

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19582

研究課題名(和文)骨転移巣における腫瘍-骨髄境界領域の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the border region between tumor and bone marrow cells in bone metastasis

研究代表者

岡本 一男 (Okamoto, Kazuo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授

研究者番号：00436643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨は代表的な転移標的臓器の一つであり、骨転移後の期待余命は低く予後不良を齎すものの、いまだがん骨転移の根治は困難である。抗PD1抗体や抗CTLA4抗体の登場によりがん免疫療法に脚光が浴びられる一方、転移性骨腫瘍に対する効果はいまだ限定的であり根治療法も確立されていない。そこで本課題では、骨転移巣で形成される特有の腫瘍微小環境に着目し、骨髄内の腫瘍微小環境の形成機構および、骨髄構成細胞群による骨転移制御の解析に取り組んだ。骨髄内の腫瘍微小環境を標的とすることで、抗腫瘍免疫応答を促進する新たな疾患制御法の確立を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遠隔臓器へのがん転移は、がんによる死亡の最大の要因となっている。しかしながら、いまだがん転移の制御は不十分であり、がん研究領域の克服すべき課題の一つである。本課題では、骨転移巣で形成される特徴的な「腫瘍細胞 骨髄境界領域」の形成に着目し、その形成機構の実態解明に取り組んだ。この境界領域を構成する細胞群は、骨転移に対する抗腫瘍免疫応答の抑制、および骨髄内の腫瘍進展に関与すると考えられる。本研究はがん骨転移の病理学的理解を深めるだけでなく、免疫学的アプローチによる新規の骨転移治療法開発の分子基盤の確立に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：Bone is one of the preferred sites for the metastasis of malignant tumors. Although the development of bone metastases is associated with a poor prognosis and shortened life expectancy for patients, it is still difficult to treat bone metastasis. While the cancer immunotherapies such as anti-PD1 and anti-CTLA4 antibodies has recently attracted much attention, their efficacies on bone metastasis is still limited. In this study, we focused on the unique type of tumor microenvironment in bone metastases, and tried to elucidate the mechanism underlying the tumor microenvironment formation in the bone marrow and the regulatory roles of bone cells in bone metastasis. By targeting the tumor microenvironment in the bone marrow, we aimed to establish novel therapeutic strategies to enhance anti-tumor immune response in bone metastasis.

研究分野：骨免疫学

キーワード：骨代謝 がん 骨転移 免疫

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

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因の1位であり、約半数の国民が一生のうち何らかのがんを患うと言われている。近年、検査技術の進歩によりがんの早期発見が可能となり、さらに抗がん剤や免疫療法といった原発巣に対する有効な治療方法も増え、がん患者の延命がえられる時代になった。一方でこうした患者の生存期間延長に伴い、遠隔臓器へのがん転移に関わる問題が顕在化し、がん患者の死亡の最大の要因となっている。いまだがん転移の制御は不十分であり、がん研究領域の克服すべき課題の一つである。骨は、肺、肝臓、脳に並ぶ代表的な転移標的臓器の一つであり、特に肺がん、乳がん、前立腺がん、メラノーマは骨転移をきたしやすいことが知られている。がんの骨転移は直接生命を脅かすことは少ないが、転移に伴う激しい痛み、病的骨折、脊髄圧迫による麻痺症状、高カルシウム血症などの有害事象 (skeletal-related events: SRE) を合併する。SRE が進展すると患者の QOL は著しく低下し、二次的にしばしば死亡に至る。抗 PD1 抗体や抗 CTLA4 抗体の登場によりがん免疫療法に脚光が浴びられる一方、その高額な医療費が問題視されるとともに、転移性骨腫瘍に対する効果はいまだ限定的であり治療法は未完である。そもそも転移性骨腫瘍に対する抗腫瘍免疫については多くが不明であり、その解明は免疫チェックポイント阻害薬による治療アプローチを進展させていく上で喫緊の課題である。

がん骨転移では、骨髄で腫瘍細胞が無秩序に進展し骨髄環境が大きく変容するため、腫瘍進展に伴う骨異常が抗腫瘍免疫応答に影響する可能性がある。しかしながら骨転移巣における腫瘍微小環境に関しては不明な点が多く、骨転移に応じて集積する免疫細胞や産生誘導される免疫因子に関して十分な解析がなされていない。そのため、骨転移で形成される腫瘍微小環境の実態を明らかにし、「骨」「腫瘍細胞」「免疫細胞」の三者の関係性に基いた包括的解析から、転移性骨腫瘍における抗腫瘍免疫応答の制御機構を理解することが必要である。

