

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2006~2008

課題番号:18591631

研究課題名(和文) 悪性骨腫瘍の転移制御機構の解明と抗転移療法の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the metastasis of malignant bone tumors and anti-metastasis therapy

研究代表者

名井 陽(MYOUI AKIRA)

大阪大学医学部附属病院・准教授

研究者番号:10263261

研究成果の概要:骨肉腫の肺転移に重要な転写因子である NF κ B を天然阻害剤パルテノライド投与やデコイオリゴヌクレオチド吸入療法で阻害することにより転移抑制効果を得た。肺胞上皮細胞、マクロファージの培養上清が骨肉腫細胞の NF κ B 活性を促進することを見だし、骨肉腫の肺指向性の一因である可能性が示唆された。HIF-1 阻害剤アピジェニンも骨肉腫肺転移を抑制した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・整形外科学

キーワード:①悪性骨腫瘍、②転移、③微小環境、④骨形成因子、⑤アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、各種癌の集学的治療の成果により担癌状態でも長期生存する例も多く見られるようになってきたが、骨肉腫に代表される原発性悪性骨腫瘍では一旦肺転移が顕性化すると極めて予後が悪く、現在有効な治療手段が無い。いかに最大の予後規定因子である肺転移を予防し治療するかがきわめて重要である。本研究の最終目標は、原発性悪性骨腫瘍の転移の分子機構を明らかにし、その分子を標的とした特異的な薬物療法あるいは遺伝子治療による予防・治療法を確立することである。

我々は骨肉腫細胞で valosin-containing protein (VCP) が NF κ B の活性化を介してアポトーシス抵抗性を獲得し肺転移を促進することを

報告したが (Asai T, et al. VCP (p97) regulates NF κ B signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line. Jpn J Cancer Res. 2002. 93(3):296-304.)、この VCP はその後の臨床病理学的研究で多くの癌種(胃、食道、肝、大腸、膵、前立腺、甲状腺など)で予後や転移の発生と高い相関を示すことが報告されている。骨肉腫では p53 の変異が高率に存在し、これが NF κ B 及び hypoxia inducible factor (HIF)-1 α を活性化している可能性がある。そこで、p53 変異-NF κ B 活性化によるアポトーシス抵抗性の獲得、HIF-1 α の活性化の骨肉腫肺転移能に与える影響を検証する。また、骨肉腫の転移は強い肺への指向性を示

すが、我々は各種臓器を皮下移植した異所性臓器に対する転移実験においても、骨肉腫細胞は肺組織に強い指向性を示すことを明らかにした (Obata H, et al. Analysis of organ selectivity in the metastatic behavior of Dunn osteosarcoma. Clin Orthop. 2002. (398):212-22.). さらに肺器官または肺胞上皮細胞の培養上清中に骨肉腫細胞の増殖を促進する因子が含まれること、高肺転移性骨肉腫細胞が肺胞上皮細胞の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 産生を促進する因子を分泌することを見いだしている。転移標的臓器である肺組織のニッチすなわち微小環境因子が骨肉腫の肺転移に及ぼす影響とそのメカニズムを検討する。

2. 研究の目的

[1] NFκB の阻害剤パルテノライドの骨肉腫肺転移に及ぼす影響の検討

マウス骨肉腫細胞株 Dunn から Fidler の方法にて得られた高肺転移株 LM8 は皮下移植により腫瘍を形成し、その後自然肺転移を生じる。天然ハーブ由来の民間抗炎症薬フィーバーフューは偏頭痛に対し有効であることが臨床試験で示され、副作用もほとんど無いことが知られているが、その有効成分であるパルテノライド parthenolide は NFκB の特異的阻害剤であることが最近示されている。そこで LM8 骨肉腫細胞の自然肺転移モデルを用いて、骨肉腫肺転移における NFκB の役割を検討しパルテノライドの転移抑制剤としての有効性を検討した。

