

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390407

研究課題名（和文） インビボ光イメージングを用いた癌骨転移の血管新生におけるTGF $\beta$ シグナルの解析研究課題名（英文） Study of TGF $\beta$  signaling during angiogenesis in bone metastasis sites by using *in vivo* optical imaging

研究代表者

今村 健志（IMAMURA TAKESHI）

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70264421

研究成果の概要（和文）：

生きているマウスの中で、乳癌骨転移巣における血管新生とTGF- $\beta$ /BMPシグナル伝達を同時に可視化し、それを定量する新しいテクノロジーを開発し、乳癌骨転移巣の血管新生におけるTGF- $\beta$ /BMPシグナルの係わりを明らかにした。さらに骨血管新生阻害剤やTGF- $\beta$ /BMPシグナル阻害剤の乳癌骨転移における効果をインビボで解析し、その分子メカニズムを明らかにし、新たな癌骨転移治療法開発のための基礎的知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the roles of TGF- $\beta$ /BMP signaling during angiogenesis in bone metastasis sites of breast cancer, we developed advanced *in vivo* optical imaging systems by which we can visualize tumor angiogenesis and TGF- $\beta$ /BMP at the same time. In addition, we studied the effects of angiogenesis inhibitors and TGF- $\beta$ /BMP signaling blockers during bone metastasis of breast cancer *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：バイオテクノロジー、シグナル伝達、酵素、生体分子、細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌の診断・治療法が急速に進歩し、患者が原発癌によって死亡することは少なくなり、これまであまり問題にならなかった他臓器転移に対する治療が注目されつつある。特に乳癌や前立腺癌など最近日本でも急速に患者数が増えている癌においては、癌が骨に高頻度で転移し、それは激しい痛みや運動障害を引き起こすことから患者の生活の質

(Quality of life; QOL) を著しく低下させる。最近ではビスフォスフォネート製剤などの台頭による積極的な骨転移治療傾向の兆しは見えるが、整形外科領域においては未だ骨転移に対する本質的治療はほとんどおこなわれておらず、諸問題解決の努力が十分になされていないのが現状である。よって、整形外科領域にとって骨転移の防止と治療が急務になっている。骨転移を研究する上で重要なポ

イントの一つは、癌と周辺環境（骨髄微小環境）の関係を明らかにすることである。しかし、骨においては骨形成や骨吸収に係る骨芽細胞や破骨細胞から血管内非細胞や血球細胞に至るまで様々な細胞が存在するため、今までの培養細胞の生化学的な解析だけでは複雑な骨髄微小環境の作用を明らかにすることは難しいと考えられていた。

最近注目されているインビボイメージング技術は、生体内で起こる様々な生命現象を非侵襲的に外部から細胞または分子レベルで捉えて画像化して解析する手法であり、生命現象を統合的に理解するために必須のテクノロジーである。すでに医療の現場においては、分子レベルのイメージングが可能なMRIやPET、CT、超音波診断法などの画像診断技術が飛躍的に発展し、整形外科領域においても脊髄疾患、関節疾患や癌を始めとした様々な疾患の診断・治療に大きく寄与し、医療の体系が急激に変化しつつある（Genes Dev., 17: 545-580, 2003）。

一方、細胞生物学、癌や脳科学などの基礎研究においても、臨床の場で活躍するMRIやPET、CTなどの画像診断機器を小型化して実験動物に応用し、動物が生きたままがん細胞の動態や脳細胞の機能の観察を研究室でおこなうことが可能となった。しかし、これらの機器は研究室レベルで用いるにはまだまだ大型で高価である。さらに、PETは放射性同位体プローブ作製のサイクロトロンが必要なため使用するために使える施設が限定され、また、MRIは感度が低いなどの欠点があり、実際の研究現場では、生きたまま細胞あるいは個体内の特定の分子のリアルタイムな観察をおこなうことはまだほど遠いのが現状である。

発光や蛍光を用いたインビボ光イメージング技術は、まだ臨床の場での利用は少ないが、その迅速性、簡便性や汎用性からポストゲノム時代の新しい研究ツールとして注目されている。特にインビボ蛍光イメージングについては、近年、新しい蛍光蛋白質の発見や近赤外蛍光プローブ作製技術の進歩、さらにレーザーや蛍光顕微鏡などの機器の性能の向上により、様々な生命現象を可視化できるようになり、その有用性が期待されている。

## 2. 研究の目的

癌骨転移の骨髄微小環境の血管新生におけるTGF- $\beta$ /BMPシグナルの役割を明らかにすることを目的に、蛍光トランスジェニックマウスと近赤外蛍光血管イメージング法を組み合わせた新たなインビボイメージング法を開

発し、血管新生阻害剤やTGF- $\beta$ /BMPシグナル阻害剤の乳癌骨転移の血管新生における効果をインビボで解析し、そのメカニズムを明らかにし、新たな癌骨転移治療法開発のための基礎的知見を得る。

