

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 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590442

研究課題名（和文）

sRANKL および TGF β による微小骨転移の検出とこれに基づく予防的治療法の確立

研究課題名（英文）

Soluble receptor activator of nuclear factor-kB ligand : involvement and significance as therapeutics in the osteolysis associated with breast cancer growth in the bone microenvironment

研究代表者

二口 充 (Futakuchi Mitsuru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60275120

研究成果の概要（和文）：

欧米や本邦の女性に罹患率の高い乳癌の終末像には、溶骨性の骨転移巣が、腫瘍細胞、破骨細胞および骨芽細胞の相互作用により形成される。この腫瘍と間質の相互作用のメカニズムを解析するため、我々は、マウス乳がん細胞を同系マウスの頭蓋骨直上に移植することで、骨微小環境における腫瘍細胞と破骨・骨芽細胞の相互作用を *in vivo* で観察できる *in vivo* 乳がん骨微小環境モデルを作製した。そこで、骨微小環境における乳がん細胞の増殖する領域と、乳がん細胞のみが増殖する領域を microarray で比較したところ、RANKL および Cathepsin G の発現が上昇していた。

RANKL と RANK の結合は、破骨細胞の分化・誘導を促進し、溶骨性変化を起こすシグナルである。RANKL の治療標的分子としての有用性を検討する目的で、ヒト sRANKL 抗体(OCIF)を腫瘍細胞の移植前に投与した群（前投与）、移植後に投与した群（後投与）および移植の前後に投与した群（全投与）と比較検討した。その結果、骨微小環境における細胞増殖率は、全投与、後投与と同様に前投与群でも有意に抑制されていた。また骨微小環境に誘導された破骨細胞の数および骨破壊の程度も、前投与、後投与、全投与のいずれの群でも有意に抑制されていた。さらに Denosumab の予防的効果は濃度依存性であった。

以上の結果から、骨微小環境における乳癌の増殖に対して、sRANKL は治療標的分子として有用であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Understanding how cancer cells induce bone metastases is essential for the identification of new therapies to control bone metastasis. Using a mouse model that mimics osteolytic changes associated with breast cancer-induced bone metastases, we identified cathepsin G to be proteases that are up-regulated at the tumor bone (TB)-interface. Moreover, we showed that cathepsin G is capable of shedding the extracellular domain of receptor activator of nuclear factor-KB ligand (RANKL), generating active soluble version (sRANKL) that is capable of inducing differentiation and activation of osteoclast precursors. The major source of cathepsin G seems to be osteoclasts. Furthermore, we showed that *in vivo* inhibition of cathepsin G reduces mammary tumor-induced osteolysis.

Next we examined the preventive effects of a competitive inhibitor of sRANKL, osteoprotegerin fusion protein (OCIF) was administered to mice before osteolysis induction by implantation of mammary tumor cells (pre), after osteolysis induction (post) or during the entire experimental period (whole). Tumor growth at the TB-interface was significantly suppressed in the pre as well as the post and whole treatment groups of OCIF. The extent of bone destruction was significantly reduced in the pre, post and whole treatment groups. In addition, significantly fewer osteoclasts were

observed in the OCIF treatment groups regardless of treatment period.

Together, our data indicate that inhibition of cathepsin G activity at the TB interface could be therapeutic targets, and sRANKL which is generated by cathepsin G is a potentially target for prevention as well as treatment of breast 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	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、骨転移、sRANKL, TGFβ

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌の骨転移巣に対して溶骨性変化が誘導される直前／直後からの予防的治療

欧米諸国の女性に罹患率の高い乳癌は、原発巣に対しては治療法が確立され治療効果をあげているが、その死亡率は未だ上昇している。これは、脊椎や骨盤などに発生した骨転移巣が、全身に拡大するためと考えられる。乳癌の骨転移は、腫瘍細胞と破骨細胞が相互作用し、溶骨性変化を示すものが大半を占める。腫瘍細胞により活性化された破骨細胞は硬い骨基質を溶解し、腫瘍細胞が増殖するための空間を形成する。溶骨性変化に伴い骨基質中に含まれる TGFβ などの増殖因子が放出され、腫瘍細胞や破骨細胞がさらに刺激され、細胞増殖や骨溶解がますます促進される。このように、破骨細胞による溶骨性変化が最初に誘導され、骨微小環境は腫瘍細胞が増殖するのに都合の良い環境となり骨転移巣が拡大する。したがって溶骨性変化が誘導される直前あるいは直後から治療を開始すれば、腫瘍細胞が骨微小環境に適応する前であり、強力に骨転移巣を抑制することが期待できる。