[2] NFκB に対するデコイオリゴヌクレオチドによる骨肉腫肺転移の阻害

肺転移に対する新たな治療法として様々な遺伝子治療が研究されているがその中でデコイオリゴヌクレオチド (デコイ ODN) を用いた骨肉腫肺転移の遺伝子治療について検討した。デコイ ODN は細胞内で転写因子に作用して遺伝子発現を変化させる。通常、遺伝子発現は target gene の上流に位置する転写調節領域による調節を受けており、転写因子が cis-element に結合することで転写活性が上昇し発現が亢進する。デコイ ODN は 20 塩基対前後の二重鎖ヌクレオチドでその配列中に目的とする転写因子の

cis-element と同じ配列が含まれており、転写因子が本来の DNA 上の cis-element に結合することを競合的に阻害し遺伝子の発現を抑制する。

NFκB は腫瘍増殖、転移に重要な関連を持つと考えられているので、これをターゲットとしたデコイ ODN を用いて骨肉腫肺転移抑制の可能性について検討した。

[3] 宿主肺細胞によるマウス骨肉腫細胞 LM8 の NFκB 活性促進効果

我々は、マウス骨肉腫高肺転移株 LM8 を樹立し、親株 Dunn とのサブトラクション解析から、NFκB が肺転移形成に重要であることを明らかにしてきた。パルセノライドを用いた NFκB 抑制実験では LM8 尾静注から 48 時間後の投与開始群では肺転移抑制効果が消失することから、NFκB 活性化は肺転移形成初期に重要であると考えられ、LM8 が肺特異的転移することより、LM8 は肺微小環境中に入ると NFκB 活性は促進されるという仮説のもと、この過程における宿主肺細胞の役割を検討した。

[4] HIF-1 阻害剤アピジェニンの LM8 マウス骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果

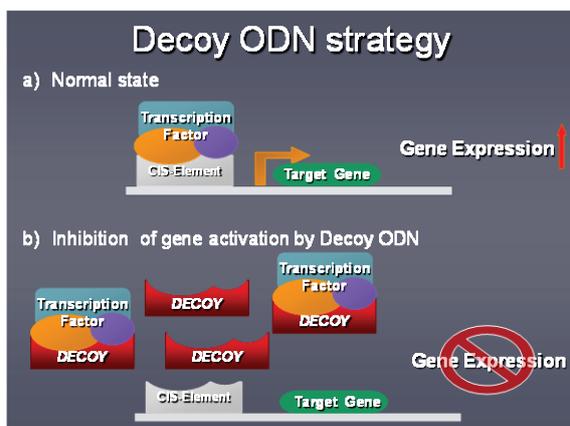
転写因子 HIF-1 は VEGF などの血管新生促進因子や BCL-xL などのアポトーシス抑制因子を下流遺伝子として持ち、腫瘍の増殖に深く関与していると考えられている。天然 HIF-1 阻害剤であるアピジェニンは、近年、前立腺癌や卵巣癌などに対する抗腫瘍効果が報告されている。本研究では、アピジェニンが骨肉腫細胞に対しても抗腫瘍効果 (特に肺転移抑制効果) を有しているかを検討した。

3. 研究の方法

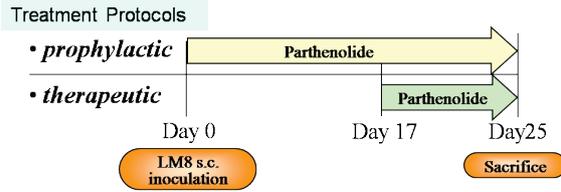
[1] NFκB の阻害剤パルテノライドの骨肉腫肺転移に及ぼす影響の検討

LM8 は C3H マウスに皮下接種することで皮下に生着増殖し、さらに肺転移をきたし、腫瘍細胞接種後 4-5 週で肺転移により死亡する。この LM8 骨肉腫細胞の自然肺転移モデルを用いて、骨肉腫肺転移における NFκB の役割を検討した。

