

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791381

研究課題名（和文）骨微小環境による腫瘍の骨転移及び骨浸潤制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms regulating bone metastasis and invasion *via* the interaction between tumor and bone microenvironment.

研究代表者

渡部 琢哉（WATANABE TAKUYA）

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：00455643

研究成果の概要（和文）：がんの骨転移・骨浸潤には、がん細胞の骨への親和性獲得や破骨細胞の活性化、および血管新生が強く影響する。当該研究では、がん細胞と骨微小環境との相互作用が、がん細胞の生存、骨破壊と骨浸潤、および腫瘍血管新生に及ぼす影響を検討した。破骨細胞分化因子 RANKL は腫瘍組織特異的に発現誘導され、RANKL 発現癌細胞はインテグリンの発現亢進を介して骨親和性を獲得すると同時に、破骨細胞の成熟分化を促進し、骨転移・骨浸潤が成立しやすい環境を積極的に形成していることが明らかとなった。また、腫瘍細胞が Src ファミリーキナーゼ活性依存的に VEGF を発現分泌し、腫瘍組織内に新生血管を積極的に導引していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We identify receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) as a tumor microenvironment-specific factor essential for high affinity to bone *via* integrin upregulation and the following osteoclast differentiation, utilizing oral squamous cell carcinoma as a model. In addition, in human synovial sarcoma that frequently occurs bone metastasis, the interaction between the tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis, through Src family kinase-dependent VEGF expression in the tumor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

（1）生体内において、がん細胞は腫瘍組織を構成する様々な間質細胞や液性因子と隣接・共存し、互いに相互作用している。このような概念は、腫瘍微小環境（tumor microenvironment）として近年脚光を浴びており、これは即ち、がん細胞の周囲に存在する細胞や因子ががんの発生・がん細胞の生

存・増殖・浸潤・転移等に多大なる影響力を持つという概念である。

（2）「がんの骨転移」はがん細胞と骨微小環境との相互作用に強く影響され、上記の概念が端的に適応される場と考える。しかしながら、*in vitro* 骨微小環境の構築および異種細胞間共培養系の技術的困難さゆえに、その詳

細な機序はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

上述 1.の現状を受け、本研究の目的は、「がんの骨転移・骨浸潤」においてがん細胞-骨微小環境間に起こる相互作用を解明し、その相互作用ががん細胞の生存・骨破壊と骨浸潤・腫瘍血管新生に及ぼす影響を明らかにすることである。このメカニズムを追求することは、骨転移巣成立の機序を理解し、その発生や進展を抑制し、より有効な新規治療法を確立する上で極めて重要である。また同時に技術的側面からも、これまで全く確立されていなかった骨腫瘍環境研究のための新規実験系を提供できると考える。

3. 研究の方法

高骨転移・骨浸潤能を有する悪性腫瘍のうち、本研究では研究代表者らがこれまでにその細胞病態を明らかにしてきたヒト口腔癌および複数のヒト軟部肉腫細胞株等を主な研究対象とし、がん細胞と骨微小環境の相互作用による破骨細胞活性化機構（平成 21 年度）、および腫瘍血管新生機序（平成 22 年度）の 2 点を解明した。

(1) がん細胞と骨微小環境との相互作用による“破骨細胞活性化機構”の解明

がんの骨転移成立には、「破骨細胞の分化と活性化」が必須である。破骨細胞は骨を破壊・吸収する唯一の細胞であり、本来、骨芽細胞などの間葉系ストローマ細胞が産生する破骨細胞分化因子 RANKL と直接接合することにより分化誘導される。

申請者らは従前の研究により、高骨浸潤能を有するヒト口腔癌細胞株は、*in vitro* 培養環境下において自ら RANKL を発現していること、また口腔癌患者の腫瘍組織では RANKL 発現が著しく亢進し、その発現量が癌の悪性度と相関していることを見出した。これらの結果は、高骨転移能・骨浸潤能を有するがん細胞には骨芽細胞を介さない独自の破骨細胞分化機構が存在し、さらには宿主側すなわち腫瘍微小環境側にその活性化機構が存在する可能性を示唆する。