(2) 溶骨性変化に関与する soluble RANKL と TGFβ

RANKL と RANK の結合は、破骨細胞の分化・誘導を促進し、溶骨性変化を起こすシグナルである。我々は、ラット前立腺癌組織を同系ラットの頭蓋骨直上に移植することで、骨微小環境における腫瘍細胞と破骨・骨芽細胞の相互作用を *in vivo* で観察できる動物モデルを作製した。またマウス乳癌においても、破骨細胞由来の Cathepsin G が骨髄間質細胞

上の膜貫通型タンパクである RANKL を切断し soluble RANKL (sRANKL) が生成されることを見いだした。このように生成された sRANKL は、骨芽細胞と破骨細胞が離れていても RANKL-RANK のシグナル伝達が行われ、破骨細胞の分化および溶骨性変化を促進する。

2. 研究の目的：微小骨転移の予防的治療の効果の検討

溶骨性変化は骨転移巣の進展を促進する。しかし溶骨性変化が誘導されなければ、腫瘍細胞が増殖する空間が形成されないため骨転移巣を形成することは困難である。従って、溶骨性変化が起こる前に、溶骨性変化を標的とした予防的治療を行えば、骨転移の形成を強力に抑制することが可能となる。我々は、sRANKL が、乳癌・前立腺癌の骨転移巣において、溶骨性変化を進展させることから sRANKL は予防的治療の標的分子となると仮説をたてた。この仮説を検証するため、我々が開発した *in vivo* 乳がん骨微小環境モデルを用い、以下の3つの実験を行った

(1) Bone microenvironment study: soluble-RANKL が骨微小環境に特異的に作用するかどうかを検討する目的で、同じ数の腫瘍細胞を、頭蓋骨の直上および皮下に移植し、sRANKL 抗体を投与した。

(2) Prevention study: 治療標的分子としての有用性を検討する目的で、sRANKL 阻害剤を腫瘍細胞の移植前（前投与）に投与し、移植後に投与した群、移植の前後に投与した全投与群と比較検討することで、前投与群における予防的効果を検索した。

(3) Dose response study : 前投与群における予防効果の濃度依存性について検索し、低濃度投与による予防効果についても検討した。

3. 研究の方法

(1) Bone microenvironment study:

Tumor injection: Balb C マウス由来の murine mammary carcinoma cell line である Cl66M2 を用いた。 BalbC 雌マウスに 1 匹あたり 1.0×10^5 個の Cl66M2 を頭蓋骨の直上および皮下にそれぞれ移植した (Day 0)。

Treatment : sRANKL 阻害剤として sRANKL の拮抗的阻害剤である OCIF を 3mg/kg b.w. の濃度に調整し、Day 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, および Day 24 に皮下投与した。

Preparation : 移植後 25 日で屠殺剖検し、腫瘍組織を採取した。採取した腫瘍を含めた組織を半割し、半分はパラホルム固定をして、病理組織学的な検討に、もう一方は、タンパク質抽出用に用いた。頭蓋骨に移植した腫瘍細胞が骨破壊を誘導している領域を Tumor bone interface (TBI)、その対照として、皮下に移植した腫瘍細胞が、皮下組織に浸潤する領域を Tumor subcutaneous interface (TSI) として切り出した。

サイトカインの定量 : TBI および TSI から T-PER (Pierce 社) を用いてタンパク質を抽出し、BCA protein Assay kit (Pierce 社) を用いて定量した。定量したタンパク質から、ELISA kit を用いて組織中の濃度 sRANKL (ALPCO diagnosis 社) および $\text{TGF}\beta$ (R&D 社) の濃度を計測した。

