

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590400

研究課題名（和文）

前立腺癌の骨転移巣形成を促進する TGF β を MMP13 が活性化するメカニズムの解明

研究課題名（英文）

MMP13 promotes prostate tumor growth in the bone microenvironment by activating TGF- β .

研究代表者

二口 充 (Futakuchi Mitsuru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60275120

研究成果の概要：

前立腺癌の骨転移巣では、腫瘍細胞と宿主の間質細胞である骨芽・破骨細胞が相互作用し骨転移巣が形成される。一方、MMP は腫瘍・間質相互作用で重要な役割を果たすことが知られている。本研究では、どの MMP がどのように骨微小環境での腫瘍間質相互作用に働くかを検討した。我々の開発した動物モデルを用い、ラット前立腺癌が溶骨・造骨性変化を伴い増殖する組織像が観察される骨浸潤先進部と対照として非浸潤部から RNA を抽出し、microarray 解析した結果、浸潤先進部では、MMP7 と MMP13 が高発現していた。我々は MMP13 に着目し、MMP13 の免疫染色を行ったところ、ラットの骨芽細胞が陽性であった。さらに MMP13 を抑制する ONO4817 をラットに経口投与したところ、骨浸潤先進部における活性型 TGF β の濃度が減少し、破骨細胞の誘導と溶骨性変化の抑制が観察された。以上より、前立腺癌が増殖する骨微小環境では、潜在型 TGF β が骨芽細胞由来の MMP13 により活性化され、前立腺癌や破骨細胞に TGF β のシグナルが伝達された結果、前立腺癌の骨転移巣が進展することが考えられ、MMP13 は骨微小環境での腫瘍・間質相互作用で重要な役割を果たすことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、骨転移

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の骨転移に対する治療標的の確立は急務 前立腺癌は欧米諸国で 1,2 を争う死亡原因であり、本邦でもその罹患率は年々上昇している。前立腺癌による死因はその骨転移によるものがほとんどであるものの、骨転移に対する有効な治療法は確立されておらず、その治療標的分子の同定・治療法の確立は急務である。

骨微小環境で腫瘍細胞・骨芽細胞・破骨細胞が相互作用する機構を解明できる動物モデル 我々が樹立したラット前立腺癌細胞株 (PLS-P) を同種の F344 雄ラットの頭蓋骨直上に移植した結果、骨浸潤先進部では、ヒト前立腺癌の骨転移巣を正確に反映した、造骨性と溶骨性の両者の変化を伴う腫瘍が増殖する組織像を観察できた。この動物モデルを用い、骨微小環境である浸潤先進部とその対照群として非先進部を比較することで、骨微小環境に特徴的な腫瘍細胞のメカニズムを検討することが可能となった。既に我々は、骨浸潤先進部で高発現していた MMP7 は、骨芽細胞表面の receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) を可溶化し、破骨細胞を活性化することを明らかにした。

溶骨性変化の進展に伴い骨基質に含まれる TGF β が骨微小環境に放出される。 前立腺癌の造骨・溶骨性骨転移巣は、腫瘍細胞と間質にある骨芽細胞・破骨細胞の 3 種の細胞の相互作用の結果、骨転移巣が形成される。腫瘍細胞は、破骨細胞を活性化して硬い骨基質を溶解させて、腫瘍が増殖するための空間を形成させる。さらに骨基質中に大量に含まれる TGF β などの増殖因子が放出されることにより、腫瘍細胞がさらに刺激され、骨芽・破骨細胞を活性化し、骨溶解がますます促進される (Fig 1)。

骨微小環境では活性型 TGF β 濃度が高い

骨基質から放出される TGF β は潜在型であり、プロテアーゼにより活性型に変換された後に、細胞膜の TGF β レセプターを介し下流分子の Smad2 がリン酸化され、シグナルが細胞内へと伝達される。先の動物モデルを用いて、浸潤先進部 (骨微小環境) と非浸潤部における活性型および潜在型 TGF β の量をそれぞれ測定したところ、活性型 TGF β は浸潤先進部で非浸潤部に比べて高かったが、潜在型 TGF β では差は見られなかった。さらにリン酸化 Smad2 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、骨微小環境での陽性細胞の数は、非浸潤先進部に比べて有意に多かった。

