

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07159

研究課題名(和文)新規乳がん骨転移モデルの解析を通じた、新規標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of novel target molecules involved in spontaneous bone metastasis of mouse breast cancer cell line.

研究代表者

佐々木 宗一郎 (Sasaki, Soichiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：50583473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス乳がん細胞株4T1細胞から、乳腺脂肪組織への同所移植によって高率に骨に自然転移する亜株4T1.3株を樹立した。がん細胞が骨内の正常細胞との相互作用を通して、骨内で増殖する点に着目して解析を行ったところ、骨転移巣の4T1.3株で発現亢進する受容体分子と、骨転移巣の線維芽細胞で受容体分子に対応するリガンド分子の発現を認めた。受容体分子の遺伝子を欠失した4T1.3株は骨転移巣形成が著明に減弱し、受容体分子の強発現は親株の骨転移巣形成を促進した。さらに、骨転移巣形成後に受容体分子の発現を減弱させると、転移巣の形成が抑制された。以上の結果より、乳がんの骨転移に対する新たな標的分子候補が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨転移は進行期の乳がん患者に好発し、生命予後を著しく低下させるが、骨転移に対する現行の治療法は対症療法に留まり、腫瘍細胞に直接作用する新たな治療法の開発が強く望まれている。我々は骨内の乳がん細胞選択的に発現が亢進する受容体分子を見出し、同分子はヒト乳がん患者の骨転移巣でも発現が認められた。さらに、受容体分子の発現亢進は乳がん細胞株の骨内増殖能を促進させ、発現の欠失は骨内増殖能を著しく減弱させた。本研究より骨転移巣におけるがん増殖に対する新たな受容体分子の関与が明らかとなった。この成果より、骨内のがん細胞の増殖そのものを抑制するという新たなコンセプトに基づいたがん骨転移治療法の開発が期待され

研究成果の概要(英文)：From a murine triple negative breast cancer cell line, 4T1, we established a subclone, 4T1.3, which can metastasize to bone upon its injection into orthotopically. Using this model, we reported that 4T1.3 cells induced the intra-bone accumulation of fibroblasts. We assumed that fibroblasts in bone could supply a growth factor for cancer cells expressing a corresponding receptor. Comprehensive gene expression analysis detected enhanced expression of a certain receptor and its cognate ligand in 4T1.3 cells and fibroblasts at bone metastasis sites, respectively. The receptor gene deletion in 4T1.3 cells reduced their capacity to form intraosseous tumors while the receptor gene transduction into 4T1 cells enhanced their capacity to form intraosseous tumors. Even after bone metastatic foci developed, inducible suppression of the receptor molecule expression suppressed metastasis formation. Thus, we identified a candidate molecule as a target for bone metastasis of breast cancer.

研究分野：がん転移

キーワード：乳がん 骨転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨転移は、特に進行期の乳がん・前立腺がん患者で併発し、生命予後を著しく低下させる。骨転移時に活性化していると考えられる破骨細胞に対して抑制作用のあるビスフォスフォネートや RANK リガンド抗体などが、骨転移治療薬として用いられているが、その効果は限定的である。さらに顎骨壊死などの重篤な副作用を生じることが報告されており、骨転移過程の細胞・分子機構の解明に基づく、新たな治療法の開発が強く望まれていた。

骨転移の初期過程では、がん細胞は骨髄内に到着後、骨髄内の破骨細胞・骨芽細胞や正常造血細胞・免疫細胞との相互作用を介して骨内に生着すると考えられている。しかし、ヒト骨転移の初期病変の診断は困難であるなどの理由から、ヒト試料を用いた詳細な解析には困難な点が多いため、マウスなどの実験動物を用いた骨転移モデルでの解析が依然として重要である。現在、免疫不全マウスに多数のヒト乳がん細胞を心臓内投与する骨転移モデルが汎用されているが、このモデルではがん細胞と骨髄内の正常細胞との相互作用の解析は困難である。一方、マウスの乳腺脂肪組織移植モデルでは骨への自然転移はほとんど見られないため、骨転移の初期過程を検討可能な新たな実験モデルの開発が必要不可欠であった。

