

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10427

研究課題名(和文) 癌関連糖鎖抗原を介した転移性骨腫瘍の骨破壊進展メカニズムの解明と阻害効果の検討

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of osteolytic bone destruction in bone metastasis via tumor-associated carbohydrate antigen

研究代表者

新井 隆太 (Arai, Ryuta)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：40722509

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)：癌の骨転移では破骨細胞による骨吸収が重要な役割を果たしている。破骨細胞の分化において免疫受容体シグレック 15とシアリルTnの関与が明らかになってきていることから、溶骨性骨転移巣におけるこれらの分子の破骨細胞誘導への関与を検討した。シアリルTn発現乳癌細胞株をヌードマウスの大腿骨に局所投与したところ、コントロール群と比較して破骨細胞の分化が促進されず、骨転移巣の形成は少なかった。In vitro実験系ではシアリルTn発現乳癌細胞株で細胞接着能の減弱、integrinの機能低下が確認された。シアリルTn発現乳癌細胞株では細胞接着能が低下した結果、骨転移巣の形成が促進されない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In bone metastasis of cancer, bone resorption by osteoclast plays an important role. Siglec 15 and sialyl Tn are involved in the differentiation of osteoclasts. We assumed that osteoclast differentiation by these molecules has been implicated in the formation of osteolytic bone metastases. A sialyl Tn-expressing breast cancer cell line was established and administered locally to the femur of nude mice. The differentiation of osteoclasts was not promoted and the formation of bone metastases was small in sialyl Tn-expressing breast cancer group, compared with control group. In vitro, sialyl Tn-expressing breast cancer cell was attenuated in cell adhesion ability. It was suggested that the development of bone metastasis was attenuated in sialyl Tn expressing breast cancer cell group, because of decreased cell adhesion ability.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：癌糖鎖抗原 糖認識分子 免疫受容体 破骨細胞 転移性骨腫瘍 骨巨細胞腫

### 1. 研究開始当初の背景

癌の転移では、癌細胞は原発巣からの遊走や標的組織への接着・浸潤を達成する必要がある。申請者らはこれまでに、癌細胞の遊走や浸潤の鍵となる分子を標的とする阻害薬を用いて遊走・浸潤を抑制することを見出してきた。骨は肺や肝臓と並び転移を来しやすい組織であり、骨への転移では破骨細胞による骨吸収が癌細胞に増殖空間を提供するとともに、骨基質に含まれる様々な増殖因子が放出され癌細胞が生着し増殖しやすい環境が形成される。したがって、転移性骨腫瘍を制御するにあたっては、癌細胞による破骨細胞誘導の抑制が重要である。骨溶解性の骨腫瘍である骨巨細胞腫でも、破骨細胞様巨細胞がその病態に深く関与している。

近年、破骨細胞の分化・活性化には、M-CSF、RANKL 以外の第 3 の経路として免疫受容体群を介した制御機構が存在することが明らかとなっている。申請者らは、免疫受容体シグレック 15 とシアリル糖鎖が破骨細胞の分化を促進し生理的な骨リモデリングに関与することを世界に先駆けて明らかにしていた。さらに、シグレック 15 と親和性の高いシアリル糖鎖は、関節リウマチ患者の滑膜や腫瘍細胞の細胞膜に高発現することから、病的な骨吸収に関与すると考えられている。

癌細胞表面の糖鎖構造は正常細胞とは大きく異なることから、特異的マーカーとして診断に使用されている。しかし、これら癌関連糖鎖抗原の多くは生理機能が未解明であり治療には結びついていない。本研究では以下のような知見と予備の実験結果に基づき、“腺癌骨転移病変または骨巨細胞腫における骨破壊にシアリル Tn とシグレック 15 を介する破骨細胞誘導が関与する”という研究仮説を立証し、臨床応用への可能性を明らかにする。腺癌に高発現する糖鎖抗原シアリル Tn がシグレック 15 と高い親和性を示す (*Angata T, Glycobiology 2007*)、シアリル Tn がマクロファージ上のシグレック 15 により認識され腫瘍増殖作用をもつ TGF- $\beta$  の産生を促す (*Takamiya R, Glycobiology 2013*)、シアリル Tn を発現する乳癌細胞は悪性度が高い (*Julien S, Glycobiology 2006*)、シアリル Tn 人工高分子化合物 (糖鎖プローブ) の存在下では破骨細胞誘導が亢進する (*unpublished data*)。

