

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390463

研究課題名(和文) 癌の骨破壊病変に対する新規 angiogenin 阻害剤による分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of molecular target therapy using new angiogenin inhibitor against cancer induced bone diseases

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) 9,900,000円、(間接経費) 2,970,000円

研究成果の概要(和文)： 癌の骨浸潤・骨破壊には、破骨細胞性骨吸収が重要である。血管新生因子angiogenin(ANG)を分子標的とした癌骨破壊病変の治療の開発を行ってきたが、本研究では、ANG-1ノックアウトマウス(ANG-KO)を作製し検討すると同時に、ANG阻害剤の有用性を検討した。ANG-KOでは成長初期の骨梁形成が抑制され、ANG-KOの細胞を用いた破骨細胞形成は抑制されたがin vivoでは差異は少なかった。ANG阻害薬neomycinはマウス癌骨破壊モデルに対して有用性が確認できた。ANGの産生抑制する新規阻害剤Terreinは、血管新生阻害のみならず抗腫瘍効果も認められ、その有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osteoclast-mediated bone resorption plays an important role in bone invasion or bone destruction of the cancer. We have been establishing the treatment of the cancer induced-bone diseases which assumed angiogenesis factor, angiogenin (ANG) as a molecular target. In the present study, we examined a therapeutic utility of ANG inhibitor and investigated the role of ANG using ANG-1 knockout mouse (ANG-KO). Trabecular bone formation of the early period of growth was suppressed in ANG-KO compare to the wild type mice (WT), and the in vitro osteoclasts formation using cells of ANG-KO was inhibited, but there were few differences in vivo model. The ANG inhibitor was able to confirm a utility for a mouse cancer bone destruction model. Newly developed medicine, Terrein, which inhibit the production of ANG, had not only the inhibition of angiogenesis, but also the antitumor activity. Therefore, a utility of ANG inhibitors against the cancer induced bone diseases was suggested.

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：angiogenin neomycine 口腔扁平上皮癌 骨浸潤 癌誘発骨破壊 血管新生因子 破骨細胞 血管新生阻害薬

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、骨破壊はしばしば認められ、予後を左右する大きな負の要因となっている。従って癌の骨への浸潤あるいは浸潤した癌細胞の骨内での増殖を制御することは、臨床上極めて重要な課題である。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が癌の骨破壊の制御を可能にする。

(2) 癌の増殖・転移には血管新生が重要な因子であることから、血管新生因子の探索とこれらの分子を標的とした血管新生阻害剤の開発が世界的に行われている。申請者らのこれまでの研究成果から、ある種の血管新生因子を標的とした治療は、癌の増殖や転移を抑制するのみならず、破骨細胞性骨吸収を抑制し、癌の骨浸潤・骨破壊を制御する可能性を示しており、血管新生阻害による新規治療の可能性が示唆される。

(3) Angiogenin (ANG)は世界で最初に分離された分子量 14kDa のリボヌクレアーゼ活性を持つ血管新生因子であり、これまでの研究で、siRNA で ANG をノックダウンした前立腺癌においては、血管新生のみならず癌細胞の増殖が *in vitro*, *in vivo* で抑制されること、ANG は細胞内の核へ移行するが、この核内移行はリボソーム RNA (rRNA) の転写を刺激するために必須であることから、この経路を阻害するアミノグリコシド系抗生物質 Neomycin が ANG の阻害に有効であること、最近、Neomycin の誘導体 Neamine が Neomycin の副作用を軽減し同等の効果を示すことを分担研究者らが明らかにした。また ANG の分泌自体を阻害する新規化合物 Terrein glucosid (J Antibiot 61,

2008) も報告された。

(4) 申請者は、ANG 発現を siRNA によりノックダウンした口腔扁平上皮癌細胞をヌードマウス骨髄腔内に移植した癌骨破壊モデルの骨内での腫瘍増殖が抑制されること、ANG が破骨細胞形成・骨吸収活性を促進すること、さらに siRNA によって破骨細胞培養系での破骨細胞形成が抑制されることを明らかにしている。また siRNA により口腔扁平上皮癌細胞の腫瘍増殖抑制効果を示すことを確認している。

