

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390505

研究課題名（和文） 骨髄癌幹細胞を核とする癌骨転移の成立・進展メカニズムの解析

研究課題名（英文） Roles of cancer stem cells in the development and progression of cancer metastasis to bone

研究代表者

平賀 徹（HIRAGA TORU）

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70322170

研究成果の概要（和文）：

骨は癌転移の好発臓器の一つである。しかし、そのメカニズムの詳細は不明である。近年、癌細胞にも幹細胞様の性格を示す癌幹細胞の存在が提唱され、癌の発生、維持、再発等に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。本研究では、癌幹細胞の骨転移に対する関与について検討した。株化癌細胞を用いた検討で、癌幹細胞マーカーを発現する細胞の存在することが明らかにされた。また、それらの細胞は癌幹細胞様の形質を有していた。一方、癌幹細胞マーカーの一つである side population (SP) 細胞の骨転移形成能は non-SP 細胞と同等であり、骨転移に対する特異的な関与を見出すには至らなかった。今後は、他の細胞、および他の癌幹細胞マーカーを用いた更なる詳細な検討が必要と思われる。

研究成果の概要（英文）：

Bone is one of the most preferential sites for cancer metastasis; however, the precise mechanisms are still unclear. An increasing body of evidence suggests that cancers contain a small subset of their own stem-like cells called cancer stem cells (CSCs), which play critical roles in the initiation, maintenance and relapse of tumors. In this study, we studied the role of CSCs in cancer metastasis to bone. Flow cytometric analysis revealed the existence of CSC marker-positive cells in several kinds of cancer cell lines. Those cells exhibited some of the CSC-like properties in vitro and in vivo. However, the bone-metastatic potential of side population (SP) cells, which has been shown to enrich CSCs in several types of cancer, was similar to that of non-SP cells. Further studies are required to clarify the contribution of CSCs to cancer bone metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：癌、癌幹細胞、骨転移

1. 研究開始当初の背景

癌患者を死に至らしめる最大の原因である転移のメカニズムの解明は、癌研究において最も重要な課題である。骨は肺、肝とならんで癌が最も転移しやすい臓器の一つである。近年、癌治療の進歩により、癌患者の生存率は大幅に向上した。しかし、その中で、進行が緩やかなためにこれまでほとんど問題視されなかった骨転移が大きな問題となってきた。癌の骨転移は、激しい骨疼痛、神経麻痺などの合併症を引き起こし、患者の QOL を著しく低下させるだけではなく、生命予後にも重大な影響を与える。にもかかわらず、現在のところ骨転移に対する効果的な治療法は確立されていない。

近年、再生医療を目指した幹細胞研究の進歩とあいまって、癌細胞にも幹細胞様の性格を示す癌幹細胞の存在が提唱され、注目を集めている。癌幹細胞は、高い自己複製能と腫瘍形成能を有することや、抗癌剤や放射線治療に対して耐性であることなど癌の悪性度に直結する生物学的特徴が示され、癌治療の重要な標的として認識され始めた。

乳癌患者では、臨床的に遠隔転移を認めない病期においても、30~40%に上る高い割合で骨髄中の微小転移が認められることが報告されている (Nat Clin Pract Oncol 4: 30, 2007; Cancer 107: 885, 2006; N Engl J Med 353: 793, 2005)。この骨髄微小転移の存在は、癌の再発、転移、さらには生命予後と関連することが示されている。また、最近、これら微小転移癌細胞が癌幹細胞様の性質を示すことが報告され (Clin Cancer Res 12: 5615, 2006)、骨髄中の癌幹細胞の存在が示唆される。しかし、骨髄微小転移と骨転移成立との関係、および骨転移成立・進展における癌幹細胞の関与については未だ検討されていない。

また、興味深い所見として、骨の微小環境が造血幹細胞を支持するニッチを提供することが明らかにされている。なかでも、Zhangらは、骨芽細胞が造血幹細胞ニッチの主たる構成細胞であることを示している (Nature 425: 836, 2003)。我々は、動物実験において、骨転移癌細胞が骨芽細胞や骨芽細胞の前駆細胞である骨髄間質細胞との細胞接着装置を介した直接接触を微細形態学的に明らかにしている (Bone 16: 349, 1995)。これらの所見から、骨髄内における癌幹細胞ニッチの存在が推測される。