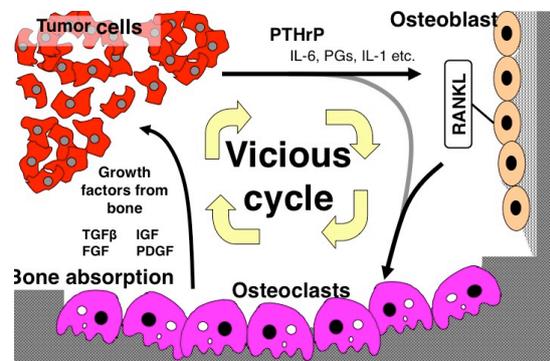


Fig.1 Vicious cycle hypothesis

TGF β を活性化する既知のプロテアーゼの発現は低く、collagenase 3 (MMP13) の発現は高い 骨微小環境で TGF β を活性化するプロテアーゼを検索する目的で、浸潤先進部と非浸潤部から RNA を抽出し microarray を用いて検索した結果、浸潤先進部では、plasmin や chymase といった TGF β を活性化する既知のプロテアーゼの高発現はみられなかった。我々は、非浸潤部に比べ浸潤先進部で高発現する protease のうち rat collagenase 3 (MMP13) に着目した。前立腺癌が増殖する骨微小環境において MMP13 を分泌する細胞を検索する目的で、ヒト MMP13 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、ラットの骨芽細胞が陽性であった。

2. 研究の目的

これらの結果から、我々は、溶骨性変化に伴って骨基質から放出された growth factor のうち最も多く含まれる TGF β に着目し、前立腺癌の骨転移巣では、潜在型 TGF β が骨芽細胞由来の MMP13 により活性化され、前立腺癌や破骨細胞に TGF β のシグナルが伝達された結果、前立腺癌の骨転移巣が進展すると仮説を立てた。本研究では、骨微小環境での MMP13 による TGF β 活性化メカニズムを解明し、MMP13 阻害による前立腺癌の骨転移進展の阻止を示す目的で、in vivo において MMP13 の作用を減弱すると、活性型 TGF β の量が減少し、骨転移巣の進展が阻止されるかどうか検討した。

3. 研究の方法

ラット前立腺癌組織(PLS-P)を F344 雄ラットの頭蓋骨に接して移植した。移植後、MMP inhibitor として ONO4817 を1週間に3回の割合で、100mg/kg 体重の濃度で投与した。移植後第4週間で屠殺剖検し、頭蓋骨と腫瘍を含めた組織を半割し、半分はパラホルム固定をして、病理組織学的な検討に、もう一方は腫瘍浸潤先進部(Tumor bone interface)、非先進部(Tumor alone area)を切り出し、それぞれ採取した。H.E.染色標本を作成し、画像解析装置(IPAP 住化テクノス社)を用いて溶骨性変化・造骨性変化の定量的な解析おこなった。破骨細胞に特異的な TRAP 染色は、Acid Phosphatase kit (Sigma 社)を用い、顕微鏡下で破骨細胞・骨芽細胞の数を計測した。採取した組織片から、タンパク質を T-PER (PIERCE 社)を用いて抽出した。抽出液中のタンパク質は Micro BCA Protein Assay Kit (PIERCE 社)を用いて定量した。また、抗 MMP13 抗体 (Santa Cruz 社)を用いて Western blotting を行なった。substrate assay をおこなって、TB-interface および tumor alone area における MMP13 の activity を測定した。TGF β の組織中の濃度を TGF β ELISA assay kit(Bender Med Systems)を用いて測定し、タンパク質 1mg あたりの

