

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591751

研究課題名（和文）

乳癌骨転移に対する新規保存的治療法についての基礎研究—ヒアルロン酸制御による—

研究課題名（英文）

Novel therapeutic modality for metastatic bone disease of breast cancer via hyaluronan inhibition

研究代表者

西田 佳弘 (NISHIDA YOSHIHIRO)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50332698

研究成果の概要（和文）：乳癌細胞・肺癌細胞を使用した *in vitro* およびマウス乳癌骨転移モデルを作成した *in vivo* 実験において、ヒアルロン酸産生を抑制する 4-MU (4-methylumbelliferone) および内因性ヒアルロン酸の蓄積を抑制するヒアルロン酸オリゴ糖は、有意な抗腫瘍効果と骨転移抑制効果を示した。4-MU についてはすでに他疾患で安全に臨床応用されており、骨転移に関する *in vivo* の実験でも特に副作用が認められなかったことから、臨床応用可能な治療方法として期待される。

研究成果の概要（英文）：4-MU (4-methylumbelliferone), an inhibitor for hyaluronan synthesis, and hyaluronan oligosaccharides, which has shown to suppress endogenous hyaluronan, effectively showed anti-tumor effect on breast and lung cancer. Moreover, these reagents significantly suppressed metastatic bone lesion of breast and lung cancer without serious complications. Together, 4-MU and hyaluronan oligosaccharides might be a promising novel therapeutic tools for metastatic bone disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：糖鎖、乳癌、骨転移、ヒアルロン酸、保存的治療

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の増殖・浸潤・転移において、ヒ

アルロン酸の果たす役割が国内外から報告されており、ヒアルロン酸をターゲットとし

た治療の可能性を示唆している。また癌の骨転移巣形成においてもヒアルロン酸の関与が示唆されている。しかし、骨転移巣でのヒアルロン酸抑制による治療研究は報告されていなかった。

応募者は、悪性骨腫瘍においてヒアルロン酸合成をアンタイセンスで抑制することによる抗腫瘍効果 (Nishida Y et al, Exp Cell Res 2005)、ヒアルロン酸オリゴ糖によって内因性ヒアルロン酸を抑制することによる抗腫瘍効果 (Hosono K, Nishida Y-corresponding author et al, Am J Pathol 2007) はヒアルロン酸を中心とする細胞外マトリックスの抑制を介することを解明・報告した。これらは原発性悪性骨腫瘍に関する研究であり、患者数、社会的ニーズを考えると、続発性悪性骨腫瘍である癌の骨転移に対する治療法を研究することがより社会の医療への要望に応えるものと考えられた。

上記のように、原発性悪性骨腫瘍に対するヒアルロン酸の抗腫瘍効果が解明され、一方癌の骨転移巣形成においてヒアルロン酸が必要であるとの報告により、癌の骨転移巣においてヒアルロン酸を制御すれば保存的治療法を確立できる可能性が高いと考え、本研究を進めた。

2. 研究の目的

骨転移を生ずる癌の中で臨床症例数が多く、また再現性をもって癌の骨転移動物モデルが確立されているのは乳癌である。本研究はまず乳癌に焦点を当て、ヒアルロン酸を制御することで骨転移巣をコントロールできることを示し、最終的に手術治療の回避を目的とする。また臨床上、癌の骨転移により QOL 低下が問題となる肺癌に関しては、新たに骨転移動物モデルを確立し、実験を進める。

(1) in vitro 培養乳癌・肺癌細胞におけるヒアルロン酸関連分子の発現

ヒアルロン酸合成酵素各アイソフォーム (HAS-1, HAS-2, HAS-3)、ヒアルロン酸の細胞膜上受容体(CD44)の発現解析

(2) in vitro 培養乳癌・肺癌細胞に対するヒアルロン酸抑制方法 (以下の方法) の安定化

ヒアルロン酸オリゴ糖投与、ヒアルロン酸合成酵素の阻害剤である 4-methylumbelliferone(4-MU)

(Yoshihara et al, FEBS Lett 2005) の投与

(3) in vitro 培養乳癌・肺癌細胞におけるヒアルロン酸制御を介した抗腫瘍効果の評価

常法に従い、細胞増殖、浸潤、転移能の解析

(4) 乳癌・肺癌骨転移動物モデルにおけるヒアルロン酸抑制を介した治療効果

安定した骨転移モデルを作成し、軟 X 線による画像評価、採取した組織による組織学的評価、ヒアルロン酸の豊富な組織に対する副作用の評価を行う

また従来より骨転移に使用されているゾロドロン酸との効果を比較検討する

3. 研究の方法

(1) Preliminary

乳癌細胞株 (MDA-MB-231)、肺癌細胞株

(Lewis) におけるヒアルロン酸合成酵素 (HAS-1, -2, -3) の中でどのアイソフォームを発現しているかを確認する。またヒアルロン酸の細胞膜上受容体 (CD44) の発現解析。

(2) 薬物投与による抗腫瘍効果解析

in vitro: 単層培養した乳癌細胞株

(MDA-MB-231) に対してヒアルロン酸オリゴ糖 (低分子量)、あるいはヒアルロン酸合成酵素阻害剤である

4-methylumbelliferone(4-MU) を投与して抗腫瘍効果を MTT assay (増殖度)、soft agar assay (足場非依存性増殖)、matrigel invasion assay (浸潤能)、TUNEL 染色

(apoptosis) にて解析する。ヒアルロン酸の合成・蓄積に対する効果はそれぞれ HAS に対する quantitative RT-PCR、ビオチン化ヒアルロン酸結合タンパクを用いたヒアルロン酸染色 (immunocytochemistry) にて検討する。

in vivo: マウスの脛骨近位に乳癌細胞

MDA-MB-231 あるいは肺癌細胞 Lewis を局所注射することで骨転移モデルを作製する。注射後 2-4 週間で骨転移巣が形成されたことを軟 X 線にて確認し、ヒアルロン酸オリゴ糖溶液を局所投与する。またヒアルロン酸合成を阻害する 4-methylumbelliferone (4-MU) を腹腔内投与 (全身投与) する。評価は i : 軟 X

線レントゲンにて骨融解度を、ii：局所を切除し、組織学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 乳癌細胞株 (MDA-MB-231) におけるヒアルロン酸合成酵素 (HAS-1, -2, -3) は HAS-2, HAS-3 が高く発現しており、ヒアルロン酸の細胞膜上受容体 CD44 の発現も確認できた。また骨肉腫細胞では細胞周囲マトリックス形成が旺盛な実験系を使用したことから、この乳癌細胞株での細胞周囲マトリックス形成を検討したところ、ほとんど形成していなかった。骨肉腫ではヒアルロン酸制御が細胞外マトリックス形成阻害を介して抗腫瘍効果を現すが、乳癌細胞ではこれとは異なったメカニズムによって抗腫瘍効果を発現すると予想された。同様の結果が肺癌細胞株 (Lewis) でも得られた。

(2) 薬物投与による抗腫瘍効果解析

in vitro: 単層培養した乳癌細胞、肺癌細胞両者に対して 4-MU あるいはヒアルロン酸オリゴ糖は、MTT assay (増殖度)、motility assay (細胞の進展)、matrigel invasion assay (浸潤能) について抗腫瘍効果を示した。ヒアルロン酸の合成・蓄積に対する効果はそれぞれ HAS に対する quantitative RT-PCR にて解析し、乳癌細胞株においては HAS-2 が抑制された、ビオチン化ヒアルロン酸結合タンパクを用いたヒアルロン酸染色 (immunocytochemistry) では 4-MU、ヒアルロン酸オリゴ糖により効果的に内因性ヒアルロン酸が抑制された。