NFκB が恒常的に活性化している LM8 に変異型 IκB を強発現させ、選択的に NFκB 活性を阻害した細胞株 LM8mIκB を作成した。この細胞株あるいは天然 NFκB 阻害剤であるパルテノライド (PAR) を用いて LM8 の転移能における NFκB の役割およびパルテノライドの転移抑制剤としての有効性について検討した。LM8 細胞に対するパルテノライドの *in vitro* での作用について、NFκB のゲルシフト法、リポーターアッセイ、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 産生、アポトーシス、細胞遊走能にて検討した。LM8 細胞皮下注による自然肺転移モデルにおいて、パルテノライド (0.1μg - 1mg/kg/day、腹腔内) の予防的投与 (腫瘍移植と同時に開始) および治療的投与 (移植後 17 日目より開始) を行い、肺転移



について組織学的に検討した。



[2] NFκB に対するデコイオリゴヌクレオチドによる骨肉腫肺転移の阻害

NFκB デコイは 20 塩基対の二重鎖合成オリゴであり、NFκB 結合領域を持っている。一方、スクランブルデコイは同じ 20 塩基対の 2 重鎖オリゴであるが NFκB の結合領域は持たない。

Design of Synthetic decoy ODN

▶ NFκB decoy ODN

5'-CCTTCAA GGGATTTCCC TCC-3'
GGAAGTT CCCTAAAGGG AGG

▶ Scramble decoy ODN

5'-TTGCCGT ACCTGACTTA GCC-3'
AACGGCA TGGACTGAAT CGG

In vitro で LM8 の内因性 NFκB と NFκB デコイとの結合性を EMSA を用いて解析し、また、NFκB デコイが LM8 の増殖に与える影響を検討した。In vivo では NFκB デコイの吸入治療モデルを作成し、肺転移巣面積の定量と生存期間について検討した。

[3] 宿主肺細胞によるマウス骨肉腫細胞 LM8 の NFκB 活性促進効果

NFκB 結合部位を持つ luciferase reporter construct を LM8 に遺伝子導入した stable transfectant (以下、LM8-NF/luc) を作成した。LM8-NF/luc を各臓器(肺、肝、脾、腎)培養上清、肺を構成する細胞の cell line である II 型肺胞上皮細胞株(MLE-12)、肺泡マクロファージ細胞株(MH-S)、血管内皮細胞株(UV₂)との培養上清にて 24 時間培養し、NFκB 活性を Luciferase assay にて、細胞増殖を cell count にて、apoptosis を annexin-V の FACS にて測定した。また NFκB の下流遺伝子である VEGF、MMP-2,9 や転移関連遺伝子の一つである Fibronectin の発現については RT-PCR 法で解析した。

[4] HIF-1 阻害剤アピジェニンの LM8 マウス骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果

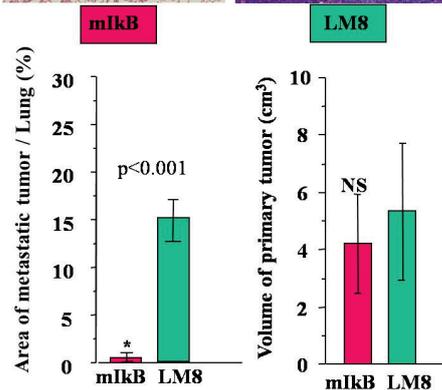
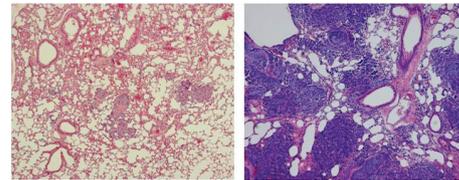
LM8 細胞をアピジェニン(0-50μM)の存在下で培養し、WST-8 assay にてその細胞増殖に対する効果を、FACS にて apoptosis に対する効果を調べた。さらにマウス皮下移植モデルを用いて、in vivo での抗腫瘍効果および肺転移抑制効果についても検討を加えた。