TGF β の量を算出した。

4. 研究成果

(1) 骨微小環境における MMP13 活性の ONO-4817 による特異的な抑制効果

ONO4817 は、MMP2, MMP3, MMP9, MMP13 を抑制することが知られている。一方、TB-interface では、MMP7 および MMP13 が up-regulation され MMP2, MMP3, MMP9 の発現上昇は見られなかった。従って TB-interface において ONO-4817 は MMP13 活性を抑制するが MMP7 活性を抑制しないと予想される。これを確認する目的で MMP13 に特異的で切断されると蛍光を発する基質を用いて、TB-interface および TA-area における MMP13 の活性を測定した (substrate assay)。

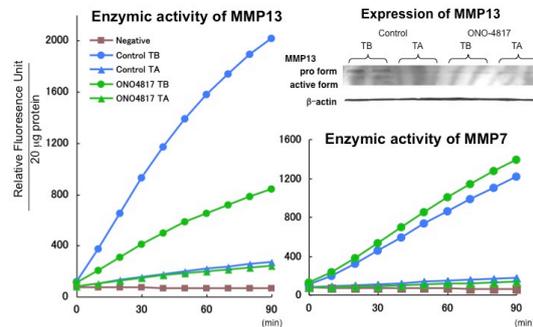


Fig.2 Expression and activities of MMPs

対照群の TB-interface における MMP13 の蛍光量は時間経過に従い増大し、対照群の TB-interface における MMP13 活性は高いことが示された。これに対し ONO4817 群の TB-interface における MMP13 活性は時間経過に従い増大したが、その上昇率は対照群に比して 1/2 程度であった。また TA-area における MMP13 活性は対照群および ONO4817 群ともに低く、Negative control と同程度であった (Fig. 2)。MMP13 の発現量を Western blotting で検索したところ、MMP13 の活性化と同様の傾向がみられた (Fig. 2)。さらに、MMP7 活性を同様の方法で検索したところ、対照群および ONO4817 群のいずれも TB-interface では高かったことから、ONO4817 は MMP7 の活性を抑制しないことが明らかとなった (Fig.2)。以上の結果から、TB-interface にお

いて ONO4817 は MMP13 を選択的に抑制することが確認できた。

(2) 溶骨性変化、造骨性変化に対する ONO4817 の抑制効果

実験期間中のラットの体重は、ONO4817 群および対照群とも差は見られなかった。腫瘍の大きさは対照群では増大する傾向がみられたが ONO4817 群では抑制され、実験第 34 週では有意な抑制効果が見られた。

頭蓋骨の直上に移植した腫瘍組織を病理組織学的に検索すると、対照群では頭蓋骨のほとんどが溶解し、腫瘍組織が脳周辺にまで増殖する像が観察された (Fig. 3)。

一方、ONO4817 群では、腫瘍の増殖は弱く頭蓋骨の破壊像は比較的弱かった。骨破壊像の定量的解析では、骨破壊の程度は ONO4817 投与により有意に抑制されていた。TB-interface 周辺に誘導された破骨細胞の数も、ONO4817 投与により有意に抑制された。さらに、造骨性変化および骨芽細胞の数も ONO4817 は有意に抑制した (Fig.3)。

(3) 骨微小環境における細胞増殖に対する ONO4817 の抑制効果

次に TB-interface および TA-area における前立腺癌の細胞増殖活性にたいする ONO4817 の影響を PCNA 免疫染色で検索した (Fig. 4)。対照群の TB-interface では、多くの腫瘍細胞が PCNA 強陽性であったが、ONO4817 投与群の TB-interface では陽性細胞数は減少して