2. 研究の目的

研究代表者は、マウスのがん骨転移モデルを用いた解析から、骨転移巣における特殊な「腫瘍細胞-骨髄境界領域」の形成を見出している。そこで本課題では、骨転移における「腫瘍細胞-骨髄境界領域」の形成機構の解析に取り組んだ。この特殊な腫瘍微小環境の形成に関わる免疫細胞や骨代謝細胞、それらが産生する因子に着目し、それらの病理学的意義を解析する。境界領域の形成破綻により抗腫瘍免疫応答を促進する新たな制御法の確立を目指す。

3. 研究の方法

マウスのがん骨転移モデルとして、マウス C57BL/6 背景のメラノーマ細胞株 B16F10、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞株の左心室投与による骨転移モデルを使用した。これらのモデルはどちらも汎用性が高い。特に B16F10 細胞による骨転移モデルでは、免疫不全マウスをレシピエントとして用いる必要がなく、さらに非溶骨性の転移モデルであるため、転移腫瘍と免疫応答の解析に適切なモデルであると判断できる。研究代表者は、緑色蛍光タンパク質 ZsGreen を発現させた安定発現細胞株 (B16F10-ZsGreen) も作製しており、蛍光観察により腫瘍領域を評価することが可能である。

4. 研究成果

骨転移巣で形成される腫瘍微小環境の形成機構および骨髄構成細胞による骨転移制御の解析を実施し、「腫瘍細胞-骨髄境界領域」の形成機序の解明とその制御による抗腫瘍免疫応答の効率化に取り組んだ。

(1) 腫瘍細胞-骨髄細胞間の境界領域を構成する細胞の特定

B16F10 細胞株を用いた骨転移マウスの大腿骨の病理組織標本を作製し、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等の免疫細胞、及び骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮細胞、CXCL12 陽性細胞等の骨髄構成細胞に対する特異的抗体を用いて免疫染色を実施し、骨転移によりもたらされる骨髄構成細胞の変化を明らかにした。オールインワン顕微鏡 (Keyence) を用いた組織イメージング解析を通じて、特に腫瘍細胞-骨髄境界領域を構成する細胞集団の定量解析を行った。

(2) 境界領域構成細胞の遺伝子発現変動解析と、骨転移巣の分泌因子の網羅解析

骨転移巣における腫瘍、骨髄構成細胞をセルソーター (BD FACS AriaIII) により単離して、RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。境界構成細胞に特徴的な遺伝子発現変動を解析した。さらに B16F10 細胞の培養上清ならびに骨髄液中の分泌タンパク質を四重極飛行時間型質量分析装置 TripleTOF5600 (ABSCIEX) を用いて、網羅的同定及び検体間の比較定量解析を行った。以上のトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析の結果から、骨転移によって誘導される遺伝子・タンパク質発現変動を検討し、境界構成細胞に関連性の高い因子群を抽出した。これらはがん細胞-骨髄境界領域の形成に関与する候補因子と想定された。パスウェイ解析を通して T 細胞や制御性 T 細胞、樹状細胞、腫瘍随伴マクロファージ

ジなどの抗腫瘍免疫応答に関与が疑われる因子、シグナル経路の候補を探索した。さらに、候補因子に対する標的分子(受容体など)に関して、パブリックデータベースや研究代表者保有のトランスクリプトームデータベースから、以上の免疫細胞群での発現を確認し、最終的に腫瘍微小環境形成に関連性の高い因子群を抽出し、その病理学的意義を検討した。