本研究において癌糖鎖抗原を介する転移性骨腫瘍や骨巨細胞腫の骨破壊進展のメカニズムが明らかになれば、耐え難い痛みや機能障害をもたらす骨破壊性病変への新たな治療法開発へと展開し、癌患者の QOL 向上に大きく役立つことが期待される。

### 2. 研究の目的

癌細胞表面に発現する癌糖鎖抗原は診断に使われているものの、その生理機能はほとんど分かっていない。本研究では、癌骨転移巣または骨巨細胞腫での破骨細胞誘導に癌

糖鎖抗原と免疫受容体が関与することを明らかにする。さらに、これらの阻害による治療効果を検討し、癌の骨転移や骨巨細胞腫に対する新規治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

培養細胞、動物モデルおよび臨床病理組織標本を用いてシアリル Tn とシグレックが腺癌および骨巨細胞腫による病的骨破壊に関与することを明らかにし、治療応用への可能性を検討する。

- (1) 癌糖鎖抗原シアリル Tn による破骨細胞分化、活性化能の検証。まず、シアリル Tn 発現腺癌細胞株の作成を目指す。具体的にはシアリル Tn 生合成に必須なシアリル酸転移酵素 ST6GALNAC1 (産総研糖鎖医学研究センター成松久先生より供与) を乳癌細胞株 (乳癌細胞株 MDA-MB-231) に導入し、安定細胞株を樹立する。これらの細胞株でシアリル Tn の発現が安定して認められることを確認する。次に、破骨前駆細胞との共存培養を行う。樹立したシアリル Tn 発現腺癌細胞と非発現細胞株をそれぞれ破骨前駆細胞と共培養し、シアリル Tn 発現が破骨細胞の分化、機能に与える影響を検証する。シグレック 15 との関与を検討するためには、野生型およびシグレック 15 欠損マウスのそれぞれから採取した破骨前駆細胞を用いて比較する。
- (2) 転移性骨腫瘍および骨巨細胞腫の臨床病理組織でのシアリル Tn/シグレック 15 発現解析。実臨床において、転移性骨腫瘍や骨巨細胞腫などの骨破壊を来す骨腫瘍で摘出した検体の病理組織標本を用いて、シアリル糖鎖及びシグレック 15 の発現や分布を調査する。それぞれの症例で臨床的に認められた骨破壊・浸潤の程度と組織学的な相関を解析する。
- (3) 癌糖鎖抗原発現の有無による癌細胞株の悪性度 (骨転移、骨破壊能) の変化の検討。樹立したシアリル Tn 発現腺癌細胞株をヌードマウスの大腿骨に局所投与し、経時的な骨転移および骨破壊進展をマイクロ CT を用いて評価する。(麻酔下にて縦断的に撮影)。骨破壊の程度は細胞投与前と最終時の CT 画像データを用いて定量的に評価する。さらに転移のみられた骨の脱灰組織標本を作成し、シアリル Tn の発現が骨破壊や骨微小環境での腫瘍細胞の生着や浸潤、破骨細胞の増殖や形成にどのような影響を与えるかを検討する。通常ヘマトキシリン-エオジン染色に加えて、破骨細胞を特定気に染色する TRAP 染色も行う。また、血清生化学検査として骨代謝マーカー (CTX, Osteocalcin) を測定する。

### 4. 研究成果

- (1) 培養細胞を用いた癌糖鎖抗原シアリル Tn による破骨細胞分化、活性化能の検討: 乳癌細胞株 MDA-MB-231 にシアリル Tn 生合

成に必須なシアル酸転移酵素

ST6GALNAC1を導入し、シアリルTnを発現させた。このシアリルTn発現腺癌細胞株と破骨前駆細胞との共存培養系を用いて、シアリルTn発現腺癌細胞株による破骨細胞の分化誘導や骨吸収能の変化を明らかにした。共培養系でコントロール群に比べて破骨細胞分化誘導に差があることを確認した。