4. 研究成果

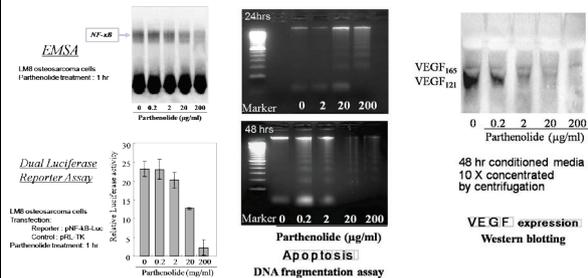
[1] NFκB の阻害剤パルテノライドの骨肉腫肺転移に及ぼす影響の検討

LM8 に変異型 IκB を強発現させ選択的に

NFκB 活性を阻害した細胞株 LM8mIκB では NFκB の DNA 結合能および転写活性が抑制されていることが EMSA および NFκB レポーターアッセイにて確認された。また LM8mIκB は VEGF 産生能も低下していた。皮下移植自然肺転移モデルによる検討では、LM8mIκB 細胞は LM8 に比べ低肺転移能を示した。パルテノライドは LM8 に対して in vitro で、

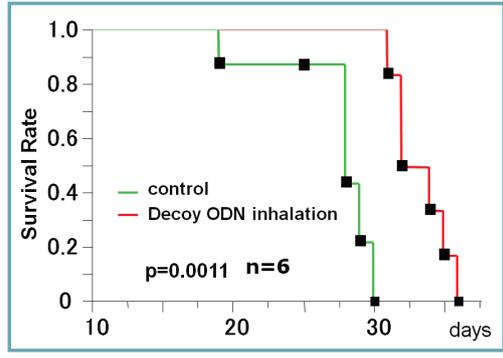
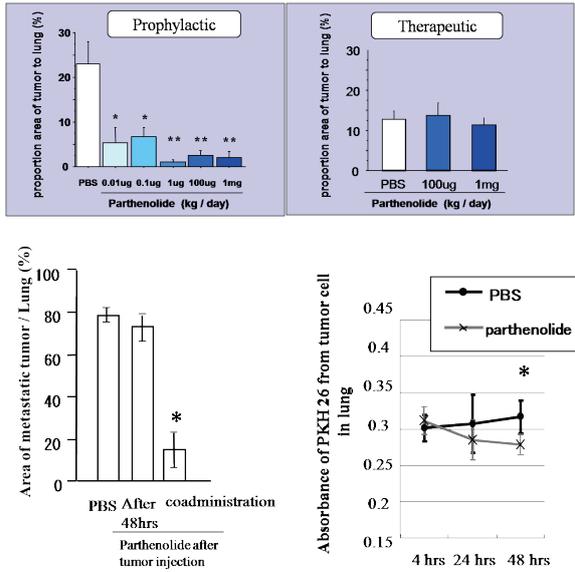


DNA 結合能、転写活性、VEGF 産生を抑制し、



低用量から強力にアポトーシスを誘導した。

一方、マウス尾静脈注による肺転移実験系においても LM8mIκB 細胞は LM8 に比べ低肺転移能を示し、LM8 尾静注と同時にパルテノライドによる治療を開始する実験でも肺転移が著明に抑制されたが、尾静注後 48 時間からパルテノライドの投与を開始した場合には肺転移は抑制されなかった。蛍光標識した LM8 を尾静注した後、経時的に肺組織に生着した細胞の量を組織抽出液中の蛍光で計測したところ、尾静注と同時にパルテノライド投与を開始した場合、未治療群に比べ尾静注後 48 時間で有意に肺に生着した細胞が減少することがわかった。このことから NFκB は LM8 の肺転移に於いて、細胞の肺血管床着床後から肺組織内に浸潤して小コロニーを形成するまでの段階で重要な役割を担っていると考えられる。また、分子機構としては抗アポトーシス、VEGF 産生促進などが重要なメカニズムであると推測している。