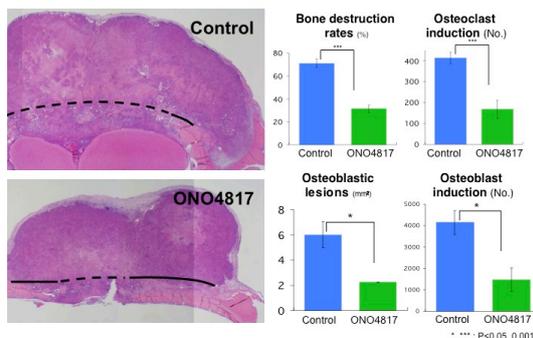


Fig. 3 Effect of ONO-4817 on osteolysis associated with rat prostate cancer

いた。TA-area では、対照群、ONO4817 群のいずれも陽性細胞数はまばらに観察された。

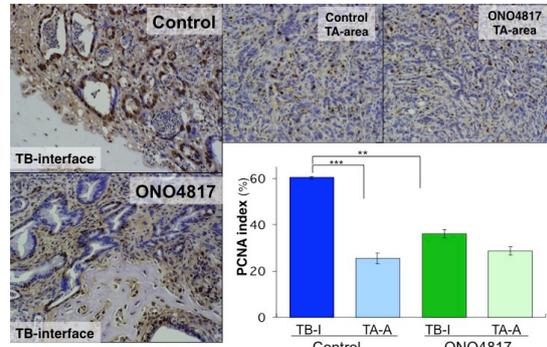


Fig. 4 Effect of ONO4817 on tumor cell proliferation at the TB-interface

これを定量化したところ、対照群の TB-interface では、TA-area に対して細胞増殖率は優位に上昇していた。ONO4817 投与群の TB-interface は、細胞増殖率は、有意に抑制されていた。TA-area での細胞増殖率は ONO4817 による抑制効果は見られなかった (Fig. 4)。

(4) 骨基質由来の TGFβ に対する ONO4817 の作用

骨基質由来の TGFβ が、TB-interface において腫瘍細胞に作用し、増殖促進作用を示すことを、我々はこれまでに報告してきた。

そこで、骨微小環境での腫瘍細胞に対し、ONO4817 が増殖抑制作用を示したことが、TGFβ と関連するかどうか検討するため、TB-interface および TA-area における active form TGFβ と、total (active + latent form) TGFβ の量を定量した (Fig. 5)。active form TGFβ は、TA-area に比較して TB-interface で優位に上昇していたが、ONO4817 により、有意に減少しており、active form TGFβ level は PCNA 陽性細胞率と同様の傾向を示した (Fig. 5)。

一方、total TGFβ level は、TB-interface および TA-area において対照群および ONO4817 群とも大きな差はみられなかった。

従って TB-interface において、ONO4817 は total TGFβ level は抑制せず、active form TGFβ を抑制することが明らかとなった。

これらの結果から、TGFβ が latent form から active form へと活性化される過程に対し、MMP13 の抑制作用を持つ ONO4817 が抑制することが示唆された。

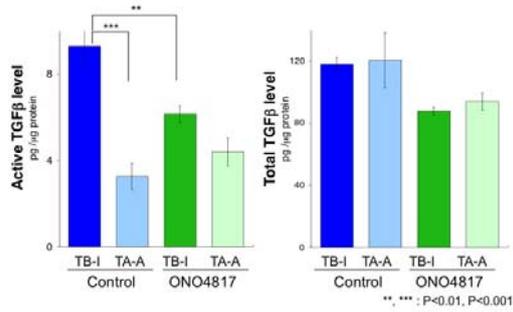


Fig. 5 Effect of ONO-4817 on active TGFβ induction at the TB-interface and TA-area