(3) 低分子 RANKL 阻害化合物による骨転移抑制

破骨細胞分化必須サイトカイン RANKL は骨転移病態に深く関与することが知られているが、上記の網羅解析からも RANKL シグナルの関連性が認められた。腫瘍細胞は骨に転移すると骨芽細胞に作用して、RANKL の発現を亢進させる。その結果、破骨細胞による骨吸収が進むため、骨基質中の TGF や IGF などの増殖因子が放出され、がん細胞に対して肥沃な環境が形成され、さらに腫瘍細胞の増殖が進む。こうした「骨」と「がん細胞」で形成される悪循環が骨転移病態に根付いている。一方で、サイトカイン RANKL は T 細胞にも発現し、多彩な免疫制御能も有することが知られている (Okamoto, *Physiol Rev*, 2017)。そこで、新規 RANKL シグナル低分子阻害剤 (AS2676293) を用いて、骨転移に対する効果を検証した。AS2676293 の経口投与により B16F10 細胞のマウスがん骨転移モデルが有意に抑えられることがわかった。またヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 を用いた骨転移モデルに対しても、AS2676293 の経口投与は顕著な骨溶解阻害と腫瘍進展抑制効果が認められた (Nakai, *Bone Res*, 2019)。RANKL の抗体製剤デノスマブは既に骨粗鬆症や、多発性骨髄腫・骨転移による骨病変、関節リウマチに対して使用されており、骨吸収阻害薬として高い注目を受けている。低分子阻害剤による RANKL 阻害療法は RANKL 抗体製剤の代替としてだけでなく、がん骨転移の新たな治療戦略としても大いに期待できるといえる。また近年、抗 RANKL 抗体デノスマブは、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA4 抗体との併用により高い骨転移抑制効果を示すことが報告されている (Ahern, *Oncoimmunol*, 2018; Liede, *Oncoimmunol*, 2018)。興味深いことに抗 RANKL 抗体と免疫チェックポイント阻害薬との併用により、エフェクター T 細胞数の上昇が報告されており、RANKL による T 細胞免疫制御能の重要性が指摘されつつある。RANKL 阻害は抗腫瘍免疫応答への影響を示す可能性が考えられ、RANKL 低分子阻害薬の開発は新たな複合的がん治療の一助として期待される。

<引用文献>

- Okamoto K, Nakashima T et al., Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiological Reviews*, 97: 1295-1349, 2017
- Nakai Y, Okamoto K et al., Efficacy of an orally active small-molecule inhibitor of RANKL in bone metastasis. *Bone Research*, 7: 1, 2019
- Ahern E, Harjunpaa H et al., RANKL blockade improves efficacy of PD1-PD-L1 blockade or dual PD1-PD-L1 and CTLA4 blockade in mouse models of cancer. *Oncoimmunology*, 7(6):e1431088, 2018
- Liede A, Hernandez RK et al., An observational study of concomitant immunotherapies and denosumab in patients with advanced melanoma or lung cancer. *Oncoimmunology*, 7(12):e1480301, 2018

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

- Mikihiro Hayashi, Tomoki Nakashima, Noriko Yoshimura, Kazuo Okamoto, Sakae Tanaka and Hiroshi Takayanagi. Autoregulation of Osteocyte Sema3A Orchestrates Estrogen Action and Prevents Bone Ageing. *Cell Metabolism*, 29: 1-11, 2019 査読有 DOI: 10.1016/j.cmet.2018.12.021.
- Yuta Nakai, Kazuo Okamoto*, Asuka Terashima, Shogo Ehata, Jun Nishida, Takeshi Imamura, Takashi Ono and Hiroshi Takayanagi* (*: corresponding authors) Efficacy of an orally active small-molecule inhibitor of RANKL in bone metastasis. *Bone Research*, 7: 1, 2019 査読有 DOI: 10.1038/s41413-018-0036-5.
- Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi. *Osteoimmunology*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 9:1, 2019 査読有 DOI: 10.1101/cshperspect.a031245.
- Maia Inoue, Kazuo Okamoto, Asuka Terashima, Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Takako Negishi-Koga, Toshio Kitamura, Tomoki Nakashima, and Hiroshi Takayanagi. Arginine methylation controls the strength of c family cytokine signaling in T cell maintenance. *Nature Immunology*, 19: 1265-1276, 2018 査読有 DOI: 10.1038/s41590-018-0222-z
- Masayuki Tsukasaki, Noriko Komatsu, Kazuki Nagashima, Takeshi Nitta, Warunee Pluemsakunthai, Chisa Shukunami, Yoichiro Iwakura, Tomoki Nakashima, Kazuo Okamoto, and Hiroshi Takayanagi. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nature Communications*, 9: 701, 2018 査読有 DOI: 10.1038/s41467-018-03147-6.
- Kazuo Okamoto, Tomoki Nakashima, Masahiro Shinohara, Takako Negishi-Koga, Noriko Komatsu, Asuka Terashima, Shinichiro Sawa, Takeshi Nitta and Hiroshi Takayanagi.