このような現状を受け、本研究では、生体内腫瘍組織特異的な RANKL 発現誘導メカニズムを解明し、さらには RANKL 発現癌細胞が骨親和性を獲得し、破骨細胞を活性化する機構を明らかにする。

① 臨床的に高骨転移・骨浸潤能を有するヒト口腔癌、滑膜肉腫、線維肉腫、骨肉腫、

乳癌および前立腺癌細胞株を用いて、RT-PCR 法により RANKL mRNA 発現量を検討した。

- ② ヒト口腔癌細胞株をヌードマウスの口筋部に接種した xenograft モデルを作製し、形成された腫瘍組織での hRANKL mRNA 発現量を *in vitro* 培養条件下のそれと比較検討した。さらに、生体内腫瘍組織における RANKL 発現誘導メカニズムを検討した。
- ③ RANKL 過剰発現口腔癌細胞株を樹立し、破骨前駆細胞株 Raw264.7 への接着能、および Raw 細胞の成熟破骨細胞への分化能を TRAP 染色により検討した。
- ④ 上記 RANKL 過剰発現癌細胞株を用いて、骨の主成分であるタイプ I コラーゲンへの接着能を解析し、さらにその亢進メカニズムを解明した。

(2) がん細胞と骨微小環境との相互作用による“腫瘍血管新生機序”の解明

がんの骨浸潤部でのがん細胞および破骨細胞の生存・増殖には、腫瘍新生血管からの栄養かつ酸素の供給が必須であり、これは結果としてがんの悪性度とも相関する。また、近年、腫瘍新生血管ががん細胞の骨親和性獲得にも関与するという興味深い知見が報告された。そこで、平成 22 年度は、癌の遠隔転移のみならず、骨転移・骨浸潤においてもその重要性が注目されつつある「腫瘍血管新生」において、癌細胞-血管内皮細胞間に起こる相互作用を検討した。

申請者らは従前研究により、高頻度に骨転移を引き起こすヒト滑膜肉腫細胞株ではチロシンキナーゼ Src の活性が亢進していること、また *in vitro* および *in vivo* マウス実験によって Src ファミリーキナーゼ (SFK) 阻害薬が滑膜肉腫細胞の増殖能および運動能を著明に抑制することを明らかにしてきた。SFK は血管新生とも関連が報告されていることから、当該研究では滑膜肉腫の腫瘍血管新生における SFK 阻害薬の抑制効果を検討した。

- ① ヒト滑膜肉腫細胞株をヌードマウスの皮下に xenograft し、SFK 阻害薬投与群と非投与群を作製した。各々形成された腫瘍において、血管内皮細胞のマーカーである CD31 に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、腫瘍新生血管数および管腔構造形成における SFK 阻害薬の抑制効果を検討した。
- ② 上記①で形成された腫瘍組織への新生血管導引メカニズムを明らかにするために、SFK 阻害薬投与群および非投与群腫瘍組

織間において、腫瘍細胞由来 *hVEGF* mRNA 発現量を比較検討した(半定量的 RT-PCR)。また、*in vitro* 検証実験として、滑膜肉腫細胞株を SFK 阻害薬で処理前後の VEGF の発現量変化を解析した(定量的 RT-PCR、ELISA)。さらに、それらの培養上清に対するヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVECs の走化能を検討した。

- ③ 腫瘍血管新生における滑膜肉腫細胞と血管内皮細胞との細胞間相互作用を明らかにするために、腫瘍間質構成成分であるマトリジェル上で HUVECs と緑色蛍光蛋白質で標識したヒト滑膜肉腫細胞株を共培養し、タイムラプス蛍光顕微鏡下でそれらの相互作用を観察した。

