

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18402

研究課題名(和文)新規骨転移モデル構築法を用いた骨転移形成過程の全面解明

研究課題名(英文)Dissecting molecular basis of bone metastasis using a novel murine model

研究代表者

口丸 高弘(Kuchimaru, Takahiro)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：10570591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)効率的に血行性骨転移を形成する新規モデルマウスの開発と、(2)がん細胞と骨髄間質細胞の相互作用を通じた骨転移分子機構の全面解明を目指した。(1)に関して、これまでに骨転移研究で用いられてきたモデルの欠点を解消した尾動脈移植モデルを開発し、骨転移研究に広く有用であることを確かめた。さらに、尾動脈骨転移モデルを用いて(2)に取り組んだ。非侵襲イメージングによる解析から、骨転移形成過程において鍵となる転写因子群が特定のタイミングで活性化することが明らかになり、これらががん細胞と骨髄間質細胞の相互作用とリンクしていることが示唆された。本成果の一部は論文にまとめ、査読・改訂中である。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed (1) construction of a new murine model of bone metastasis and (2) identification of critical molecular mechanisms underlying bone metastasis. In the aim 1 we invented intra-caudal artery injection to overcome several drawbacks of current bone metastasis models. This model could change the approach most investigators in bone metastasis research. In the aim 2 we tackled molecular mechanisms governing bone metastasis using noninvasive optical imaging and the murine bone metastasis model from the aim 1. Noninvasive imaging visualized activation of key transcriptional factors at specific processes in bone metastasis. This might be coupled with interactions between cancer cells and resident bone marrow cells. To provide further mechanistic understanding, we analyzed cellular interactions in the bone marrow with standard biochemical studies. These might pave the way for development of new therapeutic strategies.

研究分野：がん生物学

キーワード：骨転移 小動物モデル 骨微小環境 生体光イメージング

1. 研究開始当初の背景

前立腺がん、乳がん、肺がん、腎臓がんといったがん種においては、骨転移は最も頻繁に起こる転移の一つである。骨転移は患者の予後を著しく悪化させるが、未だ十分な治療法は確立されていない。今後、がん転移の効果的な治療を可能にする先進医療社会の実現に向けて、骨転移を制御する分子機構の解明と予防・治療薬の開発は必須である。その中で、骨転移初期過程におけるがん細胞と骨髄微小環境の相互作用は、骨転移の形成・成長を制御する重要な要因であり、新たな治療標的となることが期待されている。申請者は、以前、骨転移過程のがん細胞では低酸素誘導因子 (HIF) が活性化しており、HIF 活性阻害剤が骨転移の早期過程の成長抑制に効果的である事を示した⁽¹⁾。しかし、近年の研究では、HIF はがん細胞のみならず、多くの腫瘍組織に浸潤し、悪性を促進している間質細胞においても重要な役割を担っていることが報告されている。このことから、骨髄に多量に存在する骨髄間質細胞における HIF の機能は骨転移の形成・成長機構と密接に関わっていることが考えられるが、骨髄間質細胞と骨転移したがん細胞との具体的な相互作用機構の解析は、ほとんど取り組まれていない。その原因の一つとして、現在、血行性骨転移モデルを構築する標準的な手法である左心室移植には、多くの難点があり、適切な骨転移モデルを効率的に構築することが困難であることが挙げられる。

左心室移植モデルは、胸部触診によって麻酔下のマウスの心臓の位置を把握し、左胸骨の間から注射針を挿入、マウス左心室にがん細胞を注入する方法である⁽²⁾。左心室移植モデルは、血行性骨転移を再現する唯一の方法として、骨転移研究において重要な発見をもたらしてきたが、骨転移形成効率が低く、使用できる細胞株に限りがあり、手技的にも困難である。また、心臓への注射針の挿入、細胞溶液の注入はマウスに負荷を与え、移植直後にマウスが死亡してしまうこともある。このような細胞材料の制限、技術的困難さ、マウスへの過剰な負荷などが問題となり、効率的な骨転移研究の推進が困難な状況にあった。

1889年に Seed and Soil Theory が提唱されて以来、転移の成立過程は、転移先臓器由来の細胞とがん細胞の相互作用が決定的な役割を果たしていると考えられてきた⁽³⁾。骨転移の初期過程を制御する骨髄間質細胞とがん細胞の相互作用を明らかにし、過去の知見と統合することで、骨転移に関わる分子機構の全面的な解明につながることを期待した。