(5)まとめ

我々は、前立腺癌の骨転移巣では潜在型 TGFβ が骨芽細胞由来の MMP13 により活性化され、前立腺癌や破骨細胞に TGFβ のシグナルが伝達された結果、前立腺癌の骨転移巣が進展すると仮説を立てた。この仮説を検証する目的で、我々の動物モデルを用い、MMP13 抑制作用を持つ ONO-4817 の溶骨性変化および骨微小環境における腫瘍細胞の影響を検索した。ONO4817 投与により、TB-interface における活性型 TGFβ の量は対照群に比較して、有意に減少した。また、腫瘍細胞の細胞増殖、破骨細胞の誘導および溶骨性変化も ONO4817 投与群で有意に抑制されていた。これらの結果から、骨芽細胞から分泌された MMP13 は、骨基質由来の TGFβ を活性化し、腫瘍細胞の増殖、破骨細胞・骨芽細胞の誘導を促進することが示唆された。さらに、骨微小環境におけるラット前立腺癌の増殖にプロテアーゼが重要な役割を果たしていることから、ヒト前立腺癌の骨転移巣において、Protease Inhibitor が抑制効果を示すことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ①. Futakuchi, M., Nannuru, K. C., Varney, M. L., Sadanandam, A., Nakao, K., Asai, K., Shirai, T., Sato, S. Y., and Singh, R. K. Transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface promotes mammary tumor growth and osteoclast activation. *Cancer Sci* 100, 71-81, 2009. 査読有
- ②. Wilson, T. J., Nannuru, K. C., Futakuchi, M., Sadanandam, A., and Singh, R. K. Cathepsin G enhances mammary tumor-induced osteolysis by

generating soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Cancer Res* 68, 5803-5811, 2008. 査読有

- ③. Sato, S., Futakuchi, M., Ogawa, K., Asamoto, M., Nakao, K., Asai, K., and Shirai, T. Transforming growth factor beta derived from bone matrix promotes cell proliferation of prostate cancer and osteoclast activation-associated osteolysis in the bone microenvironment. *Cancer Sci* 99, 316-323, 2008. 査読有
- ④. Mizoguchi, Y., Ogawa, K., Futakuchi, M., Takahashi, S., Hirose, M., and Shirai, T. Differences in expression patterns of cell cycle regulators after cessation of genotoxic and non-genotoxic carcinogen treatment in the rat forestomach. *J Toxicol Pathol* 21, 77-87, 2008. 査読有
- ⑤. Kawai, N., Futakuchi, M., Yoshida, T., Ito, A., Sato, S., Naiki, T., Honda, H., Shirai, T., and Kohri, K. Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone. *Prostate* 68, 784-792, 2008. 査読有
- ⑥. Kawabe, M., Futakuchi, M., Tamano, S., Shirai, T., and Hirose, M. Modifying effects of chitin, chitosan and their related compounds on 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in a rat medium-term hepatocarcinogenesis model, and their post-initiation effects in a female rat 2-stage multi-organ carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol* 46, 2758-2763, 2008. 査読有
- ⑦. Solheim, J. C., Reber, A. J., Ashour, A. E., Robinson, S., Futakuchi, M., Kurz, S. G., Hood, K., Fields, R. R., Shafer, L. R., Cornell, D., Sutjipto, S., Zurawski, S., LaFace, D. M., Singh, R. K., and Talmadge, J. E. Spleen but not tumor infiltration by dendritic and T cells is increased by intravenous adenovirus-Flt3 ligand injection. *Cancer Gene Ther* 14, 364-371, 2007. 査読有
- ⑧. Hokaiwado, N., Asamoto, M., Futakuchi, M., Ogawa, K., Takahashi, S., and Shirai, T. Both early and late stages of hepatocarcinogenesis are enhanced in cx32 dominant negative

mutant transgenic rats with disrupted gap junctional intercellular communication. J Membr Biol 218, 101-106, 2007. 査読有