Evaluation : a) 骨破壊の程度 / 破骨細胞の数 : H&E 染色標本を作製し、画像解析装置を用いて定量解析した。また、TRAP 染色を行い破骨細胞の数を計測した。b) 細胞増殖率 : PCNA 染色を行って、TBI および TSI における PCNA 陽性細胞率を算出し、それぞれの領域における細胞増殖率とした。

(2) Prevention study

Tumor injection : Balb C マウス由来の murine mammary carcinoma cell line である Cl66M2 を、BalbC 雌マウスに 1 匹あたり 1.0×10^5 個の Cl66M2 を頭蓋骨の直上にそれぞれ移植した (Day 0)。

Treatment : sRANKL 阻害剤として sRANKL の拮抗的阻害剤である OCIF を 3mg/kg b.w. の濃度に調整した。動物を以下の 4 群にわけた。

a) 後投与群 : 移植後 3 週間で屠殺するが、Day 3、Day 10、Day 18 に sRANKL 阻害剤を投与した。 b) 前投与群 : 移植前の Day -18、Day -10 および Day -3 に sRANKL 阻害剤を投与した。 c) 全投与群 : 前投与 + 後投与の合計 6

回、sRANKL 阻害剤を投与した。 d) 対照群 : 全投与群と同じ投与スケジュールで vehicle を投与した。

Evaluation : Bone microenvironment study と同様の方法で病理組織学的検索し、bone destruction および破骨細胞の誘導数、細胞増殖率および TBI における sRANKL を定量し、前投与と、後投与、全投与とを比較検討して、予防的治療効果の有用性を評価した。

(3) Dose response study

Tumor injection : 先の prevention study と同様の方法を用いた。

Treatment : 対照群と前投与群を設定し、sRANKL 阻害剤を最高容量 3mg/kg b.w. の濃度で投与し、投与濃度は最高用量 (1/1 濃度)、その 1/2 濃度、1/5 濃度の 3 群を設定した。

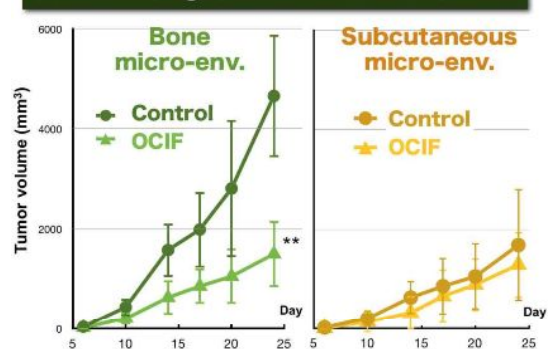
Evaluation : prevention study と同様の方法を用い、予防的治療を行った場合、その効果は濃度依存性なのか、濃度を下げることが可能なのかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) Bone microenvironment study:

頭蓋骨直上に移植した腫瘍 (Tumor growth in the bone microenvironment) および皮下に移植した腫瘍の体積 (Tumor growth in the subcutaneous microenvironment) は、Day 5 から徐々に増大した。骨微小環境における腫瘍の体積は皮下微小環境におけるものに比べて増大率が高く、大きな腫瘍塊が形成された。骨微小環境において、OCIF 処置群での腫瘍の体積は、対照群に比べて小さく、Day 25 では有意な差が見られた。皮下微小環境においては、OCIF 処置群での腫瘍の体積は対照群と差は見られなかった (図 1)。

図 1 Tumor growth in the micro-env.



骨微小環境における腫瘍の TBI の領域では、腫瘍の増殖に伴い破骨細胞が誘導され、溶解性変化が観察された。一方、皮下微小環境における腫瘍の TSI の領域では、腫瘍細胞の増殖に伴い、微小血管が誘導されていた。

TBI において、頭蓋骨が完全に破壊されて

腫瘍細胞が頭蓋内に浸潤する組織像が観察された。そこで、頭蓋骨の全長に対して、完全に破壊された頭蓋骨の長さを、Bone destruction index として算出したところ、対照群では約 60%の頭蓋骨が破壊されていたが、OCIF 処置群では 20%程度で、有意な抑制効果が観察された。骨破壊を誘導する破骨細胞の数を計測した結果、対照群では約 600 個の TRAP 陽性の破骨細胞が観察されたが、OCIF 群では約 300 個と有意に抑制されていた。TSI では TRAP 陽性細胞は観察されなかった。