## 3. 研究の方法

生きているマウスの中で、乳癌骨転移巣における血管新生とTGF- $\beta$ /BMPシグナルを可視化し、それを定量する新しいテクノロジーを開発し、乳癌骨転移巣における血管新生とTGF- $\beta$ /BMPシグナルの係わりを明らかにする目的で、乳癌骨転移モデルにおいて、血管新生とTGF- $\beta$ /BMPシグナルを同時に可視化する。さらにZスタック撮影によって三次元画像を得るとともに、イメージング画像を定量化することを試みる。さらに開発した方法を用いて、血管新生阻害剤やTGF- $\beta$ /BMPシグナル阻害剤の乳癌骨転移における効果をインビボで解析し、その分子メカニズムを明らかにし、新たな癌骨転移治療法開発のための基礎的知見を得る。

## 4. 研究成果

平成20年度にはまず、乳癌骨転移巣における新生血管の可視化とその定量化を試みた。具体的には、近赤外蛍光イメージングの特性を活かして、骨転移モデルの新生血管を可視化した。申請者が樹立したヒト乳癌細胞株MDA-MB-231細胞の亜株で骨に高率に転移するMDA-231-D細胞を用いて、骨転移巣の血管新生を可視化することができた。撮影条件を検討することで鮮明な画像を得るとともに、さらにZスタック撮影によって三次元画像を得、イメージング画像を定量化することに成功した。次に、TGF- $\beta$ /BMPシグナルを蛍光で可視化するトランスジェニックマウスの作製に取り組んだ。インビボでTGF- $\beta$ またはBMPのシグナルを可視化するトランスジェニックマウスを作製するために、TGF- $\beta$ 応答性プロモーターである9xCAGA配列の後方に赤色蛍光蛋白（red fluorescent protein: RFP）を繋いだプロモーターレポーター遺伝子のベクターとBMP応答性プロモーターであるBRE配列の後方にRFPを繋いだプロモーターレポーター遺伝子のベクターを作製した。さらに、ベクターを培養細胞にトランスフェクションし、TGF- $\beta$ /BMP添加によって細胞が蛍光を発するか否かを*in vitro*で確認した。

平成21年度には、血管用近赤外蛍光プローブAngioSense750（VisEn社）を用いた血管新生の可視化と定量化については、皮下に移

植した GFP 発現ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞において得られた血管のカラー画像を白黒画像に変換して画像定量ソフトイメージ J を用いて新生血管の面積を算出するとともに、同 HT1080 細胞の肺転移を定量化することに成功し、その成果を論文発表した (Hanyu et al., *Cancer sci*, 2009)。また、骨内血管のイメージングに関しては、骨用近赤外蛍光プローブ OsteoSense680 (VisEn 社) と AngioSense750 を組み合わせることで、微小血管をイメージングすることに成功した。

次に、TGF- $\beta$ /BMP シグナルを蛍光で可視化するトランスジェニックマウスの作製に関しては、シグナル応答性プロモーター配列の後方に RFP を繋いだプロモーターレポーター遺伝子は確かにシグナルに応答するが、その蛍光は弱く、インビボで骨の中での観察は難しいことがわかったので、変異型 RFP、Venus や Kaede など他の蛍光蛋白を検討し、ルシフェラーゼを融合させた変異型蛍光蛋白が強い蛍光を発することが判ったので、それを加えて、引き続きトランスジェニックマウスの作製の基礎実験をおこなった。

平成 23 年度は、血管新生については乳がん骨転移における TGF- $\beta$  シグナルの係わりにおいて、TGF- $\beta$  シグナルとエストロゲンシグナルのクロストークについての新しいメカニズムを発見した。具体的には、エストロゲンレセプター-ER $\alpha$  が TGF- $\beta$  の細胞内シグナル伝達因子 Smad に結合し、E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1 をリクルートすることで Smad の分解を促進し、TGF- $\beta$  を抑制することを明らかにした。さらに乳がんにおいて、ER $\alpha$  の発現が低下すると Smad の発現が上昇し、TGF- $\beta$  シグナルがオンになり、細胞の悪性化を促すことがわかった。これは、新たな乳がん骨転移治療法開発のための有用な基礎的知見である。

#### 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 13 件)

1: Mizutani A, Saitoh M, Imamura T, Miyazawa K, Miyazono K: Arkadia complexes with clathrin adaptor AP2 and regulates EGF signaling. *J Biochem*. 148: 733-41, 2010. (査読あり)

2: Ito I, Hanyu A, Wayama M, Goto N, Katsuno Y, Kawasaki S, Nakajima Y, Kajiro M, Komatsu Y, Fujimura A, Hirota R, Murayama A, Kimura K, Imamura T, Yanagisawa J: Estrogen inhibits

transforming growth factor  $\beta$  signaling by promoting Smad2/3 degradation. *J Biol Chem*. 285: 14747-55, 2010. (査読あり)

3: Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita K, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung UI, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S. Runx1 and Runx2 cooperate during sternal morphogenesis. *Development*. 137: 1159-67, 2010. (査読あり)