(5) 以上の背景より、新規 ANG 阻害剤は、癌の骨破壊病変に対する新たな分子標的治療として臨床応用への展開が期待できる。一方、血管新生因子 ANG については、血管新生や癌細胞における働きについての検討はなされているが、生物学的な機能、特に骨代謝（骨吸収機構）における役割については不明な点が多い。

2. 研究の目的

ANG ノックアウトマウス(ANG-KO)を作製し、ANG の骨代謝における役割を探索する。また ANG 阻害剤 (Neamine・Neomycin) の破骨細胞性骨吸収への関与の解析と同阻害剤を用いて癌の骨浸潤・骨破壊に対する治療的効果を検証し、作用機序の異なる新規 Terrein についてもその抗腫瘍活性ならびに ANG への阻害効果について明らかにし創薬基盤のデータを得る。

3. 研究の方法

(1) ANG ノックアウトマウスの作製
ANG-1 遺伝子座に2つの loxP 配列をもち、ANG-1 を正常に発現する floxed マウス (ANG-1^{loxP/loxP} マウス) を作製し、全身において Cre リコンビナーゼを発現する EIIa-Cre マウス (Jackson Lab 社 No:003314) を ANG-1^{loxP/loxP} マウスと交配させ、得られ

た Mosaic マウスを野性型と交配し、ヘテロ接合体 (ANG-1^{+/+}マウス) を得る。さらに ANG-1^{+/+}マウス同士を交配させて、ホモ接合体 (ANG-1^{-/-}マウス, 以下 ANG-KO マウス) を作製した。

(2) ANG-KO マウスの骨組織における形質発現の解析

①表現型の組織学的, X線学的検討

長期間 ANG-KO マウスの飼育を行い, 経時的観察ならびにマイクロ CT により解析した。

②骨吸収活性化因子の応答性に関する in vivo での解析

野生型ならびに ANG-KO マウスの頭部皮下に破骨細胞活性化因子 (PTHrP) を局所注射し骨吸収を刺激した後, 頭蓋冠を摘出し, 組織学的に骨吸収の応答性について解析した。

③ANG-KO マウス由来細胞における破骨細胞形成能に関する in vitro での解析

ANG-KO ならびに WT マウスの大腿骨より骨髄細胞を回収し, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下での破骨細胞形成ならびに脾細胞 (血液幹細胞) を回収し, RANKL, M-CSF 存在下での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) 染色にて評価し破骨細胞形成能を検討した。

(3) ANG 応答遺伝子の網羅解析

ANG-KO による破骨細胞の骨形成関連遺伝子の解析のために野生型ならびに ANG-KO マウス大腿骨より骨髄細胞を回収し M-CSF, RANKL 存在下で培養した。得られた破骨細胞より RNA を回収し Genopal BONM-MX を用いて骨関連遺伝子発現をアレイ解析した。

(4) 新規 ANG 阻害剤 Terrein の作用

①Terrein glucosid の合成

有機化学的に合成した (岡山大学萬代博士らの協力)。立体構造は ¹H および ¹³C の核磁気共鳴を用いて炭素骨格を確認し, 高分解能質

量分析によって分子量を測定した。高速液体クロマトグラフィーにより光学純度 (>98%) を確認し, 比旋光度の比較によって, 天然抽出物と同一の鏡像異性体であることを確認した。

②血管内皮細胞の増殖・管腔形成能への影響, 腫瘍細胞の増殖への Terrein の影響

各種口腔扁平上皮癌細胞株ならびに血管内皮細胞株に Terrein を添加し, 経時的細胞数を測定した。管腔形成能は fibrin gel in vitro angiogenesis assay で検討した。

③細胞運動能・細胞遊走能・浸潤能の検討

細胞運動は wound healing assay, 細胞走化能は matrigel invasion chamber を使用し, 浸潤能は matrigelcoating insert を使用して Terrein の効果を測定した。