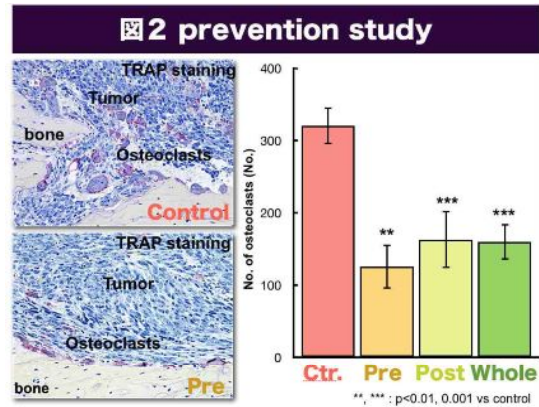
TBI および TSI における腫瘍細胞の細胞増殖率を PCNA 染色を行って検索した。腫瘍細胞の体積と同様に、TBI における腫瘍細胞の増殖率は TSI に比べて有意に上昇していた。TBI では、OCIF の投与により細胞増殖率は有意に抑制されたが、TSI では抑制作用は見られなかった。骨微小環境における細胞増殖率は、皮下微小環境に比べて高く、OCIF は骨微小環境における腫瘍細胞の増殖を抑制したが、皮下では抑制しなかった。従って、骨微小環境では皮下とは異なる増殖メカニズムが存在し、OCIF はそのメカニズムを抑制した結果、細胞増殖率を皮下と同程度にまで抑制することが示唆された。

屠殺時に切り出した TBI および TSI からタンパク質を抽出し、組織中の濃度 sRANKL の濃度を計測した。その結果、RANKL の濃度は TBI では TSI に比べて有意に高かった。しかし、TBI でも TSI においても OCIF 投与により、RANKL の濃度は変化しなかった。一方、OPG の濃度を測定したところ、TBI では OCIF 投与により OPG 濃度が有意に上昇した。しかし、TSI では対照群、OCIF 投与群のいずれも OCIF 濃度は低値で有意な差は見られなかった。

OCIF 投与によって、骨微小環境において、骨破壊の程度、破骨細胞の誘導、腫瘍細胞の増殖が抑制された。OCIF による腫瘍細胞の増殖抑制作用は、骨微小環境に特異的であり、組織中の OPG の濃度と逆相関することが示唆された。

2) Prevention study:

骨破壊の程度は、対照群では約 40%であったが、前投与群、後投与群、全投与群ではいずれも 25%程度と、有意に抑制されていた。骨破壊の程度と同様に破骨細胞の誘導も、対照群に比べて後投与群、前投与群および全投与群では、いずれも有意に抑制されていた(図 2)。



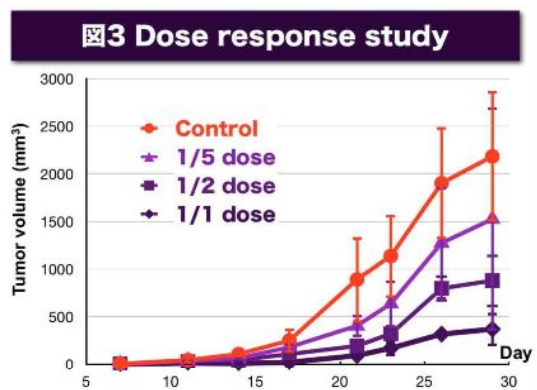
細胞増殖率も、対照群に比べて、前投与群、後投与群および全投与群では優位に抑制されていた。

OPG の濃度は、対照群では約 200pg/ug protein であったが、前投与群、後投与群ではいずれも 300pg/ug protein、全投与群では約 450pg/ug protein にまで上昇しており、OCIF 投与により、骨微小環境では OPG が上昇することが明らかとなった。