4: Kashiwagi Y, Horie K, Kanno C, Inomata M, Imamura T, Kato M, Yamamoto T, Yamashita H: TGF- $\beta$  type II Receptor mRNA in Retinoblastoma Cell Lines is induced by Trichostatin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 51: 679-85, 2010. (査読あり)

5: Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Imamura T, Aburatani H, Miyazono K: Promoter-wide analysis of Smad4 binding sites in human epithelial cells. *Cancer Sci*. 100: 2133-42, 2009. (査読あり)

6: Hanyu A, Kojima K, Hatake K, Nomura K, Murayama H, Ishikawa Y, Miyata S, Ushijima M, Matsuura M, Ogata E, Miyazawa K, Imamura T: Functional in vivo optical imaging of tumor angiogenesis, growth, and metastasis prevented by administration of anti-human VEGF antibody in xenograft model of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Cancer Sci*. 100: 2085-92, 2009. (査読あり)

7: Kido S, Kuriwaka-Kido R, Imamura T, Ito Y, Inoue D, Matsumoto T: Mechanical stress induces Interleukin-11 expression to stimulate osteoblast differentiation. *Bone*. 45: 1125-32, 2009. (査読あり)

8: Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M: Role of Ras signaling in the induction of snail by TGF- $\beta$ . *J Biol Chem*. 284: 245-53, 2009. (査読あり)

9: Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Taniguchi H, Miyazawa K, Sunamura M, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H: ChIP-chip analysis of Smad2/3 binding sites reveals 1 roles of ETS1 and TFAP2A in

TGF- $\beta$  signaling. *Mol Cell Biol.* 29: 172-86, 2009. (査読あり)

10: Fukunaga E, Inoue Y, Komiya S, Horiguchi K, Goto K, Saitoh M, Miyazawa K, Koinuma D, Hanyu A, **Imamura T**: Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. *J Biol Chem.* 283: 35660-7, 2008. (査読あり)

11: Tominaga H, Maeda S, Hayashi M, Takeda S, Akira S, Komiya S, Nakamura T, Akiyama H, **Imamura T**: CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$  Promotes Osteoblast Differentiation by Enhancing Runx2 Activity with ATF4. *Mol Biol Cell.* 19: 5373-86, 2008. (査読あり)

12: Inoue Y, **Imamura T**: Regulation of TGF- $\beta$  family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci.* 99: 2107-12, 2008. (査読あり)

13: Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, Ishikawa Y, Akiyama F, Iwase T, Ogata E, Ehata S, Miyazono K, **Imamura T**: Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene.* 27: 6322-33, 2008. (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

1: 今村 健志. 革新的インビボ光イメージングの骨代謝への応用. 第53回秋季日本歯周病学会学術大会. 平成22年9月18日-19日. かわ国際会議場(香川県).

2: 今村 健志. 光技術を駆使した細胞機能イメージングの骨研究への応用. 第28回日本骨代謝学会学術集会シンポジウム10. 平成22年7月21日-23日. 京王プラザホテル(東京都).

3: Takeshi Imamura. 第32回日本分子生物学会年会. Recent progress of in vivo optical imaging of cancer. 平成21年12月12日. 神奈川県横浜市.

4: 今村 健志. 乳がん骨転移における TGF- $\beta$ /BMPシグナルの役割とインビボ光イメージング. 第27回日本骨代謝学会学術集会シンポジウム1. 平成21年7月23日. 大阪府大阪市.

5: 今村 健志. 光イメージングを利用したがん研究新戦略. 第56回日本実験動物学会総会. 平成21年5月16日. 埼玉県大宮市.

6: 今村 健志. 生命のダイナミズム・不均一性・確率性・一個体で細胞を「みて」「知る」へ. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会. 平成20年12月9-12日. 兵庫県神戸市神戸ポートビホテル.

7: 今村 健志. 骨と癌のインビボ光イメージング. 第26回日本骨代謝学会学術集会. 平成20年10月29-31日. 大阪府大阪市大阪国際会議場.

8: Takeshi Imamura. In vivo optical imaging of cancer and microenvironment. 第2回JCA-AACR合同カンファレンス・乳がん研究の最前線. 平成20年7月14-16日. 兵庫県淡路市淡路夢舞台国際会議場.

9: Takeshi Imamura. In vivo optical imaging of tumor microenvironment and TGF- $\beta$  signaling. 第28回札幌がんセミナー国際シンポジウム. 平成20年6月27-28日. 北海道札幌市北海道大学学術交流会館講堂.

10: 今村 健志. がんの血管新生と細胞周期のインビボ光イメージング. 第3回日本分子イメージング学会総会. 学術集会. 平成20年5月22日. 埼玉県大宮市0大宮ソニックシティ.

11: 今村 健志. 癌の増殖転移における血管新生と骨破壊のインビボイメージング. 第62回NPO法人日本口腔科学会学術集会. 平成20年4月17日. 福岡県福岡市福岡国際会議場.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/medical/course/ProgramForMedicalSciences/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 健志 (IMAMURA TAKESHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70264421