MU の濃度に依存し有意に低下したが HAS3mRNA 発現の低下はみられなかった。1.0mMMU でのみ 24 時間投与で CD44mRNA の発現が低下した。

図 1



ルイス肺がん細胞

細胞のヒアルロン酸免疫染色では 1.0mMMU 投与後 24 時間で染色性が低下した。HAS3mRNA の発現は 1.0mMMU 投与により 12 時間、24 時間で増加した。CD44mRNA 発現は 1.0mMMU 投与後 6 時間、12 時間で低下した。

(2) がん細胞に対し、ゾレドロン酸を用いた場合の増殖能、運動能、浸潤能、ア

ポトーシス、Akt リン酸化の評価

MDA-MB-231

MU は濃度依存性に細胞増殖を抑制した。TUNEL assay でも 4-MU 投与後 72 時間において濃度依存性に TUNEL 陽性細胞の増加がみられた。運動能と浸潤能の評価では MU 投与後 24 時間での評価により運動能、浸潤能が抑制された。

Westernblot では 4-MU 投与後 12 時間と 24 時間で細胞内での Akt リン酸化の抑制がみられた。

ルイス肺がん細胞

4-MU は濃度依存性に細胞増殖を抑制した。4-MU にゾレドロン酸を加えることにより細胞増殖の抑制が強くみられた。

1.0mM の 4-MU と 5 μ M のゾレドロン酸はそれぞれ単独で浸潤能の低下を認め、1.0mM の 4-MU と 5 μ M のゾレドロン酸の共投与により浸潤能の低下が増強した。運動能は 5 μ M のゾレドロン酸と、1.0mM の 4-MU と 5 μ M のゾレドロン酸の共投与により抑制された。

TUNEL assay によるアポトーシスの評価では、ゾレドロン酸投与により TUNEL 陽性細胞が有意に増加し、4-MU を加えることによりさらに増加した。

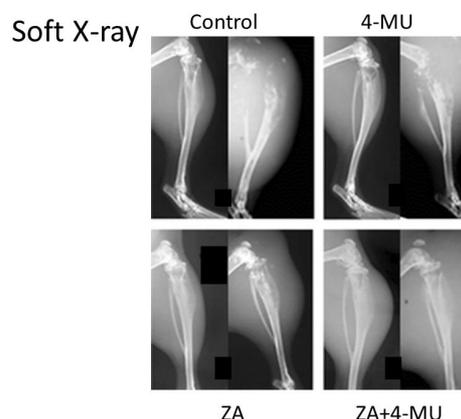
(3) 破骨細胞分化させた培養骨髄細胞に対する 4-MU 投与の影響を評価

破骨細胞分化をさせた培養骨髄細胞において 1.0mM の 4-MU 投与後 24 時間においてヒアルロン酸染色の低下を認めた。

(4) マウス骨転移モデルを用いた 4-MU とゾレドロン酸の共投与の影響の評価

4-MU の 10mg/body の腹腔内投与によりマウス脛骨骨転移モデルの骨透亮像拡大が抑制された。2 μ g/body のゾレドロン酸投与は単剤でも強い骨透亮像拡大抑制を示したが、10mg/body 4-MU と 2 μ g/body ゾレドロン酸の共投与ではより強い骨透亮像拡大抑制がみられた(図 2)。4-MU 治療後には腫瘍組織のヒアルロン酸免疫染色の染色性の低下がみられたが、ゾレドロン酸ではみられなかった。

図 2



これらの結果より乳がんおよび肺がんの各細胞株において細胞外マトリックスおよびヒアルロン酸発現は細胞増殖、運動能、浸潤能に重要な働きを持っており、4-MU などによるヒアルロン酸抑制療法とビスフォスフォネートによる転移性骨腫瘍治療の効果増強が期待された。

ゾレドロン酸などの骨修飾薬に加え、4-MU などによりヒアルロン酸合成を抑制することは骨転移治療のターゲットとなりうることを示唆された。

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0件)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40732657

〔学会発表〕(計0件)

安藤 雄一 (ANDO, Yuichi)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10360083

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

(3)連携研究者

なし

取得状況(計0件)

(4)研究協力者

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

浦川 浩 (URAKAWA, Hiroshi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：60584753

(2)研究分担者

西田 佳弘 (NISHIDA, Yoshihiro)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50332698

筑紫 聡 (TSUKUSHI, Satoshi)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：90378109

小澤 英史 (KOZAWA, Eiji)

愛知がんセンター(研究所)・分子病態学
部・研究員

研究者番号：60635572

新井 英介 (ARAI, Eisuke)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40612841

生田 国大 (IKUTA, Kunihiro)