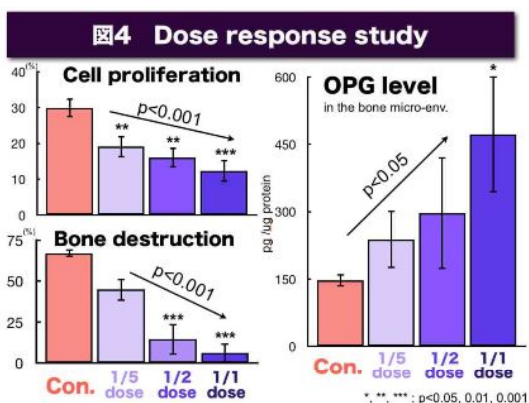
これらの結果から、前投与によっても、後投与と同様に骨破壊の程度、破骨細胞の誘導および骨微小環境における腫瘍細胞の増殖を抑制することができた。さらにこの予防作用は組織中の OPG 濃度と逆相関することが判明した。

(3) Dose response study

OCIF の予防投与による濃度依存性の作用を検討したところ、移植した腫瘍細胞の体積は、濃度依存性に抑制された(図 3)。



また、骨破壊の程度、腫瘍細胞の増殖も濃度依存性に抑制された (いずれも $p < 0.001$)。さらに、骨微小環境における OPG の濃度は、濃度依存性に上昇し、OCIF 投与による予防作用と逆相関することが明らかとなった (図 4)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

- Xu, J., Sagawa, Y., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Furukawa, F., Ikarashi, Y., Uchino, T., Nishimura, T., Morita, A., et al. (2011). Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats. *Food Chem Toxicol* 49, 1298-1302. 査読有
- Sadanandam, A., Futakuchi, M., Lyssiotis, C. A., Gibb, W. J., and Singh, R. K. (2011). A Cross-Species Analysis of a Mouse Model of Breast Cancer-Specific Osteolysis and Human Bone Metastases using Gene Expression Profiling. *BMC Cancer* 11, 304. 査読有
- Xu, J., Futakuchi, M., Iigo, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Shimizu, H., Sakai, Y., Tamano, S., Furukawa, F., Uchino, T., et al. (2010). Involvement of macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP1alpha) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nanoscale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis* 31, 927-935. 査読有
- Wilson, T. J., Nannuru, K. C., Futakuchi, M., and Singh, R. K. (2010). Cathepsin G-mediated enhanced TGF-beta signaling promotes angiogenesis via upregulation of VEGF and MCP-1. *Cancer Lett* 288, 162-169. 査読有
- Tsuda, H., Xu, J., Sakai, Y., Futakuchi, M., and Fukamachi, K. (2010). Toxicology of Engineered Nanomaterials - A review of Carcinogenic Potential. *Asian Pacific J Cancer Prev* 10, 975-980. 査読有
- Tsuda, H., Kozu, T., Inuma, G., Ohashi, Y., Saito, Y., Saito, D., Akasu, T., Alexander, D. B., Futakuchi, M., Fukamachi, K., et al. (2010). Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial. *Biometals* 23, 399-409. 査読有
- Tsuda, H., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Shirai, T., Imaida, K., Fukushima, S., Tatematsu, M., Furukawa, F., Tamano, S., and Ito, N. (2010). A medium-term, rapid rat bioassay model for the detection of carcinogenic potential of chemicals. *Toxicol Pathol* 38, 182-187. 査読有
- Tanaka, H., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Alexander, D. B., Long, N., Tamamushi, S., Minami, K., Seino, S., Ohara, H., Joh, T., and Tsuda, H. (2010). Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci* 101, 341-346. 査読有
- Nannuru, K. C., Futakuchi, M., Varney, M. L., Vincent, T. M., Marcusson, E. G., and Singh, R. K. (2010). Matrix metalloproteinase (MMP)-13 regulates mammary tumor-induced osteolysis by activating MMP9 and transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface. *Cancer Res* 70, 3494-3504. 査読有
- Nannuru, K. C., Futakuchi, M., Sadanandam, A., Wilson, T. J., Varney, M. L., Myers, K. J., Li, X., Marcusson, E. G., and Singh, R. K. (2009). Enhanced expression and shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand during tumor-bone interaction potentiates mammary tumor-induced osteolysis. *Clin Exp Metastasis* 26, 797-808. 査読有
- Long, N., Shirai, T., Hardville, S., Pierce, A., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Alexander, D. B., and Tsuda, H. (2009). Construction of a Multi Functional Helper Dependent Adenovirus Based System. *Asian Pacific J Cancer Prev* 10, 939-960. 査読有
- Iigo, M., Alexander, D. B., Long, N., Xu, J., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Takase, M., and Tsuda, H. (2009). Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. *Biochimie* 91, 86-101. 査読有
- Futakuchi, M., Nannuru, K. C., Varney, M. L., Sadanandam, A., Nakao, K., Asai, K., Shirai, T., Sato, S. Y., and Singh, R. K. (2009). Transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface promotes mammary tumor growth and osteoclast activation. *Cancer Sci* 100, 71-81. 査読有