2. 研究の目的

本研究課題では、(1) 多くの細胞種に適用可能な、簡便かつ効率的な骨転移モデルの構築手法の確立と(2) 骨髄間質細胞とがん細胞の相互作用の分子基盤の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 多くの細胞種に適用可能な、簡便かつ効率的な骨転移モデルの構築手法の確立

左心室移植に変わる新たな動脈移植経路として、マウスの尾動脈に着目した。発光酵素ルシフェラーゼを恒常発現するがん細胞株を尾動脈もしくは左心室から移植した時の、がん細胞の体内動態を発光イメージングによって比較した。また、発光イメージングによって、マウス全身組織の転移形成過程を観察し、骨転移形成効率を解析した。最後に、様々な種類のがん細胞を尾動脈から移植して、骨転移が形成されるか調べた。

(2) 骨髄間質細胞とがん細胞の相互作用の分子基盤の解明

がん細胞の分子シグナルの活性化を非侵襲的に可視化する光イメージングシステムと組織免疫蛍光染色を用いて、骨髄において、がん細胞と骨髄間質細胞の相互作用を解析した。さらに、がん細胞との相互作用が示唆された骨髄間質細胞をマウス骨髄から単離し、がん細胞との共培養系を用いて、相互作用に関わる分子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 多くの細胞種に適用可能な、簡便かつ効率的な骨転移モデルの構築手法の開発

尾動脈もしくは左心室から、ホタルルシフェラーゼ (luc) を恒常発現するマウス肺がん細胞株 LLC/luc を移植して 30 分後のマウス全身組織における発光シグナルを解析したところ、左心室移植個体は、がん細胞が全身に播種されていた一方、尾動脈移植個体においては、マウスの下半身に発光シグナルが限局していた (図 1a)。この時、骨転移がもっとも形成されやすい後肢骨(大腿骨、脛骨)を摘出・破碎し、骨髄の内容物を培養ディッシュに回収して、一週間培養した後、がん細胞の増殖を調べた。その結果、尾動脈移植は左心室移植よりも約 3 倍効率ががん細胞を後肢骨髄に送達可能であることが明らかになった (図 1b)。この結果は、同数 (2×10^5 cells) の LLC/luc を尾動脈もしくは左心室から移植

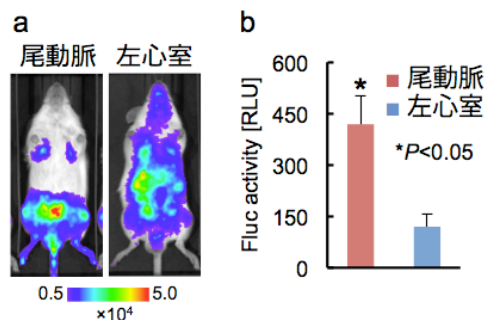


図 1 尾動脈移植によるがん細胞の(a)下半身臓器と(b)後肢骨髄への送達

した時の、骨転移病巣の形成速度にも顕著に反映されており、尾動脈移植モデルにおいては、がん細胞移植後より短期間で骨転移病巣が形成された(図 2)。また、尾動脈移植は左心室移植と異なり、移植時にマウスに与える負荷が小さい。そのため、多量の細胞を移植できることも明らかになった。 10^6 cells の LLC/luc を尾動脈移植すると、後肢骨髄に送達される細胞数がより増加し、その結果、骨転移病巣の形成効率をさらに向上できることもわかった(図 3)。そして、尾動脈移植モデルが、幅広いがん種の骨転移モデルの構築に適用可能か調査したところ、低転移性の乳がん細胞 MCF-7 を含む、前立腺がん、腎がん、骨肉腫などの骨転移モデルの構築に成功した(図 4)。これらの結果から、尾動脈移植モデルは、過去 20 年にわたって利用されてきた左心室移植モデルの欠点を解消した新たな骨転移モデルとなることが明確に示唆された。これらの成果は、現在論文にまとめ投稿し、査読・改定中である。

(2) 骨髄間質細胞とがん細胞の相互作用の分子基盤の解明

臨床病態に則した骨転移モデルを構築するために、前立腺がん患者の骨転移病巣から樹立された PC-3 に、基質交差性のない 3 種類のルシフェラーゼを用いて、細胞増殖、HIF と NF- κ B の転写因子活性をリアルタイムモニタリング可能な多重生物発光レポーターシステム(MRS)を安定導入した PC-3/MRS を樹立した(図 5)。PC-3/MRS を尾動脈から移植する

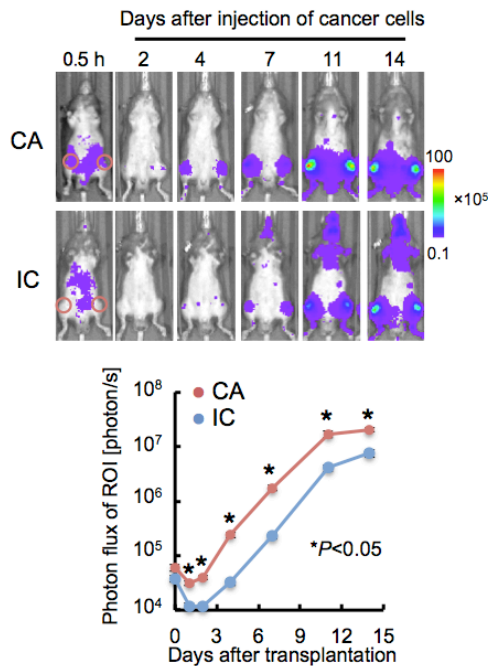


図 2 尾動脈移植(CA)と左心室移植(IC)の骨転移形成速度の比較

とほぼ 100%の効率で後肢骨髄に生着した。増殖活性イメージングから、骨髄にホーミングして 24 時間以内に、多数の PC-3/MRS は細胞死に到り、生存した細胞もその後 1 週間程ほぼ増殖しない期間を経て、急速な増殖を開始することがわかった(図 6)。この急速な成長を開始するまでを骨転移初期過程として、さらなる解析を進めた。骨髄ホーミング直後に HIF は僅かに活性化されたが、その後活性は減少する傾向にあった(図 6)。ホーミング後の HIF の活性化レベルから、PC-3 は比較的酸素濃度の高い血管近傍⁽⁴⁾に生着していることが示唆されたが、その後活性が抑制される機構については現在も不明である。一方、NF- κ B は、転移がん細胞が急速な増殖を開始する直前から活性が上昇した。そこで、がん細胞移植 7 日前後で、大腿骨を摘出し、免疫蛍光染色で骨転移病巣を解析したところ、Sca-1 陽性(CD31、CD45 陰性)の間葉系幹細胞(MSC)の異常蓄積が骨転移コロニー周辺に観察され

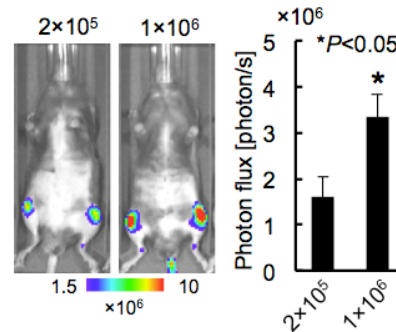


図 3 移植細胞数を増やした尾動脈移植

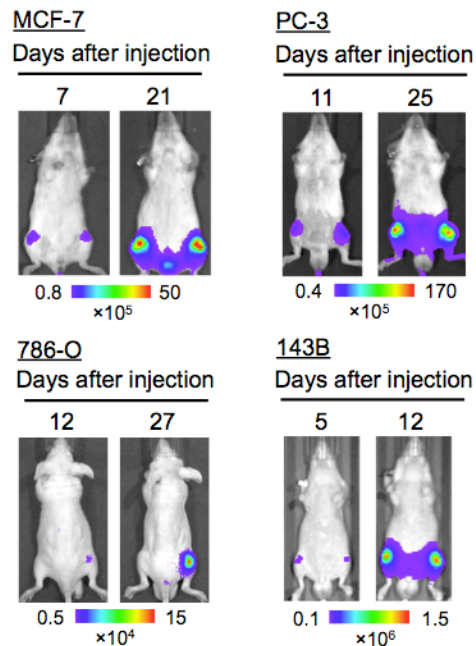


図 4 様々な細胞腫を尾動脈移植した骨転移モデル

た(図7a)。そこで、MSCをマウス骨髄から単離し、トランスウェルを用いた遊走アッセイを実施したところ、MSCはPC-3が分泌する因子によって、遊走能が上昇したことから(図7b)、PC-3は積極的にMSCを骨転移コロニーにリクルートしていると考えられた。現在、PC-3のNF- κ Bの活性化を介した骨転移成長における、骨転移コロニーにリクルートされたMSCの関与について分子的な検証を進めている。

<引用文献>

- [1] Cancer Sci, 105, 553 (2014)
- [2] Cancer Res, 55, 3551 (1995)
- [3] Nature Rev Cancer, 3, 453 (2003)
- [4] Nature, 508, 269 (2014)