この点を解決するために、我々はトリプルネガティブ乳がんのマウス細胞株である 4T1 から、乳房脂肪組織移植によって骨への自然転移を高率に起こす、乳がん細胞株 4T1.3 株を樹立し、骨転移過程の解析を試みた。解析の結果、4T1.3 株の高骨転移能は転移先の骨髄内での高い腫瘍形成能に由来していた。さらに、4T1.3 株は CCL4 を過剰に産生し、CCL4 の受容体である CCR5 を発現している線維芽細胞を骨内に集積させ、集積した線維芽細胞が産生する結合組織成長因子(CTGF)によって腫瘍増殖を促進されていることを明らかとした。腫瘍部位に集積する線維芽細胞は腫瘍関連線維芽細胞(CAF)と総称され、種々の増殖因子を産生し、腫瘍の増殖に寄与することが報告されている。我々は、骨転移過程においても CAF を介した微小環境の構築が乳がん骨転移巣形成に重要であることを世界で初めて報告した(Cancer Lett 2016;378(1):23)。その一方で、CTGF だけではこの骨転移過程全体を説明するには不十分な点があり、CTGF 以外の分子の関与が強く示唆された。これらの研究成果に基づき、従来注目されていなかった骨内に集積する線維芽細胞に焦点を当てた、乳がん骨転移の治療戦略の開発を進めるため、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、乳がん骨転移時に骨髄内に集積する線維芽細胞に着目し、骨転移過程において線維芽細胞が産生する、腫瘍増殖を亢進する新規標的分子の同定を目的とした。乳がん骨転移過程における腫瘍細胞と線維芽細胞の相互作用の分子基盤を解明し、骨転移過程に関与する新規標的分子を同定し、新たな骨転移治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するために、以下の方法で解析を遂行した。

- (1) 骨転移巣のがん細胞・CAF における発現分子の包括的解析に基づく、CAF とがん細胞との相互作用に関与する標的分子の選択

骨転移巣の 4T1.3 と線維芽細胞をフローサイトメトリー法にて分取し、それぞれの遺伝子発現を包括的に検索した。

骨転移巣での 4T1.3 のみで発現が亢進する受容体分子を抽出した。

骨髄内に集積した線維芽細胞において、抽出した受容体に対応するリガンドのうち、発現が亢進している分子を抽出した。

抽出した候補受容体の骨転移巣 4T1.3 細胞での発現をフローサイトメトリー法にて確認した。

- (2) 候補受容体分子の骨転移に対する機能解析

(1) で選択された候補受容体分子の発現を CRISPR-Cas 法により消失させた 4T1.3 株を作成し、in vitro での評価ならびに in vivo での腫瘍形成能を評価した。

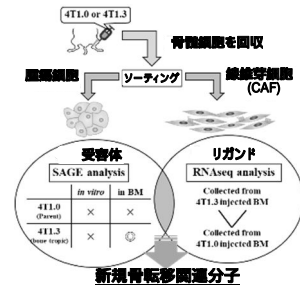
(1) で選択された候補受容体を強発現させた 4T1 親株を作成し、in vitro での評価ならびに in vivo での腫瘍形成能を評価した。

- (3) 候補受容体分子の誘導的な発現抑制に伴う治療効果の検討

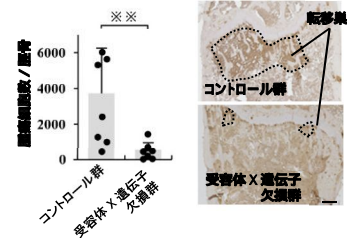
(1) で選択された候補受容体分子の発現をドキシサイクリン誘導性に抑制可能な 4T1.3 株を作成し、乳房脂肪組織移植による自然転移モデルを用いて、骨転移巣形成後の候補受容体分子の発現抑制を介した骨転移巣形成能を評価した。

4. 研究成果

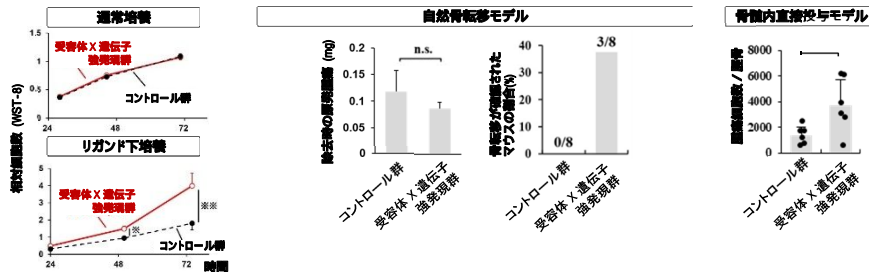
(1) がん細胞と線維芽細胞との相互作用の詳細な検討のため、骨髄内への腫瘍投与後に骨髄内で増殖している 4T1.3 と、骨髄内に集積した線維芽細胞をそれぞれフローサイトメトリー法にて分取し、包括的な遺伝子発現解析より骨髄内に集積する線維芽細胞とがん細胞との相互作用を介する分子の同定を試みた。骨髄内で増殖している 4T1.3 のみで発現が亢進する受容体分子と、それに対応するリガンドの発現が骨髄内に集積した線維芽細胞において亢進している、受容体-リガンドの組み合わせを抽出した(右図)。絞り込みにより複数の受容体分子が候補分子として抽出され、フローサイトメトリー法にて骨髄微小環境における発現の亢進をそれぞれ確認した。