以上の所見を考え合わせると、骨髄中のニッチにより制御された癌幹細胞が、骨転移の成立・進展の過程において重要な役割を果たしている可能性が推測される。また、このことから骨髄癌幹細胞を標的とした治療が骨転移の効果的な治療法になり得ることが期待される。

2. 研究の目的

本研究においては、骨転移のメカニズム解明および新規治療法の開発を目的として、“骨

髄に定着した癌幹細胞が骨転移の成立・進展をコントロールする”との作業仮説に基づき、骨転移における骨髄癌幹細胞の役割を明らかにするために、以下の検討を行った。

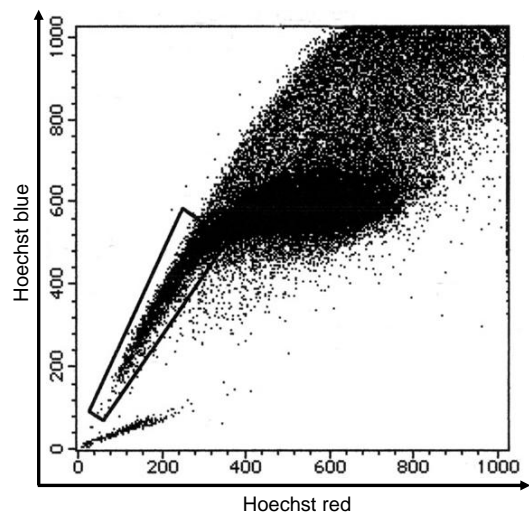
- (1) 癌細胞株における癌幹細胞の同定・単離
- (2) 癌幹細胞の生物学的機能解析
- (3) 癌幹細胞の遺伝子発現解析
- (4) 癌幹細胞の腫瘍形成能と骨転移能

3. 研究の方法

- (1) 癌細胞株における癌幹細胞の同定を side population (SP) 細胞、CD44⁺/CD24⁻をはじめとする細胞表面マーカー、および aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1) 活性を指標に、フローサイトメトリーにより行った。また、同定された癌幹細胞の単離を fluorescent-activated cell sorter (FACS) を用い行った。
- (2) 癌幹細胞の生物学的機能について、1) で単離した細胞を用い、単層培養での増殖能 (WST-1 assay)、Sphere 形成能 (浮遊培養系)、遊走能 (wound healing assay)、浸潤能 (matrigel invasion assay)、および自己複製能を指標に評価した。
- (3) 癌幹細胞の遺伝子発現について、cDNA マイクロアレイ法を用いて、網羅的解析を行った。
- (4) 癌幹細胞の in vivo での腫瘍形成能について、ヌードマウス移植モデルを用い検討した。また、骨転移形成能については、ヌードマウス骨転移モデルを用い評価した。

4. 研究成果

- (1) 癌細胞株における癌幹細胞の同定・単離
株化癌細胞における癌幹細胞の存在を SP、CD44⁺/CD24⁻、および ALDH1 活性を指標として検討した結果、調査した全ての細胞株において、癌幹細胞マーカーを発現する細胞の存在が確認された (下図)。しかしながら、その割合は細胞株により大きく異なっていた。また、同一細胞



MDA-MB-231細胞のSP(枠内)の同定

であっても、癌幹細胞の割合はマーカー間で異なっており、より正確な癌幹細胞マーカーの確立が必要と思われた。同定された癌幹細胞画分に含まれる細胞は FACS による単離を行い、以下の検討に使用した。

(2) 癌幹細胞の生物学的機能解析

癌幹細胞の生物学的機能について、主としてヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞から単離した SP 細胞を用いて、non-SP (NSP) 細胞と比較、解析を行った。SP 細胞の単層培養での増殖は NSP 細胞と差を認めなかった。一方、浮遊培養系における sphere 形成は SP 細胞で有意に促進されていた。次に、SP 細胞の自己複製能について、単離した SP 細胞を 2 週間培養の後、再解析を行った。その結果、SP 細胞と NSP 細胞の両方が存在していることが明らかとなり、SP 細胞の自己複製能および分化能が示唆された。

(3) 癌幹細胞の遺伝子発現解析

MDA-MB-231 SP 細胞の遺伝子発現を、マイクロアレイ法にて網羅的に NSP 細胞との比較解析を行った(結果の詳細は発表論文⑧参照)。一例として、SP 細胞では、ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (ABCG2)の発現上昇が認められた。これを支持する結果として、MDA-MB-231 細胞を ABCG2 の阻害剤である fumitremorgin C で処理した場合、SP 細胞の著明な減少が認められた。また、ABCG2 は細胞の薬剤排泄に関与するトランスポーターをコードする遺伝子であることから、MDA-MB-231 細胞を抗癌剤の一つである doxorubicin にて処理した結果、ABCG2 遺伝子の発現上昇と、SP 細胞の増加が認められた。

(4) 癌幹細胞の腫瘍形成能と骨転移能

MDA-MB-231 SP 細胞の腫瘍形成能をヌードマウス乳腺内移植モデルを用い検討した結果、NSP 細胞と有意な差は認められなかった。しかし、腫瘍増殖は SP 細胞で亢進していた。次に、同細胞の骨転移能をヌードマウス左心室内移植モデルを用い検討した結果、こちらも NSP 細胞と比較して有意な差は認められなかった。また、骨転移巣における SP 細胞の割合を、フローサイトメトリーにて検討したところ、培養細胞および乳腺内腫瘍との間に差を認めなかった。

以上の結果から、SP 細胞は一部の癌幹細胞様形質を示すものの、骨転移形成能に関しては NSP 細胞と差がないことが示された。今後は、他の細胞、および他の癌幹細胞マーカーを用いた更なる詳細な検討が必要と思われる。

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 59 件)

- ① Hosoya A, Yukita A, Ninomiya T, Hiraga T, Yoshihara K, Yoshihara N, Kasahara E, Nakamura H. Localization of SUMOylation

factors and Osterix in odontoblast lineage cells during dentin formation and regeneration. *Histochem Cell Biol* (in press) 査読有

DOI: 10.1007/s00418-013-1076-y

- ② Ninomiya T, Hiraga T, Hosoya A, Ohnuma K, Ito Y, Takahashi M, Ito S, Asashima M, Nakamura H. Enhanced bone-forming activity of side population cells in the periodontal ligament. *Cell Transplant* (in press) 査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.3727/096368913X663587>

- ③ Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T. Role of heparan sulfate proteoglycans surrounding osteoblast lineage cells. *J Oral Biosci* 54(1): 43-47, 2012 査読有

DOI: 10.1016/j.job.2012.01.005

- ④ Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshihara K, Yoshihara N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H. Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol* 137(6): 733-42, 2012 査読有

DOI: 10.1007/s00418-012-0928-1

- ⑤ Chen YC, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Miyazawa H, Nakamura H. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts. *Arch Oral Biol* 57(5): 453-9, 2012 査読有

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.005

- ⑥ Hiraga T, Myoui A, Hashimoto N, Sasaki A, Hata K, Morita Y, Yoshikawa H, Rosen CJ, Mundy GR, Yoneda T. Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases. *Cancer Res* 72(16): 4238-49, 2012 査読有

DOI: 10.1158/0008-5472

- ⑦ Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* 18(3): 405-12, 2012 査読有

DOI: 10.1038/nm.2653

- ⑧ Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential. *Oncol Rep* 25(1): 289-96, 2011 査読有