- (2) 癌糖鎖抗原発現による癌細胞株の骨転移、骨破壊の変化の検討：In vivo動物モデルにおいて乳癌細胞株による骨破壊モデルを構築した。コントロール群としてシアリルTn非発現細胞乳癌株を用い、シアリルTn発現細胞乳癌細胞株との比較検討を行った。シアリルTn発現細胞乳癌細胞株が局所投与された大腿骨で破骨細胞の分化が促進され、骨転移巣の形成が促進されるとの仮説であったが、病理標本ではシアリルTn発現乳癌細胞株が局所投与された大腿骨においてコントロール群と比較してTRAP染色陽性破骨細胞の発現が少なく、骨破壊も穏やかであった。すなわち、シアリルTn発現乳癌細胞株は破骨細胞分化を促進させず、骨転移巣の形成が少ないという実験結果であった。この結果はシアリルTnとシグレック15を含むリガンドとの相互作用が破骨細胞の分化を抑制させている可能性があることを示唆していた。なお、骨代謝マーカー (CTX, Osteocalcin)についてはシアリルTnの発現の有無で有意な差は認められなかった。追加で行ったin vitroの実験では、シアリルTn発現乳癌細胞株においてtype I collagenおよびfibronectinへの細胞接着能の減弱が確認された。また、シアリルTn発現細胞乳癌株でintegrinの機能低下が確認された。これらの結果から、シアリルTn発現乳癌細胞株ではintegrinの機能が低下することによって細胞の細胞外マトリックスへの接着能が低下し、その結果骨転移巣の形成が促進されない可能性が示唆された。

- (3) 臨床病理組織におけるシアリルTn/シグレック15と溶骨性転移性骨腫瘍の関連解析：シグレック15抗体で骨巨細胞腫の標本を免疫化学染色し、良好な染色像が得られた。骨巨細胞腫16症例について、手術前の単純レントゲン写真およびCTを用いて骨破壊像を確認し、Campanacci grade (grade 1, 2, 3)で評価した。一方、それぞれシグレック15抗体での免疫染色像を各症例について5視野で検討し、染色強度をscore (強陽性3, 中程度陽性2, 弱陽性1)で評価した。シグレック15染色強度がCampanacci gradeと相関すると仮説を立てて観察を行ったが、結果はCampanacci gradeの高い症例すなわち骨破壊が強い症例ではシグレック15の染色強度が弱い傾向にあった。

上記3項目について研究を行い、骨破壊モデルの構築、免疫染色像を確認した。

## 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)

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Hamano H, Takahata M, Kameda Y, Arai R, Sato D, Ota M, Hiratsuka S, Shimizu T, Iwasaki N. Breast cancer cells expressing cancer-associated Sialyl-Tn antigen have less capacity to develop metastatic bone lesion in a mice model of bone metastasis. Orthopaedic Research Society (ORS) 2017 Annual Meeting, March 19, 2017, San Diego Convention Center (San Diego, California, United States).
- (2) 濱野博基, 高畑雅彦, 亀田裕亮, 新井隆太, 佐藤大, 太田昌博, 平塚重人, 清水智弘, 岩崎倫政: 転移性骨腫瘍の骨破壊進展における癌関連糖鎖抗原 Sialyl-Tn の役割. 第31回日本整形外科学会基礎学術学会集会, 2016年10月14日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
- (3) 濱野博基, 高畑雅彦, 亀田裕亮, 清水智弘, 平塚重人, 太田昌博, 佐藤大, 岩崎倫政. 転移性骨腫瘍の骨破壊進展における癌関連糖鎖抗原 Sialyl-Tn の役割. 第33回日本骨代謝学会学術集会, 2016年7月23日, 京王プラザホテル(東京都新宿区).
- (4) 濱野博基, 高畑雅彦, 太田昌博, 平塚重人, 清水智弘, 亀田裕亮, 岩崎倫政: 癌関連糖鎖抗原 STn と Siglec-15 の相互作用による転移性骨腫瘍の骨破壊メカニズム. 第131回北海道整形災害外科学会, 2016年6月4日, 函館アリーナ (北海道函館市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 隆太 (Arai Ryuta)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：40722509

(2)研究分担者

岩崎 倫政 (Iwasaki Norimasa)  
北海道大学・医学研究院・教授  
研究者番号：30322803

高畑 雅彦 (Takahata Masahiko)  
北海道大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：40374368

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )