

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005 ～ 2009
 課題番号：17014058
 研究課題名（和文）骨環境と転移がん細胞のクロストーク
 研究課題名（英文）Cross talk between bone microenvironment and metastatic cancer cell

研究代表者
 米田 俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)
 大阪大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号：80142313

研究成果の概要（和文）：乳癌および前立腺癌の増加に伴って、癌の骨転移が注目され、その対策が必要とされている。骨は、骨吸収と骨形成を盛んに行っている動的な組織である。さらに骨組織には、免疫細胞、血液細胞、脂肪細胞、神経細胞が存在しており、複雑な細胞間ネットワークを構築している。そこで本研究では、分子レベル、細胞レベル、および個体レベルで骨微小環境と癌細胞の相互関連を解析した。また骨転移に伴う疼痛発症のメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Along with increasing of breast and prostate cancer patients, the metastases of cancer into bone has been important issues. It is, therefore, necessary to establish effective solutions for the metastases. Bone resorption and bone formation are active in bone tissues where several types of cells, including immune cells, hematopoietic cells, adipocytes and neural cells, are present. In this study, we examined cross-talk between cancer and bone tissues at molecular level, cell level, and in vivo. Furthermore, we revealed the mechanisms of bone pain associated with bone metastases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,400,000	0	8,400,000
2006 年度	9,300,000	0	9,300,000
2007 年度	9,300,000	0	9,300,000
2008 年度	8,200,000	0	8,200,000
2009 年度	8,200,000	0	8,200,000
総計	43,400,000	0	43,400,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：癌、骨、破骨細胞、骨芽細胞、クロストーク、サイトカイン、増殖因子、疼痛

1. 研究開始当初の背景

がんの転移には臓器選択性があることが知られている。近年わが国において発生頻度

および死亡率が高まっている乳がん、前立腺がんおよび肺がんはきわめて高率に骨に転移することが示されている。これらのがんが

骨を標的臓器とする理由は不明であるが、骨は骨芽細胞が産出する TGFβ や IGF などの多彩な増殖因子を高濃度に蓄え、しかもこれらの増殖因子を破骨細胞が生理的骨吸収により常時放出する肥沃な臓器であることから、がんが転移巣を成立させやすい環境にあると推測される。一方、骨由来の増殖因子により促進されたがん細胞は骨代謝に影響を及ぼす因子を産出すると推測される。骨転移は耐えがたい痛みや病的骨折のためがん患者の QOL を著しく損ね、また有効な治療法が確立されていないためがん患者の死期を早める。骨転移のメカニズムを解明するためには、増殖因子・サイトカインを介する骨環境と癌細胞との相互的関係が骨転移を成立させる分子メカニズムの解明が必要である。

2. 研究の目的

骨組織は、ダイナミックにリモデリングを繰り返しており、骨微小環境には様々な増殖因子およびサイトカインが産生、分泌されている。また骨組織には、骨組織を担う破骨細胞や骨芽細胞のみならず、免疫細胞、血液細胞、脂肪細胞、神経細胞など多様な細胞が存在しており、非常に複雑な細胞間ネットワークを構築している。したがって癌細胞が、骨組織に転移し、定着、増殖する過程においては、これら細胞間ネットワークならびに液性因子と深く関連している。本研究では、癌細胞が骨に転移するメカニズムに加えて、骨微小環境における癌細胞の動態について、分子生物学的検討を実施した。また骨転移には、破骨細胞阻害剤ビスフォスフォネートが有効で、疼痛抑制にも効果を有している。そこで本研究では、ビスフォスフォネートと骨転移癌との相互関連と疼痛に対しても検討を実施した。

3. 研究の方法

(1) ヒトおよびマウスのがん細胞株をヌードマウスあるいは同系マウスの血管内(尾静脈、左心室)または原発部位に接種し、骨転移を誘発する細胞株をレントゲンの的に検索する。

(2) 形成された骨転移が病理組織学的に骨溶解性、骨硬化性、または混合型であるかを検討する。本研究のため、設備備品として回転式マイクロームを申請する。さらに骨以外の臓器(肺、肝)への転移の有無を組織学的に検討する。

(3) がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、骨、肺、肝での転移腫瘍量の定量的評価を行う。gain-of-function 的アプローチとして、骨転移に関与すると思われる候補遺伝子、loss-of-function 的アプローチとして、アンチセンス、またはドミナントネガティブ変異遺伝子を各々ががん細胞に導

入し、そのがん細胞の骨転移能を検討することにより導入した候補遺伝子の役割を確定させる。

(4) 骨転移動物モデルにおいて IL-1 や PTH-rP を用いて骨吸収を促進した場合および破骨細胞阻害剤により骨吸収を抑制した場合の骨転移の変化をレントゲンのおよび組織学的に検討する。

(5) トランスウエルを用いて骨とがん細胞を共存培養し、骨吸収を促進および阻害した場合のがん細胞の増殖、ならびに骨に影響を与えるサイトカイン(PTH-rP)の産生を検討する。

(6) 骨転移に影響を及ぼす骨由来増殖因子を ELISA, あるいは中和抗体により同定する。

4. 研究成果

(1) 癌骨転移に伴う疼痛モデルの確立

ヒト乳癌細胞株をマウスに移植し、骨転移部における疼痛を経時的に測定できるアッセイシステムを確立した。また骨転移巣を有する担癌マウスに、破骨細胞性骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネートを投与すると、疼痛の発生が有意に抑制された。従って、骨転移部における疼痛は、破骨細胞による骨吸収に起因すると示唆された。

(2) プロトン産生による骨痛の誘発機序

骨吸収時に産生されるプロトンイオンが、骨痛の誘発に関与している可能性を明らかにするために、プロトンイオン産生阻害剤を投与したところ、骨痛の発生が著明に抑制された。さらに、プロトンイオン受容体遺伝子を欠損するノックアウトマウスでは、疼痛の域値が、有意に上昇していた。これらの実験結果より、骨吸収時に産生されるプロトンイオンが、骨痛の発生に深く関与していると考えられた。

(3) PTHrP による疼痛の発症

悪性腫瘍が産生する PTHrP は、骨芽細胞における RANKL の発現を誘導し、骨吸収を促進させる。そこで PTHrP が、骨融解に伴う骨痛に関与しているか否かを検討した結果、PTHrP が、骨痛を誘発すること、また PTHrP 抗体が、疼痛域値を上昇させることが見出された。したがって PTHrP が、悪性腫瘍の骨転移に伴う、骨疼痛の発症に深く関与していることが明らかとなった。

(4) 前立腺癌による造骨性骨転移動物モデルの樹立

臨床的に、前立腺癌が造骨性に骨転移を形成することがよく知られているが、その動物実験モデルの樹立が大きな課題であった。ヒト前立腺癌に、種々の転写因子を遺伝子導入した結果、造骨性に骨転移巣を形成する細胞株の樹立に成功した。この細胞株を用いて、マイクロアレイを行い、骨形成に関与する遺伝子の候補のリストアップを行った。臨床的

には、乳がんが骨吸収性骨転移を来たすのに対し、前立腺がんでは、造骨性骨転移を来たすことが知られている。したがって、前立腺がんの骨転移の微小環境を理解するためには、前立腺がん骨転移動物実験モデルの樹立が必須である。研究代表者らは、ヒト前立腺がん細胞に活性型 STAT3 を導入すると、同細胞が、造骨性骨転移を形成することを見出している。そこで、マイクロアレイを用いて、STAT3 導入細胞が発現する遺伝子を網羅的に検索した結果、レプチン受容体の発現が増加していることが見出された。したがって、前立腺がんの骨転移には、レプチンシグナルが関与していると推察された。そこで、骨微小環境におけるレプチンが、転移した前立腺がん細胞と骨組織に対してどのような役割を果たしているかを明らかにするために、骨芽細胞および破骨細胞に対するレプチンの効果を検討した。その結果、レプチンは、骨芽細胞の分化を促進し、骨芽細胞の石灰化能を著明に増強した。これに対して破骨細胞の分化に対しては、レプチンは抑制作用を示した。これらの実験結果は、レプチンシグナルが、骨吸収を抑制し、骨形成を促進することにより、前立腺がんの骨形成作用を促していると示唆される。これに一致して、STAT3 過剰発現前立腺がん細胞の培養上清も骨吸収を抑制し、骨形成を促進した。この効果は、抗レプチン抗体により阻害された。以上の研究結果より、前立腺がんは、レプチンシグナルを活性化することにより、造骨性転移を形成すると考えられた。

(5) ビスホスホネートによる骨壊死のメカニズムの解明

近年、悪性腫瘍の骨転移を有する患者に骨吸収阻害剤ビスホスホネートを投与すると、重篤な顎骨壊死を来たすことがたびたび報告されており、臨床的に大きな問題点となっている。この点を解明するために、ビスホスホネートをマウスに投与し、抜歯を行った後に、その治癒機構を検索した。その結果、ビスホスホネートを投与されたマウス群では、血管新生が著しく阻害され、抜歯窩の治癒が遅延していることが見出された。さらにビスホスホネートが細菌の増殖を促進する傾向を確認した。すなわち、ビスホスホネートは、血管新生を阻害し、口腔内の細菌叢を変動させることにより、顎骨壊死を誘発していると示唆された。

(6) 癌骨転移部位における転写因子 HIF の重要性

癌における組織の低酸素化は古くから報告されてきたものの、骨転移におけるその生物学的意義は不明であった。そこで本研究計画では、乳癌の骨転移における低酸素環境の影響について検討した。その結果、乳癌の骨転移部の中心部は、転移癌周囲に比べて、酸

素濃度が非常に低いことが判明した。そこで次に、低酸素環境下にて活性化される転写因子 HIF-1 の役割について検索した。乳癌骨転移動物実験モデルを用いて検討を重ねた結果、骨転移部において、HIF-1 が活性化されており、乳癌の骨転移部位形成過程において重要な役割を果たしていることが判明した。これらの研究結果は、骨転移に対する新たな治療アプローチの開発に大きく貢献するものと期待される。

(7) 骨微小環境と癌細胞の関連分子の同定と役割の解明

骨微小環境と癌細胞との生物学的相互関係を明らかにするために、GFP を遺伝子導入した癌細胞を心穿刺あるいは皮下接種により移植し、蛍光顕微鏡下で骨転移巣の確認後、骨転移巣からセルソーターを用いて GFP 陽性である転移癌細胞を分離した。なお GFP の遺伝子導入は、レンチウイルスシステムを用いた。次に骨転移巣ならびに皮下接種腫瘍巣からセルソーティングした癌細胞群から、それぞれ全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析に供し、遺伝子発現の変動を解析した。その結果、皮下腫瘍部位に比較して、骨転移巣細胞では、TGF- β シグナルの促進が確認された。また、骨転移における重要性が報告されている遺伝子である Cadherin-11、PTHrP ならびに COX-2 の発現も上昇していることが確認された。したがって、骨転移部では、TGF- β シグナルが Cadherin-11、PTHrP ならびに COX-2 の発現に関与している可能性が示唆された。そこで骨転移巣において高発現が認められた複数の候補遺伝子についてさらに詳細な検討を行い、骨微小環境により誘導される骨転移調節因子として足場タンパク質 HEF1、転写因子 Dec1、接着因子 Pcdhb10 を同定した。これら遺伝子群と骨転移との相互関連を検討するために、骨転移を強力に抑制するビスホスホネート製剤を投与し、これら遺伝子の発現への影響を検討した。その結果、ビスホスホネート製剤によりこれら遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった。

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 82 件)

1) Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, Yatani H, Yoneda T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, with causing no osteonecrosis of the jaw in mice.

- J Bone Miner Metab 28: 165-175 (2010) (査読有り)
- 2) Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ota H, Takahashi S, Soen S, Taguchi A, Toyosawa S, Nagata T, Urade M. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: Position Paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Osteoporosis Society Japan, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. J Bone Miner Res (2010) 印刷中 (査読有り)
- 3) Reinholz MM, Zinnen SP, Dueck AC, Dingli D, Reinholz GR, Leslie A, Jonart LA, Kitzmann KA, Bruzek AK, Negron V, Abdulla A, Arendt BK, Croatt A, Sanchez-Perez L, Sebesta DP, Lönnberg H, Yoneda T, Nath KA, Jelinek DF, Russell SJ, Ingle JN, Spelsberg TC, Dixon H, Karpeisky A, Lingle WL. A novel approach for treatment of tumor-Induced bone diseases: Utilizing bisphosphonate derivatives of nucleoside anti-metabolites. Bone (2010) 印刷中 (査読有り)
- 4) Tamura D, Hiraga T, Myoui A, Yoshikawa H, Yoneda T. Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. Int J Oncol 33: 17-24 (2008) (査読有り)
- 5) Nakamura H, Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Fujisaki N, Yoneda T, Ozawa H. Involvement of cell-cell and cell-matrix interactions in bone destruction induced by metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice. J Bone Miner Metab 26: 642-647 (2008) (査読有り)
- 6) Oxmann D, Held-Feindt J, Stark AM, Hattermann K, Yoneda T, Mentlein R. Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. Oncogene 27: 3567-3575 (2008) (査読有り)
- 7) Bu G, Lu W, Liu C-C, Selander K, Yoneda T, Hall C, Keller ET, Li Y. Breast cancer-derived dickkopf1 inhibits osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression: Implication for breast cancer osteolytic bone metastases. Int J Cancer 123: 1034-1042 (2008) (査読有り)
- 8) Stark AM, Palmieri D, Meltzer PS, Walker RT, Mentlein R, Yoneda T, Mehdorn HM, Steeg PS, Held-Feindt J. Differential expression of matrix metalloproteinases in brain- and bone-seeking clones of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. J Neurooncol 81: 39-48 (2007) (査読有り)
- 9) Nagae M, Hiraga T, Yoneda T. Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization. J Bone Miner Metab 25: 99-104 (2007) (査読有り)
- 10) Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Yoneda T, Weil RJ, Stark AM, Kurek R, Vega-Valle E, Feigenbaum L, Halverson D, Vortmeyer AO, Steinberg SM, Aldape K, Steeg PS. Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain. Cancer Res 67: 4190-4198 (2007) (査読有り)
- 11) Block K, Gorin Y, Hoover P, Williams P, Chelmicki T, Clark RA, Yoneda T, Abboud HE. NAD(P)H oxidases regulate HIF-2 α protein expression. J Biol Chem 282: 8019-8026 (2007) (査読有り)
- 12) Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Yoneda T. Hypoxia and HIF-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. Cancer Res 67: 4157-4163 (2007) (査読有り)
- 13) Schmid BC, Rezniczek GA, Fabjani G, Yoneda T, Leodolter S, Zeillinger R. The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. Breast Can Res Treat 106: 333-342 (2007) (査読有り)
- 14) Yoneda T: Cancer in bone. Oral Science International 5: 63-72 (2007) (査読有り)
- 15) Hiraga T, Myoui A, Choi ME, Yoshikawa H, Yoneda T. Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor β enhances bone metastases in breast cancer. Cancer Res 66: 2067-2073 (2006) (査読有り)
- 16) Nagae M, Hiraga T, Wakabayashi H, Wang L, Iwata K, Yoneda T. Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone. Bone 39: 1107-1115 (2006) (査読有り)
- 17) Ohno H, Kubo K, Murooka H, Kobayashi Y, Nishitoba T, Shibuya M, Yoneda T, Isoe T. A c-Fms tyrosine kinase inhibitor, Ki20227, suppresses osteoclast differentiation and osteolytic bone destruction in a bone metastasis model. Mol Cancer Ther 5: 2634-2643 (2006) (査読有り)
- 18) Bowden ET, Onikoyi E, Slack R, Myoui A,

Yoneda T, Yamada KM, Mueller SC. Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 312: 1240-1253 (2006) (査読有り)

19) Heyn C, Ronald JA, Ramadan SS, Snir JA, Barry AM, MacKenzie LT, Mikulis DJ, Palmieri D, Bronder JL, Steeg PS, Yoneda T, MacDonald IC, Chambers AF, Rutt BK, Foster PJ. *In vivo* MRI of cancer cell fate at the single cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. *Magnetic Resonance Med* 56: 1001-1010 (2006) (査読有り)

20) Yoneda T, Hiraga T. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 679-687 (2005) (査読有り)

21) Hiraga T, Hata K, Ikeda F, Kitagaki J, Fujimoto-Ouchi K, Tanaka Y, Yoneda T. Preferential inhibition of bone metastases by 5'-deoxy-5-fluorouridine and capecitabine in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Oncol Report* 14: 695-699 (2005) (査読有り)

22) Hiraki A, Ueoka H, Takata I, Gemba K, Bessho A, Segawa Y, Kiura K, Eguchi K, Yoneda T, Tanimoto M, Harada M: Hypercalcemia/Leukocytosis syndrome associated with lung cancer. *Lung Cancer* 43:301-307, (2004) (査読有り)

23) Zhang J-H, Wang J, Tang J, Barnett B, Dickson J, Hashimoto N, Williams PJ, Ma W, Zheng W, Yoneda T, Pageau S, Chen J: Bone sialoprotein promotes bone metastasis of a non-bone-seeking clone of human breast cancer cells. *Anticancer Res* 24(3a): 1361-1368 (2004) (査読有り)

24) Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T: Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res* 10:4559-4567 (2004) (査読有り)

25) Mori Y, Shimizu N, Dallas M, Niewolna M, Story B, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T: Anti- $\alpha 4$ integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated with osteoclastic osteolysis. *Blood* 104: 2149-2154 (2004) (査読有り)

26) Kitagawa Y, Hiraga T, Yura Y, Yoneda T. Suppression by incadronate of invasion and growth of A-375 human melanoma in mandible in nude mice. *Oncol Report* 13: 211-216 (2005) (査読有り)

[学会発表] (計 40 件)

1) Nishisho M, Yoneda T et al. a3 Isoform of V-ATPase is critical to bone metastases. (2009)

アメリカ骨代謝学会 9月13日 デンバー

2) 王 麗楊, 米田 俊之ら5名 STAT3の活性化によるレプチンの産生増加は前立腺がんの造骨性転移を促進する. (2008) 日本骨代謝学会 10月31日 大阪

[図書] (計 3 件)

1) 米田 俊之 (2008) 生命歯科医学のカッティング・エッジ (総 287 ページ、大阪大学出版会)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：80142313

(2) 研究分担者

西村 理行 (NISHIMURA RIKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：60294112