④ANG 分泌量への影響

培養上清中に分泌された ANG 蛋白量を, ELISA kit で測定した。リボソーム生合成の評価は AgNOR 染色を行ない組織学的にも評価した。

⑤マウス背部皮下移植腫瘍への影響

BALB/C 系 nu/nu ノードマウスの背部皮下に OSC-19 を皮下移植し, Terrein の抗腫瘍効果を評価した。

(5) 口腔癌細胞, 破骨細胞関連細胞の増殖に対する ANG 選択的阻害剤の効果

各種口腔癌細胞, 破骨細胞 RAW264, 骨髄間質細胞株 ST2, 血管内皮細胞株 HUVEC に対する細胞増殖能に対する影響を検討した。

(6) 癌骨破壊動物モデルに対する ANG 阻害剤の効果についての検討

ANG 発現するヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 をノードマウス大腿骨内に注射して作製した癌誘発骨破壊モデルを, 対照として皮下移植モデルを作製し, 作用機序の異なる ANG 阻害剤の抗腫瘍効果ならびに癌の骨破壊について検討した。

4. 研究成果

(1) ANG-KO マウスの骨組織における形質発現の解析

ANGのKOマウスとWTマウスの大腿骨の骨量をマイクロCTにて比較を比較すると、4週目(図1上段)、8週目(図1下段)でANG-KOマウスでは骨梁形成がWTマウスと比較して乏しく差異を認めたが、6ヶ月ではその差は少なくなり消失した。またANGは成長期における骨形成に関与したものの、骨格形成など成長に大きな影響はなく、骨粗鬆症などの疾患も確認できなかった。

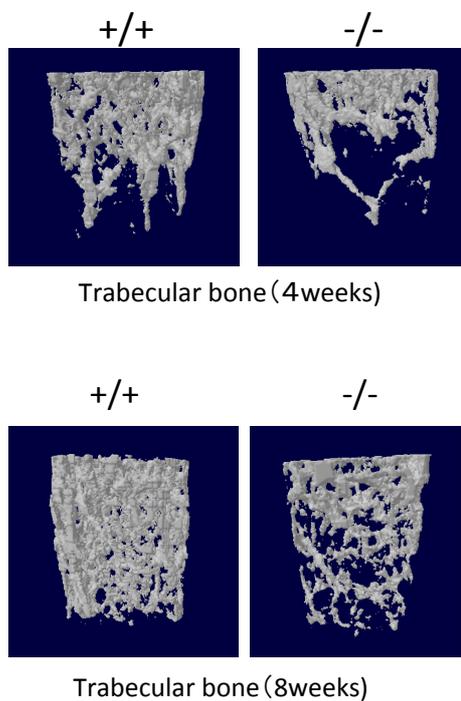


図1: CT画像より3次元構築した骨梁形態

(2) ANG-KO マウス由来骨髄細胞の破骨細胞形成能

5週齢のANG-KOマウスならびにWTマウスの大腿骨骨髄細胞、脾細胞を採取し、骨髄細胞は $1\alpha 25(OH)2D3$ 存在下で培養し、脾細胞はRANKL, M-CSF存在下で培養し、破骨細胞形成能を評価した。さらにANGの作用を検討した。骨髄細胞を用いた破骨細胞形成系では、ANG-KO群はWT群と比較して破骨細胞数の減少を認めた。骨髄間質細胞が共存しない脾細胞を用いた系でも、破骨細胞形

成がANG-KO群ではWT群と比較して抑制された。興味あることに脾細胞実験系ではANG添加により破骨細胞形成の回復が認められたが、骨髄細胞培養系では回復は認めなかった。ANGは破骨細胞形成に重要な役割を果たすことが示唆された(図2)。