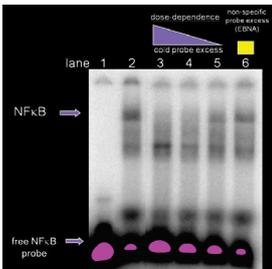


1000 μ g の NF κ B デコイを 25 μ l に溶解して投与し、対照群は PBS を投与した。治療開始後 25 日時点での摘出した肺は対照群では全例で肺組織表面に転移小結節が多数認められたが、NF κ B デコイ治療群では結節数が著明に少ない個体が見られた。肺転移巣の面積率は NF κ B デコイ投与群で有意に低かった。生存期間の検討でも NF κ B デコイ治療群では生存期間が延長していた。

[2] NF κ B に対するデコイオリゴヌクレオチドによる骨肉腫肺転移の阻害

(1) EMSA

LM8 の核抽出液を用いた EMSA では内因性 NF κ B と合成した NF κ B デコイとが結合することが示唆された (Lane2)。



(2) 細胞増殖

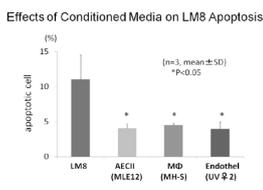
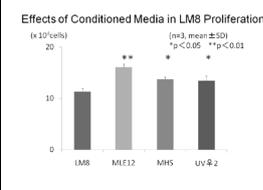
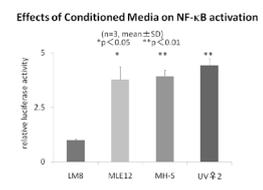
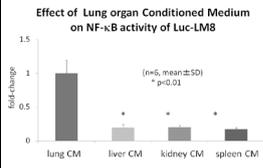
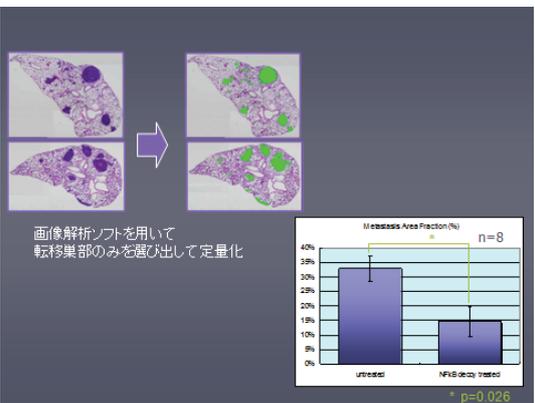
NF κ B デコイまたはスクランブルデコイを LM8 にトランスフェクションし、24 時間後に WST-1 assay を施行、NF κ B デコイをトランスフェクションした細胞は増殖が抑制されていた。

(3) デコイ吸入治療モデル

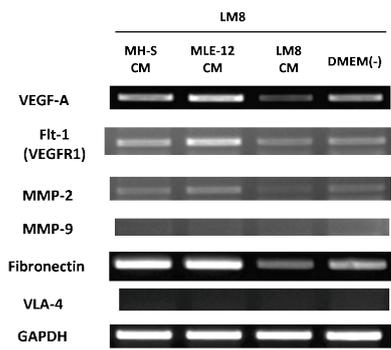
動物実験モデルでのデコイ投与は Kleinerman らの気道内投与法すなわち、吸入麻酔薬により鎮静したマウスを鼻腔が上を向くように垂直に持ち、その状態を保ったままで薬剤を一滴ずつ滴下し気道内に投与する。デコイ吸入治療モデルでは C3H マウス皮下に LM8 細胞を接種し、接種翌日より連日気道内投与を行った。NF κ B デコイ投与群では一日あたり