4. 研究成果

(1) がん細胞と骨微小環境との相互作用による“破骨細胞活性化機構”の解明

- ① 高骨転移能あるいは骨浸潤能を有するヒト口腔癌、滑膜肉腫、線維肉腫、乳癌および前立腺癌細胞株では、骨肉腫細胞株と同様に破骨細胞分化因子(RANKL)を自ら発現していた。
- ② ヒト口腔癌細胞をヌードマウスの口筋に移植後形成された腫瘍組織では、*in vitro* 培養条件下と比較して *hRANKL* mRNA の発現量が著明に亢進していた。さらには、これらの癌の骨浸潤部位において破骨細胞の活性化が認められた(図1)。

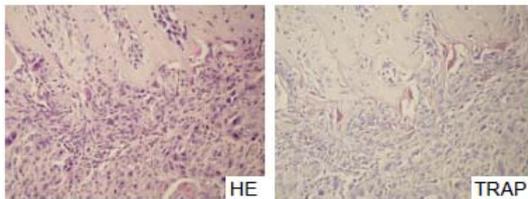


図1. 癌の骨浸潤部位において、TRAP 染色陽性の成熟破骨細胞が認められる。

- ③ 上記②の結果と一致して、人工的に作製した RANKL 過剰発現癌細胞株は、破骨前駆細胞株 Raw264.7 への接着能が亢進しており、さらに共培養により Raw 細胞を成熟破骨細胞へと分化させる能力を有していた。これら①-③の結果は、腫瘍間質側に RANKL 発現誘導因子が存在する可能性、また RANKL 発現亢進により癌細胞が骨親和性を獲得し、さらには破骨細胞活性化能をも有している可能性を示唆している。
- ④ 上記の予測に基づき、生体内特異的な RANKL 発現誘導因子を明らかにするため

に、腫瘍組織及び骨に豊富に存在する増殖因子(TGF- β 、EGF、VEGF、 β -FGF)、炎症性サイトカイン(IL-6)、及び種々細胞外基質の刺激下で RANKL 発現誘導の有無を検討したが、これらの単独刺激では RANKL の発現を惹起することは不可能であった。従って、生体内腫瘍組織においては、複数の因子による精巧な RANKL 発現制御機構が存在すると示唆される。

- ⑤ 一方、RANKLはそのレセプターRANKへ結合後、下流シグナル分子NF- κ Bを活性化し、インテグリン α 1、 α 2および β 1の発現誘導を介してタイプIコラーゲンへの接着能を増強させていることが明らかとなった。タイプIコラーゲンは骨の主成分であることから、癌の骨転移・骨浸潤過程において、癌細胞はRANKLを発現することにより、骨親和性を獲得していると示唆される。
- ⑥ 以上の結果から、RANKL発現癌細胞は、インテグリンの発現亢進を介して骨親和性を獲得すると同時に、破骨細胞の成熟分化を促進し、骨転移・骨浸潤が成立しやすい環境を積極的に形成していることが明らかとなった。

(2) がん細胞と骨微小環境との相互作用による“腫瘍血管新生機序”の解明

- ① ヒト滑膜肉腫細胞株をヌードマウスの皮下に移植後形成された腫瘍組織において、豊富な腫瘍血管新生が認められた。この形成はSrcファミリーキナーゼ(SFK)阻害薬の腹腔内投与によって有意に減少した。また、摘出した腫瘍組織を用いて抗CD31抗体による免疫染色を実施したところ、SFK阻害薬投与群では非投与群と比較して腫瘍血管数が有意に低下し、管腔構造が破壊されていることが明らかとなった。
- ② SFK阻害薬投与群の腫瘍組織では、非投与群と比較して、腫瘍細胞由来の*hVEGF* mRNAの発現が著明に低下した(図2. 半定量的RT-PCR)。