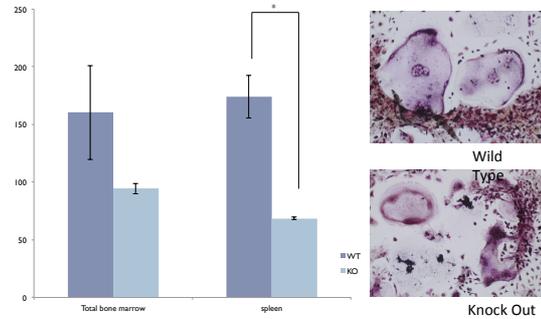


図2: KOマウス由来細胞の破骨細胞形成能

(3) ANG KO マウスの骨吸収部位における破骨細胞性骨吸収の検討

マウス頭部にPTHrPを注射して頭蓋冠の骨吸収を惹起させ組織学的に検討した。その結果、PTHrPによって頭蓋冠にはTRAP陽性の破骨細胞形成は多数出現し、破骨細胞性骨吸収像が見られたが、WT群と比較してANG-KO群による破骨細胞形成の抑制は有意ではなかった(図3)。この結果は生体では代償機構が働くことが示唆された。

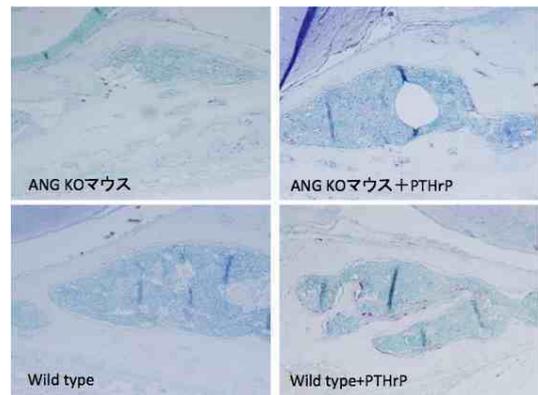


図3: KOマウス頭蓋骨の組織像(上段KO, 下段WT)

(4) 破骨細胞のANG応答遺伝子の網羅解析
全210遺伝子の中でAng(-)群の骨形成関連遺伝子がWT群の遺伝子に対して、log ratio

が1以上のものが38個 log ratioが-1以下のものが8個であった。そのうち破骨細胞形成に関与する TRAF6 では増加をしめすなど関連遺伝子の発現にはバラツキがあった。

(5) 新規ANG阻害剤の検討

上段は、ヒト臍帯静脈由来細胞株 (HUVEC), 中段は破骨細胞分化能を有するRAW264.7 下段は破骨細胞形成に必要な骨髄間質細胞株 ST2への影響を示す。Neomycinならびに新規抗ANG阻害剤 NeamineではHUVECの増殖を抑制したが、破骨細胞関連の細胞株RAWやST細胞に対しては有意な増殖抑制は認め無かった(図4)。