- DOI: 10.3892/or_00001073
- ⑨ Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Koide M, Yamaguchi K, Oida H, Arai Y, Sahara N, Nakamura H, Ozawa H. Prostaglandin E(2) receptor EP(4)-selective agonist (ONO-4819) increases bone formation by modulating mesenchymal cell differentiation. *Eur J Pharmacol* 650(1): 396-402, 2011 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.10.021
- ⑩ Yoneda T, Hata K, Nakanishi M, Nagae M, Nagayama T, Wakabayashi H, Nishisho T, Sakurai T, Hiraga T. Involvement of acidic microenvironment in the pathophysiology of cancer-associated bone pain. *Bone* 48(1): 100-5, 2011 査読有
DOI: 10.1016/j.bone.2010.07.009
- ⑪ Yoneda T, Hata K, Nakanishi M, Nagae M, Nagayama T, Wakabayashi H, Nishisho T, Sakurai T, Hiraga T. Molecular events of acid-induced bone pain. *IBMS BoneKey* 8(4): 195-204, 2011 査読有
DOI: 10.1138/20110507
- ⑫ Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H. Administration of the bisphosphonate zoledronic acid during tooth development inhibits tooth eruption and formation and induces dental abnormalities in rats. *Calcif Tissue Int* 86(6): 502-10, 2010 査読有
DOI: 10.1007/s00223-010-9366-z
- ⑬ Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Ozawa H. Localization of Thy-1-positive cells in the perichondrium during endochondral ossification. *J Histochem Cytochem* 58(5): 455-62, 2010 査読有
DOI: 10.1369/jhc.2010.955393
- ⑭ Hosoya A, Ninomiya T, Hiraga T, Yoshida K, Yoshida N, Kasahara E, Ozawa H, Nakamura H. Potential of periodontal ligament cells to regenerate alveolar bone. *J Oral Biosci* 52(2): 72-80, 2010 査読有
DOI:
<http://dx.doi.org/10.2330/joralbiosci.52.72>
- ⑮ Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, Yatani H, Yoneda T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab* 28(2): 165-75, 2010 査読有
DOI: 10.1007/s00774-009-0128-9
- ⑯ Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, Hiraga T, Ebisu S, Yoneda T. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. *Mol Biol Cell* 21(15): 2568-77, 2010 査読有
DOI: 10.1091/mbc.E10-01-0049
- ⑰ Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Takahashi M, Nakamura H. Formation of bone-like mineralized matrix by periodontal ligament cells in vivo: a morphological study in rats. *J Bone Miner Metab* 27(2): 149-57, 2009 査読有
DOI: 10.1007/s00774-009-0039-9
- ⑱ Hiraga T, Nakamura H. Imatinib mesylate suppresses bone metastases of breast cancer by inhibiting osteoclasts through the blockade of c-Fms signals. *Int J Cancer*. 124(1): 215-22, 2009 査読有
DOI: 10.1002/ijc.23903
- ⑲ Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol* 184(4): 541-54, 2009 査読有
DOI: 10.1083/jcb.200806139
- ⑳ Jimi E, Takami M, Hiraga T, Nakamura I, Urade M, Miyamoto Y. The light and dark side of bisphosphonates. *J Oral Biosci* 51(4): 177-187, 2009 査読有
DOI:
<http://dx.doi.org/10.2330/joralbiosci.51.177>

〔学会発表〕 (計 87 件)

- ① 平賀 徹、二宮 禎、細矢明宏、中村浩彰
歯胚形成期のビスフォスフォネート投与は歯の形成・萌出を生害し、歯牙腫様病変を誘発する 第 27 回 日本骨代謝学会、2009 年 7 月 24 日、大阪国際会議場(大阪府)
- ② Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H. Treatment with bisphosphonate during tooth development inhibits tooth formation and eruption, and induces odontomas. 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2009 年 9 月 12 日、Denver, Colorado, USA
- ③ 平賀 徹、中村浩彰 乳癌 side population 細胞は高い骨転移能を有するか? 第 28 回 日本骨代謝学会、平成 22 年 7 月 21 日、京王プラザホテル(東京都)

- ④ Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Side population in human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties but does not have higher bone-metastatic potential. 32th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research、平成 22 年 10 月 17 日、Toronto, Canada
- ⑤ 平賀 徹 乳癌 side population 細胞の骨転移能 第 69 回 日本癌学会総会、平成 22 年 9 月 24 日、大阪国際会議場(大阪府)
- ⑥ 平賀 徹、中村浩彰 癌幹細胞マーカー CD44 は癌細胞の造腫瘍能, 細胞運動能, 基質形成能の亢進を介して骨転移を促進する 第 30 回 日本骨代謝学会学術集会、2012 年 7 月 21 日、京王プラザホテル(東京都)
- ⑦ 平賀 徹 癌幹細胞マーカー CD44 の乳癌骨転移に対する機能的役割 第 71 回 日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、札幌市教育文化会館(北海道)
- ⑧ Hiraga T, Ito S, Nakamura H. The cancer stem cell marker CD44 promotes bone metastasis of breast cancer by enhancing tumorigenicity, cell motility, and matrix production. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research、2012 年 10 月 12 日、Minneapolis, Minnesota, USA

[図書] (計 1 件)

- ① 平賀 徹 骨転移進行抑制と疼痛緩和 pp. 49-55 高橋俊二編 「がん骨転移治療 -ビスホスホネート治療による Bone Management-」 2012 年、先端医学社、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

平賀 徹(HIRAGA TORU)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号:70322170

(2)研究分担者

細矢 明宏(HOSOYA AKIHIRO)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号:70350824

二宮 禎(NINOMIYA TADASHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号:00360222

小林 泰浩(KOBAYASHI YASUHIRO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授
研究者番号:20264252