(3) 4-MU 投与による間質細胞への影響

マウス線維芽細胞である NIH3T3 を使用して 4-MU の効果を解析した。4-MU は乳癌、肺癌細胞だけではなく、線維芽細胞に対してもその細胞運動性などの活性を抑制した。

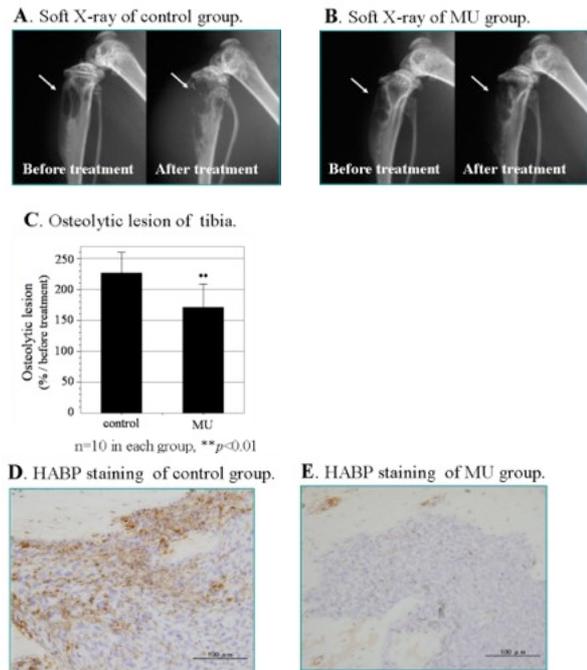
(4) ゼレドロン酸と 4-MU の抗腫瘍効果 (肺癌細胞に対する)

ゼレドロン酸単独、4-MU 単独ともに抗腫瘍効果を示した。併用により、相加効果が認められた。

(5) *in vitro*: 肺癌の脛骨骨転移モデルを確立した。

乳癌、肺癌骨転移マウスモデルに対するヒアルロン酸オリゴ糖による骨転移抑制効果、

4-MU による骨転移抑制効果 (図 A、B、C)、ゼレドロン酸と 4-MU による併用効果が証明された。同時にいずれの治療も内因性のヒアルロン酸蓄積を阻害していた (図 D、E)。また 4-MU 使用による明らかな副作用は認められなかった。を移植し、骨融解性の骨転移モデルを作製。技術的に安定したモデル作製可能となった。



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 17 件)

① Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-Methylumbelliferone suppresses tumorigenicity *in vitro* and metastatic lesions of bone *in vivo*.

Urakawa H, Nishida Y, Wasa J, Arai E, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N. Int J Cancer. 2011, in press. 査読有

② Clinical outcome of sacral chordoma with carbon ion radiotherapy compared with surgery.

Nishida Y, Kamada T, Imai R, Tsukushi S, Yamada Y, Sugiura H, Shido Y, Wasa J, Ishiguro N.

Int J Radiat Oncol Biol Phys.
2011 Jan 1;79(1):110-6. 査読有

〔学会発表〕（計7件）

① Futamura N

Additive suppressive effects of hyaluronan synthesis inhibitor to zelendronate on bone metastasis of lung cancer.

Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society、2011.1.16

Long Beach Convention Center（米国）

② Nishida Y（招待講演）

Hyaluronan plays significant roles not only in maintenance of musculoskeletal systems but also in tumorigenicity of musculoskeletal malignant tumors.

8th International Conference on Hyaluronan
2010.6.9 京都ブライトンホテル（京都府）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：がん骨転移治療薬

発明者：西田佳弘、浦川浩、新井英介、二村尚久、石黒直樹

権利者：名古屋大学

種類：特願

番号：2010-001065

取得年月日：平成22年1月6日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 佳弘（NISHIDA YOSHIHIRO）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50332698

(2) 研究分担者

筑紫 聡（TSUKUSHI SATOSHI）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90378109

和佐 潤志（WASA JUNJI）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80547539

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：