[3] 宿主肺細胞によるマウス骨肉腫細胞 LM8 の NF κ B 活性促進効果

NF κ B 活性は臓器間の培養上清での比較では、肺臓器培養上清において有意に LM8 の NF κ B 活性を促進した。MLE-12、MH-S、UV Φ 2 の培養上清において NF κ B 活性は促進された。いずれの細胞株の培養上清においても有意に LM8 の Apoptosis は抑制され、細胞増殖は促進された。MLE-12、MH-S の培養上清では VEGF、MMP-2、Fibronectin の発現が亢進した。LM8 の NF κ B 活性は extravasation し、肺微小環境に入ると、II 型肺上皮細胞、肺泡マクロファージからの paracrine factor により活性化され、apoptosis が抑制され、細胞増殖及び angiogenic factor の発現が促進されることで転移形成が促進されると考えられた。肺細胞による NF κ B 活性促進作用は LM8 肺転移における seed and soil theory 分子機構の一つと考えられた。

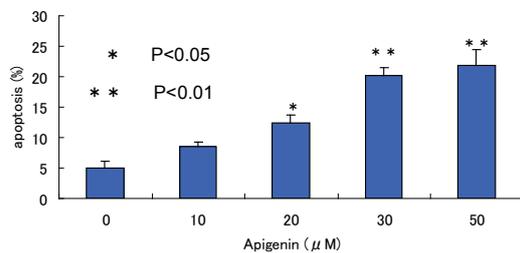
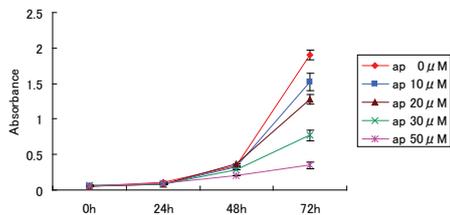


The CM of MH-S,MLE-12 enhanced VEGF, Flt-1, Fibronectin and MMP-2 expression

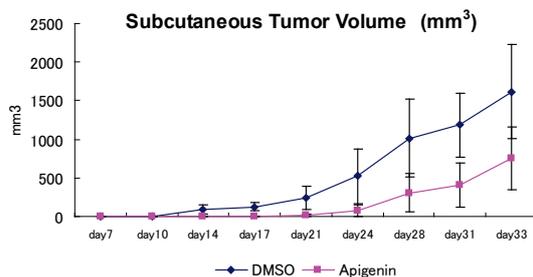


(Samples harvested after 24hrs treatment)

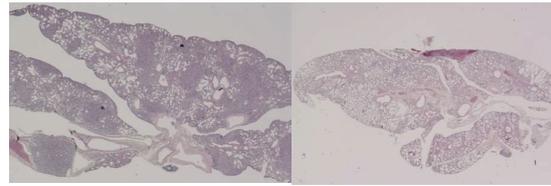
[4] HIF-1 阻害剤アピジェニンの LM8 マウス骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果
アピジェニンは、その用量依存性に LM8 細胞の増殖抑制、アポトーシスを誘導を示した。20 μ M 以上で有意にアポトーシスを誘導を認めた。



マウス皮下移植モデルでは有意差はないが、アピジェニン投与群の方が腫瘍の増大が緩徐である傾向を認めた。また、組織学的には、局所腫瘍では群間に大きな差異を認めなかったが、肺組織ではアピジェニン投与群において、著明に肺転移が抑制される傾向を認めた。アピジェニンは、骨肉腫細胞株 LM8 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。in vivo の実験においても、局所腫瘍の増大を抑制し、肺転移を抑制する傾向を示した。
他の癌腫と同様に、アピジェニンは骨肉腫に対しても抗腫瘍効果を期待できると考えられた。



肺転移



DMSO投与群 アピジェニン投与群

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 17 件)