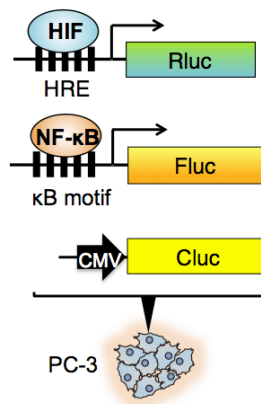


図5 PC3/MRSの概略図

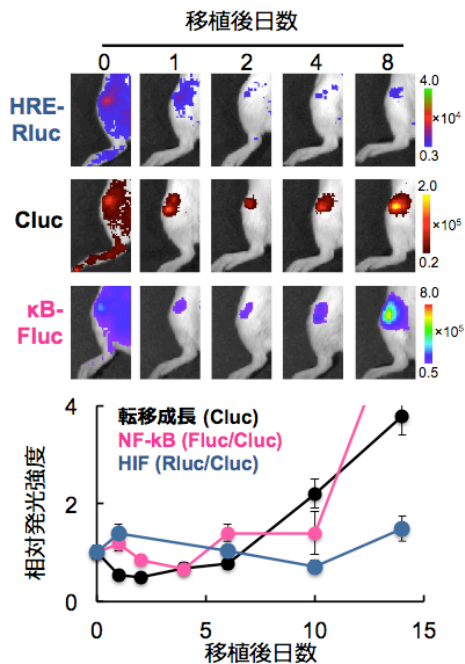


図6 骨転移初期過程のMRSイメージング

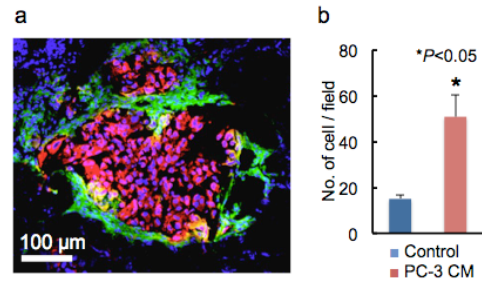


図7 (a)骨転移コロニー(赤)周辺に蓄積したSca-1陽性細胞(緑) (b) PC-3の培養上清(PC-3 CM)によるMSCの遊走

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)
なし

[学会発表] (計8件)

①磯崎達大, 片岡直也, 峯岸美沙, 口丸高弘, 門之園哲哉, 近藤科江, 骨転移早期形成過程におけるがん細胞と骨髄微小環境の相互作用解析, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2016年12月2日

②片岡直也, 口丸高弘, 磯崎達大, 峯岸美沙, 門之園哲哉, 近藤科江, 骨転移早期過程における前立腺がんと骨髄間質細胞の相互作用解析, 第14回がんとハイポキシア研究会, 岐阜グランドホテル, 2016年11月5日

③磯崎達大, 口丸高弘, 片岡直也, 門之園哲哉, 近藤科江, 早期骨転移形成過程における腫瘍微小環境およびがん細胞と骨髄間質細胞の相互作用解析, 第75回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 2016年10月8日

④片岡直也, 口丸高弘, 磯崎達大, 宮原瞳, 門之園哲哉, 近藤科江, がん細胞の尾動脈移植によるマウス骨転移モデルの簡便な構築, 第75回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 2016年10月8日

⑤片岡直也, 口丸高弘, 中川賢治, 磯崎達大, 門之園哲哉, 近藤科江, 発光イメージングを用いた骨転移早期過程における前立腺がんと骨髄間質細胞の相互作用解析, 第11回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 神戸国際会議場, 2016年5月19日

⑥口丸高弘, 片岡直也, 磯崎達大, 門之園哲哉, 近藤科江, 骨転移早期過程を制御する分子機構を明らかにする新規マウスモデル, 第18回 癌と骨病変研究会, 千代田放送会館, 2015年11月13日

⑦口丸高弘, 片岡直也, 中川賢治, 門之園

哲哉, 近藤科江, 左心室移植モデルに代わる新規骨転移マウスモデル, 第19回日本がん分子治療標的学会, 松山全日空ホテル, 2015年6月11日

⑧片岡直也, 口丸高弘, 中川賢治, 門之園哲哉, 近藤科江, 骨転移メカニズムの解明を促進する新規マウスモデルの構築, 第10回日本分子イメージング学会, タワーホール船堀, 2015年5月20日

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

なし

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.kondohlab.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

口丸 高弘 (KUCHIMARU, Takahiro)
東京工業大学・生命理工学院・助教
研究者番号: 10570591

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

武田憲彦 (TAKEDA, Norihiko)