〔学会発表〕(計39件)

1. 岡本一男 「骨免疫学～病態に潜む骨と免疫のコミュニケーションを探る～」 宮崎 医学と医療の最前線を考える会 2019、2019年3月26日
2. 浅野達雄、岡本一男、中井雄太、堤雅紀、末松綾子、岡村匡史、新田剛、高柳広 「可溶性 RANKL の破骨細胞分化および免疫組織形成における生理的意義」第4回日本骨免疫学会 ウィンターセミナー、2019年1月25日
3. 岡本一男、井上真以亜、中島友紀、高柳広 「アルギニンメチル基転移酵素による T 細胞制御」 第4回日本骨免疫学会 ウィンターセミナー、2019年1月24日
4. Maia Inoue, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi 「PRMT5-mediated arginine methylation essential for the strength of γ c family cytokine signaling in T cell maintenance」 第47回日本免疫学会学術集会、2018年12月12日
5. 岡本一男 「骨免疫学の進歩」 第33回日本臨床リウマチ学会、2018年11月24日
6. 岡本一男 「骨粗鬆症の治療の進歩」 公益財団法人日本リウマチ財団 法人賛助会員セミナー、2018年11月13日
7. 井上真以亜、岡本一男、中島友紀、高柳広 「アルギニンメチル基転移酵素 PRMT5 は、T 細胞における γ c ファミリーサイトカインのシグナル強度を制御する」 第5回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2018年11月3日
8. 岡本一男、井上真以亜、中島友紀、高柳広 「血球系細胞における EF-hand タンパク質 Efp の生理機能解析」 第5回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2018年11月2日
9. 浅野達雄、岡本一男、中井雄太、堤雅紀、末松綾子、岡村匡史、新田剛、高柳広 「生理的状況下における可溶性 RANKL の破骨細胞分化と免疫組織形成への寄与」 第5回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2018年11月2日
10. 中井雄太、岡本一男、寺島明日香、江幡正悟、西田純、小野卓史、高柳広 「がん骨転移に対する RANKL 低分子阻害剤の有効性評価」 第5回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2018年11月2日
11. 寺島明日香、岡本一男、高柳広 「全身炎症時の免疫不全に対する治療標的としての骨芽細胞の検討」 第5回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2018年11月2日
12. 杉田拓也、岡本一男、高柳広 「破骨細胞と樹状細胞で発言する Gsod 遺伝子の機能解析」 第5回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2018年11月2日
13. Wenqiang Yin, Kazuo Okamoto, Asuka Terashima, Takehito Ono, Hiroshi Takayanagi 「Acvr1Q207D マウスを用いた筋肉損傷による異所性骨化の誘導」 第5回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2018年11月2日
14. 岡本一男 「可溶性 RANKL の生理学的機能に関する解析」 第19回運動器科学研究会、2018年9月7日
15. 岡本一男 「RANKL 阻害による自己免疫疾患及びがん治療の展望」 第4回日本骨免疫学会、2018年6月25日
16. 浅野達雄、岡本一男、中井雄太、堤雅紀、末松綾子、岡村匡史、新田剛、高柳広 「破骨細胞分化と免疫組織形成における可溶性 RANKL の生理的意義」 第4回日本骨免疫学会、2018年6月25日
17. 寺島明日香、井上真以亜、岡本一男、古賀貴子、中島友紀、高柳広 「NKT 細胞の初期分化に必須な制御因子の同定」 第4回日本骨免疫学会、2018年6月25日
18. 井上真以亜、岡本一男、中島友紀、高柳広 「タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 PRMT による T 細胞制御機構の解明」 炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム 2018 年学術集会、2018年3月10日
19. 岡本一男 「RANKL を標的とした自己免疫疾患とがん治療の有効性」 本郷免疫ネットワークカンファレンス、2018年2月21日
20. Maia Inoue, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi 「A critical epigenetic regulator of early iNKT cell development」 第46回日本免疫学会学術集会、2017年12月14日
21. Kazuo Okamoto, Maia Inoue, Hiroshi Takayanagi 「A distinct role of an EF-hand motif protein in the hematopoietic cell lineage」 第46回日本免疫学会学術集会、2017年12月12日
22. 岡本一男 「関節リウマチ骨破壊を担う RANKL の新たな機能～腸管免疫から多発性硬化症の治療標的まで～」 第13回骨免疫ワークショップ、2017年11月10日
23. Asuka Terashima, Kazuo Okamoto, Tomoki Nakashima, Koichi Ikuta and Hiroshi Takayanagi 「Osteoblasts mediate immunosuppression during sepsis by regulating lymphopoiesis」 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Cytokines 2017、2017年10月31日
24. Kazuo Okamoto, Maia Inoue, Hiroshi Takayanagi 「Identification of an EF-hand motif protein for regulation of Jak-Stat signaling pathway」 5th Annual Meeting of the