1. Hamada K, Tomita Y, Inoue A, Fujimoto T, Hashimoto N, Myoui A, Yoshikawa H, Hatazawa J. Evaluation of chemotherapy response in osteosarcoma with FDG-PET. Ann Nucl Med. 2009 Jan;23(1):89-95. 査読有
2. Tamura D, Hiraga T, Myoui A, Yoshikawa H, Yoneda T. Cadherin-11-mediated stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. Int J Oncol. 2008 Jul;33(1):17-24. 査読有
3. Kishida Y, Yoshikawa H, Myoui A. Parthenolide, a natural inhibitor of nuclear factor-kappaB, inhibits lung colonization of murine osteosarcoma cells. Clin Cancer Res. 2007 Jan 1;13(1):59-67. 査読有
4. Sotobori T, Ueda T, Myoui A, Yoshioka K, Nakasaki M, Yoshikawa H, Itoh K. Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. Exp Cell Res. 2006 Nov 15;312(19):3927-38. 査読有
5. Morita S, Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, Maruno M, Izumoto S, Osaki T, Taguchi T, Ueda T, Myoui A, Nishida S, Shirakata T,

Ohno S, Oji Y, Aozasa K, Hatazawa J, Udaka K, Yoshikawa H, Yoshimine T, Noguchi S, Kawase I, Nakatsuka S, Sugiyama H, Sakamoto J. A phase I/II trial of a WT1 (Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: safety assessment based on the phase I data. Jpn J Clin Oncol. 2006 Apr;36(4):231-6. 査読有

6. Sotobori T, Ueda T, Oji Y, Naka N, Araki N, Myoui A, Sugiyama H, Yoshikawa H. Prognostic significance of Wilms tumor gene (WT1) mRNA expression in soft tissue sarcoma. Cancer. 2006 May 15;106(10):2233-40. 査読有
7. 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. 2006 May 1;312(8):1240-53. 査読有
8. Hiraga T, Myoui A, Choi ME, Yoshikawa H, and Yoneda T. Stimulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Bone-Derived Transforming Growth Factor-B Enhances Bone Metastases in Breast Cancer. Cancer Res 2006; 66 (4):2067-2073. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

1. Fujimoto T, Tomita T, Myoui A, Kakunaga S, Kishida Y, Ueda T, Yoshikawa H. NF-kappa B decoy inhalation as a treatment for osteosarcoma metastasis to lung. 12th Annual Meeting of the Connective Tissue Oncology Society. Venice, Italy, Nov, 2006.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称:腫瘍転移抑制剤
発明者:名井 陽他 2 名
出願人:名井 陽他 1 名
特許第 3815736 号
平成 18 年 6 月 16 日
国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

名井 陽 (MYOUI AKIRA)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号:10263261

(2)研究分担者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)

大阪大学大学院・医学系研究科・教授

研究者番号:60191558

上田 孝文 (UEDA TAKAFUMI)

国立病院機構大阪医療センター・部長

研究者番号:00324773

富田 哲也 (TOMITA TETSUYA)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号:30283766

橋本 伸之 (HASHIMOTO NOBUYUKI)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号:50324752

玉井 宣行 (TAMAI NORIYUKI)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号:60464244

(3)研究協力者

米田俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)

大阪大学大学院・歯学研究科・教授

西村理行 (NISHIMURA RIKO)

大阪大学大学院・歯学研究科・准教授

平賀 徹 (HIRAGA TORU)

大阪大学大学院・歯学研究科・助教

伊藤和幸 (ITOH KAZUYUKI)

大阪府立成人病センター研究所・部長

荒木信人 (ARAKI NOBUHITO)

大阪府立成人病センター・部長

富田裕彦 (TOMITA YASUHIKO)

大阪府立成人病センター・部長

岸田友紀 (KISHIDA YUKI)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

田村太資、中 紀文、外堀 司、中崎学人、竹

中 聡、吉岡潔子、岡本美奈、藤本哲穂、野村

幸嗣、濱田健一郎、南野勝彦、杉安 謙仁朗、

友永真人