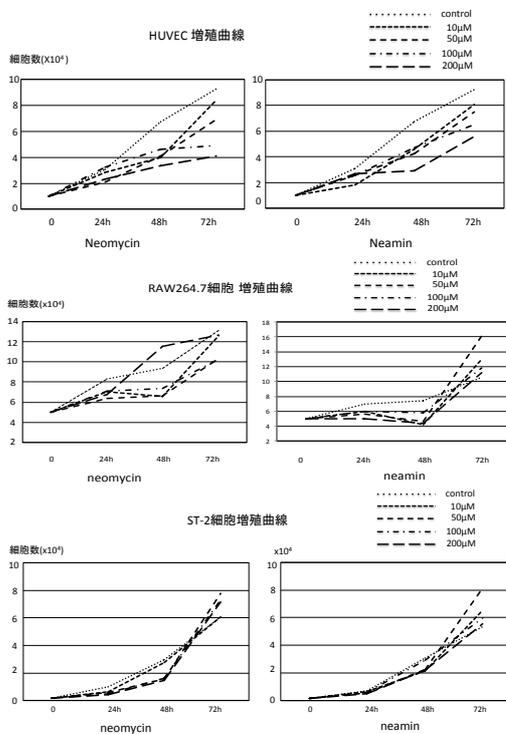


図4：各種細胞増殖に対する新規ANG阻害剤の影響

(6) 新規合成薬剤Terreinの検討

① Terreinの細胞増殖への影響

血管内皮細胞株のみならず各種口腔癌細胞株に対しても合成したTerreinは濃度依存性に細胞増殖の抑制を認めた(図5)。

② 細胞運動への影響

癌細胞の細胞運動能, 走化能, 浸潤能の抑制を認め(図6), 血管新生のみならず癌細胞自身に作用して癌の浸潤・転移の抑制できる可能性が示唆された。

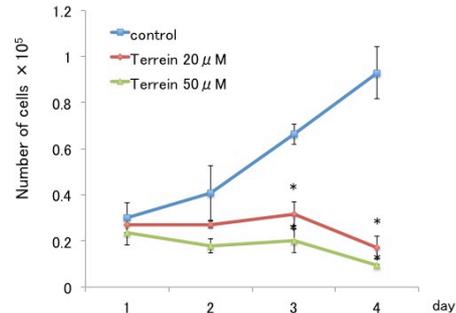


図5：血管内皮細胞に対するTerreinの作用

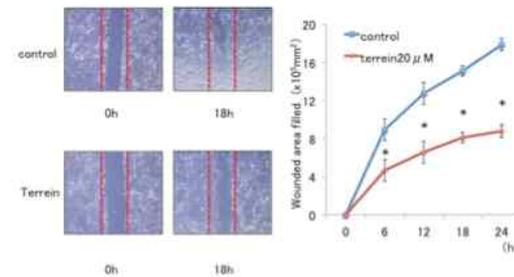


図6：細胞運動に与えるTerreinの作用

(7) 骨浸潤モデルに対するANG阻害剤の検討

大腿骨骨髄へのヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2の移植モデルに対してNeomycinを投与したところ, 骨内の腫瘍増殖を抑制した。またTRAP陽性の破骨細胞はNeomycin投与群は対照群と比較して有意に抑制されていた(図7)。



図7：骨浸潤モデルでのANG阻害剤の抑制効果

(8) 研究の今後の展望

以前の我々の結果では、ANG をノックダウンしたヒト扁平上皮癌細胞をヌードマウスに大腿骨に移植し作製した骨浸潤モデルで明らかに抑制を認めたが、ANG 阻害薬を用いた同様のモデル系でも骨破壊の抑制をしめた。ただ siRNA-ANG で破骨細胞形成の抑制を、ANG-KO マウスから回収した細胞による破骨細胞形成系でも抑制を認めたことから、ANG の抑制は破骨細胞形成抑制に重要であることが示唆されたが、ANG-KO マウスでの in vivo の局所骨吸収モデル系の解析では、破骨形成の抑制は少なく、遺伝子解析でも明確な回答は得られなかったが、何らの代償機構が働いたことが示唆された。一方、合成 Terrein は、癌細胞の増殖や浸潤抑制能を示しており、新規薬剤としての癌の骨破壊の制御への有効性が期待できる。今後の展望としては、ANG を分子標的とした治療効果はいずれの ANG 阻害薬でも効果が期待されたが安全性への検討などが必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Koji Kishimoto, Shoko Yoshida, Soichiro Ibaragi, Norie Yoshioka, Guo-Fu Hu, Akira Sasaki, Neamine inhibits oral cancer progression by suppressing angiogenin-mediated angiogenesis and cancer cell proliferation, *Anticancer Research*, 34, 2113-2122, 2014. 査読有, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778013>

[学会発表] (計 3 件)

1. 岸本晃治, 他 : Neamine の口腔癌に対する抗腫瘍効果の検討. 第 31 回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2013 年 1

月 24 日, 東京

2. 岸本晃治, 他 : Neamine inhibits progression of oral cancer by suppressing angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation, 21 Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2012 年 9 月 11~15 日, Dubrovnik (Croatia)
3. 岸本晃治, 他 : Angiogenin の発現亢進は口腔癌の増殖と進展に関与する. 第 29 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2011 年 1 月 27 日, 熊本

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

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

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

伊原木 聡一郎 (IBARAGI SOUITIRO)

岡山大学病院・助教

研究者番号 : 80549866

(3) 連携研究者

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