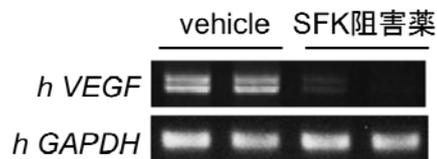


図2. SFK 阻害薬投与群では、腫瘍細胞からの *hVEGF* mRNA の発現低下が認められる。

この結果と一致して、*in vitro* 実験環境下において、ヒト滑膜肉腫細胞株から発現分泌

されるVEGF量は、SFK阻害薬処理によって有意に低下し（定量的RT-PCR、ELISA）、その培養上清はヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECsの走化能を著明に低下させた。

- ③腫瘍間質構成成分であるマトリジェル上でHUVECsと緑色蛍光蛋白質で標識したヒト滑膜肉腫細胞株を共培養し、タイムラプス蛍光顕微鏡下で血管形成過程を経時観察した所、滑膜肉腫細胞とHUVECsはダイナミックに相互作用し、両細胞が混在する独特の血管様構造を形成した。上記①-③の結果は、滑膜肉腫細胞がSFK活性依存的にVEGFを発現分泌し、血管内皮細胞と相互作用しながら、腫瘍組織内に新生血管を積極的に導引している事を示す。

(3) まとめ

本研究成果により、滑膜肉腫の骨転移・骨浸潤を抑制するためには、腫瘍細胞からのRANKL発現を抑制することにより骨への親和性および破骨細胞の成熟を阻害すると共に、腫瘍細胞のSFK活性及びVEGF発現を阻害することにより腫瘍血管新生を抑制することが有用であると示唆された。

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2件)

1. T. Watanabe, M. Tsuda, S. Tanaka, Y. Ohba, H. Kawaguchi, T. Majima, H. Sawa, & A. Minami. □The adaptor protein Crk induces Src-dependent activation of p38 MAPK in regulation of synovial sarcoma cell proliferation. *Mol. Cancer Res.* 7(9):1582-92 (2009) 【査読有】
2. T. Watanabe, M. Tsuda, Y. Makino, T. Konstantinou, H. Nishihara, T. Majima, A. Minami, S. Feller, & S. Tanaka. □Crk adaptor protein induced-phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. □ *Cell Res.* 19(5): 638-650 (2009) 【査読有】

[学会発表] (計6件)

1. R. Arai, T. Watanabe, M. Tsuda, H. Kawaguchi, Y. Ohba, A. Minami : Src ファミリーキナーゼ阻害薬は in vivo 滑膜肉腫の増殖・浸潤・血管新生を抑制する. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、10/14-15. 2010
2. 中野宏昭, 渡部琢哉, 沢口直弘, 三浪明男, 眞島任史, 武田直樹 : 腫骨に発生した

osteoid osteoma の1例. 第118回北海道整形災害外科学会、札幌、1/30-31. 2010

3. 清水智弘, 井上正弘, 沢口直弘, 渡部琢哉, 笠原靖彦, 小野寺智洋, 高橋大介, 三浪明男 : Metal on metal THA 後に ALVAL を生じた1例. 第118回北海道整形災害外科学会、札幌、1/30-31. 2010
4. R. Arai, M. Tsuda, T. Watanabe, H. Kawaguchi, A. Minami, Y. Ohba : Effect of Src family kinase inhibitor on proliferation and invasion in human synovial sarcoma in vivo. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、12/9-12. 2009
5. 武田直樹, 渡部琢哉, 三浪明男, 篠原信雄, 佐澤陽 : 骨転移に対する放射線治療とゾレドロン酸の併用効果について. 第42回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、7/16-17.2009
6. M. Tsuda, T. Watanabe, Y. Makino, H. Kawaguchi, S. Tanaka, Y. Ohba : Crk adaptor protein induced-phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. 第61回日本細胞生物学会大会、名古屋、6-2-4. 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 琢哉 (WATANABE TAKUYA)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号 : 00455643