- ⑨. Futakuchi, M., Hirose, M., Kawabe, M., Yamaguchi, T., Sato, S.-Y., and Shirai, T. Combined chemopreventive effects of perilla or corn oil and indomethacin in a rat medium-term multi organ carcinogenesis model. J Toxicol Pathol 20, 245-252, 2007. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ①. 二口 充, 佐藤慎哉, 白井智之, 津田洋幸. 骨微小環境における前立腺癌の増殖機構: TGF β とプロテアーゼの関与. 第 26 回日本骨代謝学会学術集会大阪, 10 月 29 日, 2008.
- ②. 佐藤慎哉, 二口 充, 小川久美子, 白井智之. 骨微小環境における前立腺癌の進展に対する Docetaxel の効果. 第 17 回日本がん転移学会総会鹿児島, 7 月 25 日, 2008.
- ③. 二口 充, 佐藤慎哉, 小川久美子, 白井智之. 骨微小環境における前立腺癌の増殖における MMP7・MMP13 の役割と治療標的としての有用性. 第 17 回日本がん転移学会総会鹿児島, 7 月 25 日, 2008.
- ④. 佐藤慎哉, 二口 充, 小川久美子, 内木綾, 白井智之. 骨微小環境における前立腺癌の進展に及ぼす COX2 阻害剤の効果. 第 15 回日本がん予防学会福岡, 5 月 23 日, 2008.
- ⑤. 二口 充, 佐藤慎哉, 鈴木周五, 小川久美子, 朝元誠人, 白井智之. 骨微小環境に腫瘍・間質相互作用における MMP13 の役割. 第 97 回日本病理学会総会石川, 5 月 16 日, 2008.
- ⑥. Chewonarin, T., 朝元誠人, 小川久美子, 唐明希, 二口 充, 白井智之. Inhibition of prostate carcinogenesis by ellagic acid in vitro and in vivo. 第 24 回日本毒性病理学会学術集会名古屋, 2 月 7 日, 2008.
- ⑦. 二口 充, 佐藤慎哉, 小川久美子, 白井智之. 前立腺癌の骨微小環境下での増殖機構. 第 10 回癌と骨病変研究会東京, 11 月 17 日, 2007.
- ⑧. Sato, S., Futakuchi, M., Asamoto, M., Azman, S., Naiki-Ito, A., and Shirai, T. Suppressive effect of COX inhibitor on osteolysis associated with prostate tumor growth in the bone microenvironment. 66th Annual Meeting of the Japanese cancer Association Yokohama, Oct. 3-5, 2007.
- ⑨. Futakuchi, M., Sato, S., Asamoto,

M., Takahashi, S., and Shirai, T. TGF-beta derived from bone promoted the development of prostate cancer bone metastasis. 66th Annual Meeting of the Japanese cancer Association Yokohama, Oct. 3-5, 2007

- ⑩. 二口 充. 骨微小環境における前立腺癌の増殖機構とその抑制. 第 12 回前立腺那須フォーラム宇都宮, 9 月 8 日, 2007.
- ⑪. 佐藤慎哉, 二口 充, 小川久美子, 白井智之. 骨微小環境における前立腺癌の進展: COX2 阻害剤による溶骨性変化の抑制. 第 16 回日本がん転移学会総会富山, 7 月 9 日, 2007.
- ⑫. 二口 充, 佐藤慎哉, 小川久美子, 白井智之. 骨微小環境における前立腺癌の発育: TGF- β の活性化機構と腫瘍の進展. 第 16 回日本がん転移学会総会富山, 7 月 9 日, 2007.
- ⑬. Kalyan, C. N., Futakuchi, M., Wilson, T. J., Singh, R. K., Varney, L. M., Vincent, T. M., and Marcusson, E. G. Up-regulation of soluble RANKL at tumor-bone interface is critical for mammary tumor-induced osteolysis. 98th Annual Meeting of American Association for Cancer Research Los Angeles, CA, April 14-18, 2007
- ⑭. 佐藤慎哉, 朝元誠人, 二口 充, 内木綾, 白井智之. 前立腺癌の進展に伴う骨微小環境における TGF- β の役割. 第 96 回日本病理学会総会大阪, 3 月 13-15 日, 2007.
- ⑮. 二口 充, 佐藤慎哉, 鈴木周五, 白井智之. 前立腺癌骨転移巣を促進する TGF- β の活性化機構の検索. 第 96 回日本病理学会総会大阪, 3 月 13-15 日, 2007.

[図書] 該当無し

[産業財産権] 該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二口 充 (Futakuchi Mitsuru)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号:60275120

(2) 研究分担者 該当無し

(3) 連携研究者

白井 智之 (Shirai Tomoyuki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:60080066