- International Cytokine & Interferon Society, Cytokines 2017、2017年10月30日
25. Maia Inoue, Kazuo Okamoto, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi 「Identification of an essential epigenetic regulator of early iNKT cell development」 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Cytokines 2017、2017年10月30日
 26. 井上真以亜、岡本一男、中島友紀、高柳広 「iNKT細胞の早期分化を制御するエピジェネティック制御因子の解析」 第3回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2017年10月13日
 27. Asuka Terashima, Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi 「PTH stimulation of osteoblasts protects against immunodeficiency」 ASBMR 2017、2017年9月9日
 28. 寺島明日香、岡本一男、高柳広 「骨芽細胞のリンパ球分化制御破綻は敗血症時の免疫不全を誘導する」 第18回 運動器科学研究会、2017年9月1日
 29. 尹文強、岡本一男、寺島明日香、小野岳人、高柳広 「損傷による異所性骨化の新規マウスモデルの確立」 第35回 日本骨代謝学会学術集会、2017年7月28日
 30. 寺島明日香、岡本一男、中島友紀、高柳広 「敗血症に起因する全身炎症時の免疫不全は骨芽細胞消失が原因である」 第38回 日本炎症・再生医学会、2017年7月19日
 31. 小野岳人、岡本一男、中島友紀、新田剛、高柳広 「骨折治癒と免疫・炎症」 第38回 日本炎症・再生医学会、2016年7月19日
 32. 岡本一男、井上真以亜、中島友紀、高柳広 「血球系細胞におけるEF-hand タンパク質 Efp の役割」 第38回 日本炎症・再生医学会、2017年7月18日
 33. 中井雄太、岡本一男、寺島明日香、小野卓史、高柳広 「悪性黒色腫の骨転移が与える骨髓造血環境への影響」 第38回 日本炎症・再生医学会、2017年7月18日
 34. 岡本一男、井上真以亜、中島友紀、高柳広 「EF-hand タンパク質 Efp による赤芽球分化制御」 第3回 日本骨免疫学会、2017年6月28日
 35. 寺島明日香、岡本一男、高柳広 「全身炎症における治療標的としての骨芽細胞の検討」 第3回 日本骨免疫学会、2017年6月27日
 36. 岡本一男 「T細胞による骨代謝制御」 第35回 日本骨代謝学会学術集会 2017年度研究奨励賞 受賞講演、2017年7月28日
 37. 岡本一男 「適応免疫系による炎症性骨破壊の制御」 RA Immunology Seminar、2017年6月14日
 38. Kazuo Okamoto 「IL-17-producing T cells in the autoimmune and bone diseases」 Immunology 2017: The American Association of Immunologists (AAI)、2017年5月13日
 39. Asuka Terashima, Kazuo Okamoto, Tomoki Nakashima, Shizuo Akira, Koichi Ikuta and Hiroshi Takayanagi 「Immunodeficiency is caused by osteoblast ablation during sepsis」 第17回 東京大学生命科学シンポジウム、2017年4月15日

〔図書〕(計 3件)

Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi, "Osteoimmunology", Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease, Second Edition, 261-282, 2017 (出版社: ACADEMIC PRESS/ELSEVIER)

岡本一男 「IL-17産生性T細胞による骨の制御」日本臨床免疫学会会誌 40巻5号 p361-366, 2017 (出版社: 日本臨床免疫学会)

岡本一男、高柳広 「Overview - その研究の新たな潮流」THE BONE 特集 『骨免疫学の進歩が変える骨関節疾患アプローチ』 Vol.31 No.2 p19-28, 2017 (出版社: メディカルレビュー社)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科 骨免疫学寄付講座ホームページ:
<http://www.osteimmunology.com/kifu.html>

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。