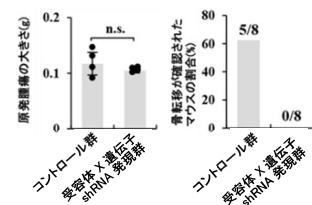
(2) CRISPR-Cas 法を用いて(1)の検討から絞り込まれた候補受容体分子遺伝子を欠失させた 4T1.3 株を作成し、受容体分子の発現と骨髄内での腫瘍細胞増殖との関連性を検討した。作成した細胞株を用いた検討より、コントロール群と比較して発現の欠失により骨髄内における腫瘍増殖能が有意に抑制される受容体分子 X が同定された(右図)。そこで、この分子 X を標的候補受容体分子と想定した。



一方、親株である 4T1 株にこの X 分子を強発現させた細胞株を用いて検討を行ったところ、通常の培養では発現の有無による増殖速度の顕著な差は認められなかったが、リガンド下の培養では、受容体分子 X を強発現させた細胞株の増殖速度が有意に亢進した(下左図)。さらに、この細胞株を用いて同所移植モデル、骨髄内直接投与モデルによる骨転移能の評価を行った。自然骨転移モデルでは受容体分子 X の強発現株で 3/8 (37.5%) にて骨転移が確認されたが、コントロール群では骨転移は確認されなかった 0/8 (0.0%) (下中図, 右)。この際、原発巣の増殖速度に有意な差は見られなかった(下中図, 左)。さらに、骨髄内直接投与モデルによる骨髄内での増殖能の検討を行ったところ、受容体分子 X の強発現株ではコントロール群と比較して、骨髄内での増殖の亢進がみられた(下右図)。



(3) 候補受容体分子 X に対する shRNA を骨転移巣形成後に発現誘導し、治療効果の可能性を検証した。同所移植から 2 週間後に原発腫瘍を除去し、ドキシサイクリンを含む飲水を与えて飼育し、骨転移の評価を行った。腫瘍除去時の原発腫瘍の大きさに有意な差は見られない一方で、骨髄内での腫瘍増殖は X 受容体遺伝子に対する shRNA を発現誘導した群で抑制されていた(右図)(骨転移巣が確認されたマウス数; コントロール群: 5/8、shRNA 発現群: 0/8)



以上の結果は、現在論文投稿の準備中である。

我々が見出した候補分子 X は、マウス乳がん細胞株の骨転移巣で特異的に発現亢進が認められた。さらに、候補分子 X の欠失は骨転移株の骨髄内増殖を抑制する一方で、候補分子 X の強発現は親株の骨髄内での増殖を亢進した。さらに、骨転移巣形成後に誘導的に候補分子 X の発現を抑制することで、骨髄内での腫瘍増殖は抑制された。候補分子 X のヒト骨転移巣での発現も確認していることから、候補分子 X を標的とする骨転移の新たな治療法の開発の可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Soichiro, Baba Tomohisa, Muranaka Hayato, Tanabe Yamato, Takahashi Chiaki, Matsugo Seiichi, Mukaida Naofumi.	4. 巻 ahead of print
2. 論文標題 Involvement of prokineticin 2-expressing neutrophil infiltration in 5-fluorouracil-induced aggravation of breast cancer metastasis to lung.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther.	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-17-0845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木宗一郎、向田直史
2. 発表標題 ケモカインレセプターCCR5阻害剤による乳がん骨転移制御の可能性の検証
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木宗一郎、坂本毅治、Di Zhang、馬場智久、向田直史
2. 発表標題 マウス乳がん細胞株による肺と骨への同時転移過程におけるMint3の役割の解明
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasaki S, Zhang D, Baba T, and Mukaida N
2. 発表標題 Identification of novel target molecules involved in spontaneous bone metastasis of mouse breast cancer.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasaki S, Baba T, Mukaida N
2. 発表標題 5-fluorouracil-induced neutrophilic chemokine expression in tumor cells is associated with accelerated lung metastasis of breast cancer
3. 学会等名 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木宗一郎、馬場智久、向田直史
2. 発表標題 フルオロウラシル投与によるマウス乳がん肺転移の促進機構の解明
3. 学会等名 第26回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sasaki S, Baba T, Mukaida N
2. 発表標題 Possibility of post-surgiccal adjuvant therapy with 5-fluorouracil to augment breast cancer metastasis to lungs
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	向田 直史 (Mukaida Naofumi) (30182067)	金沢大学・がん進展制御研究所・教授 (13301)	