〔学会発表〕 (計 10 件)

- Futakuchi, M., Fukamachi, K., and Suzui, M. Crosstalk between TGFbeta and AKT/PTEN signaling pathway in the bone microenvironment ; mechanism for tumor cell proliferation in the bone metastasis of breast cancer. The 16th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2011年12月9日, 札幌

2. Futakuchi, M., Fukamachi, K., and Suzui, M. Soluble RANKL; significance of therapeutic target for tumor growth in the bone microenvironment. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011年10月5日, 名古屋.
3. 二口 充, 深町勝巳, 酒々井真澄 可溶性 RANKL 標的療法による骨微小環境での乳がん細胞の増殖および溶骨性変化の抑制とそのメカニズム. 第20回日本癌転移学会学術集会, 2011年7月11日, 浜松
4. 二口 充, 深町勝巳, 酒々井真澄, 津田洋幸 乳癌骨転移進展における TGFβ の役割. 第100回日本病理学会総会, 2011年4月29日, 横浜.
5. 二口 充, 深町勝巳, 津田洋幸, 酒々井真澄 骨微小環境における乳がん細胞の増殖に対する可溶性 RANKL の治療標的分子としての意義. 平成22年度「個体レベルでのがん支援活動」ワークショップ, 2011年2月3日, 琵琶湖
6. Futakuchi, M., Suzui, M., Fukamachi, K., and Singh, R. Soluble receptor activator of nuclear factor-κB ligand: Involvement and significance as therapeutics in the osteolysis associated with breast cancer growth in the bone microenvironment. The 15th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Tumor microenvironment and progress in breast cancer research, 2010年12月23日, Incheon, Korea.
7. Futakuchi, M., Fukamachi, K., Tsuda, H., and Suzui, M. Preventive and therapeutic effect of osteoprotegerin fusion protein on mammary tumor-induced osteolysis. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2010年9月22日, 大阪
8. Futakuchi, M., Nannuru, K. C., Wilson, T. J., Suzui, M., Fukamachi, K., and Singh, R. Soluble receptor activator of nuclear factor-κB ligand : the involvement in the osteolysis associated with breast or prostate cancer growth in the bone microenvironment and its significance as therapeutics for bone metastatic cancer. Joint Metastasis Research Society-AACR Conference, Metastasis and the tumor microenvironment, 2010年9月12日, Philadelphia, PA.
9. Futakuchi, M., Xu, J., Fukamachi, K., and Tsuda, H. Significance of TGF-beta and sRANKL as therapeutic s for breast cancer bone metastasis. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2009年10月1日, 横浜
10. 二口 充, 深町勝巳, 津田洋幸 Significance of TGF-beta as a therapeutic target for breast metastasis of prostate or breast cancer. 第19回日本がん転移学会学術集会, 2010年6月17日, 金沢

〔図書〕(計3件)

1. 動物モデルを用いた骨転移の分子メカニズム解明と創薬応用研究、最新疾患モデルと創薬応用の最前線、遺伝子医学 MOOK22号、株式会社 Medical Do, 2012年8月刊行予定
 2. モデル動物利用マニュアル (仮題)、第2章 がん、第4項 転移浸潤モデル、(3) 骨浸潤転移モデル、2012年エル・アイ・シーから刊行予定
 3. ロビンス基礎病理学 第8版 日本語翻訳 Chapter 8 Environmental and nutritional diseases, 2011年8月エルゼビア・ジャパン, 329-376
6. 研究組織
- (1)研究代表者
二口 充 (Futakuchi, Mitsuru)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号:60275120
- (2)研究分担者 該当無し
- (3)連携研究者
深町勝巳 (Fukamachi, Katsumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号:90381798