

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 4月 16日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21689050

研究課題名（和文） FAKシグナルを標的とした癌誘発骨破壊病変に対する新たな治療戦略の開発

研究課題名（英文） A new therapeutic strategy for tumor induced bone destruction targeting FAK

研究代表者

志茂 剛 (SHIMO TSUYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40362991

研究成果の概要（和文）：

Focal adhesion kinase (FAK)は様々な悪性腫瘍において過剰発現し、特に浸潤・転移能の高い細胞において高発現することが報告されているものの、癌骨破壊巣におけるその役割は今だ不明な点が多い。そこで本研究では癌骨破壊病変における FAK の役割について検討し、FAK シグナルは破骨細胞形成、骨吸収能に大きく関与し、癌骨破壊病変に対し標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Focal adhesion kinase (FAK) is a 125-kDa non-receptor type tyrosine kinase that localizes to focal adhesions. FAK overexpression is frequently found in invasive and metastatic cancers, but its role in osteolytic metastasis is not well understood. In this study, we have analyzed anti-tumor effects of the FAK against bone metastasis in cancer, we found that FAK was critically involved in osteolytic metastasis and activated in tumors, pre-osteoclasts, and mature osteoclasts. These results suggest that FAK can be effective target for the treatment of cancer induced 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	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	10,200,000	3,060,000	13,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：FAK 破骨細胞 癌骨浸潤

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍において骨浸潤・骨破壊は頻繁に認められ、顎骨の合併切除を必要とすることが多く、治療法の選択、手術範囲の決定、そして患者の咀嚼機能などの QOL を低下させる要因となっている。従って癌の骨への浸潤、癌の骨内での増殖を抑制することは、臨床上一極めて重要な課題である。申請者等はこれま

で破骨細胞前駆細胞を口腔癌培養上清で刺激すると、FAK (focal adhesion kinase) の活性化が認められ破骨細胞分化が促進されること、その FAK シグナルを選択的に阻害することで破骨細胞形成が抑制されることを見いだした。しかしながら癌骨破壊巣における FAK シグナルの生物学的な役割はいまだ明らかにされていない。本研究では癌骨浸潤・

骨破壊巣成立過程における破骨細胞並びに癌細胞の FAK シグナルの役割を詳細に検討し、両細胞における FAK シグナルを標的とした新しい治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

Focal adhesion kinase (FAK)は様々な悪性腫瘍において過剰発現し、特に浸潤・転移能の高い細胞において高発現することが報告されているものの、癌骨破壊巣におけるその役割は今だ不明な点が多い。そこで本研究では癌骨破壊病変における FAK の役割について検討し、癌骨破壊病変に対し標的となる可能性を示す。

3. 研究の方法

癌細胞は各種口腔扁平上皮癌細胞、ヒト乳癌細胞株 MDA231 細胞株を用いた。癌骨転移・破壊モデルは MDA231 細胞を 5 週令メス BALB/c ノードマウスに心腔内投与し作製した。破骨細胞形成には 5 週令オス C57Black/6J マウス骨髄細胞、破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞を使用し、分化能は TRAP (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ) 染色、形態解析は免疫蛍光染色にて、吸収能は carbonated calcium phosphate コートプレートを用いて検討した。FAK のリン酸化はウエスタンブロット法にて、細胞増殖能は³H thymidine の取り込みを指標に検討した。高カルシウム血症モデルは PTHrP をオスミックポンプに注入し、マウス背部皮下に移植し、作製した。

4. 研究成果

(1) 癌骨転移モデルにおける FAK Thr397 選択的阻害剤の効果の検討

1) FAK Thr397 選択的阻害剤投与群では非投与群と比較し有意に癌骨破壊、腫瘍増殖を抑制し、阻害剤投与群のマウスの生存期間は非投与群と比較して有意に延長した。また阻害剤投与群では癌骨破壊巣における破骨細胞数の抑制が認められた (図 1)。

(2) 破骨細胞前駆細胞における FAK Thr397 の役割

1) FAK Thr397 阻害では破骨細胞前駆細胞の増殖能に関与する。2) I 型コラーゲン、オステオポンチンとの接着能に関与する (図 2)。3) 破骨細胞分化に関与する (図 3)。4) 破骨細胞分化に関与する FAK Thr397 シグナル下流に AKT, ERK, p38, IκBαシグナルが存在する。

(3) 成熟破骨細胞における FAK Thr397 の役割

1) アクチンリング形成に関与 (図 4)。2) 骨

吸収活性に関与。3) NFATc1, Cathepsin K, TRAP 発現に関与する。

(4) FAK Thr397 が破骨細胞形成支持能を有する骨髄間質細胞、骨芽細胞に与える影響

1) 骨髄間質細胞における RANKL 発現に関与し、破骨細胞との共存培養における破骨細胞形成に関与する (図 5)。2) FAK Thr397 は骨芽細胞の増殖、分化、生存に関与する。

(5) 腫瘍細胞に対する FAK Thr397 の影響

1) MDA-MB-231 細胞の増殖能を in vitro, in vivo に関与 (図 6)。2) 口腔扁平上皮癌細胞株で細胞増殖能に in vitro, in vivo に関与。3) 腫瘍細胞に FAK Thr397 阻害すると増殖能は抑制され、そのメカニズムに AKT-caspase3 を介するアポトーシスに関与することが明らかとなる (図 7)。

(6) FAK Thr397 の高カルシウム血症における役割

1) FAK Thr397 阻害で PTHrP によって誘導された高カルシウム血症が改善された (図 8)。

以上の結果より FAK シグナルは破骨細胞形成、骨吸収能に大きく関与し、癌骨破壊病変に対し標的となる可能性が示唆された。

図 1

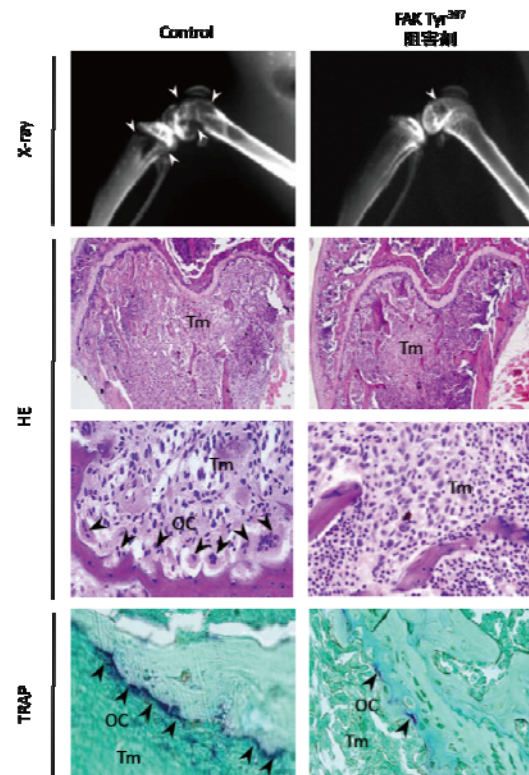


図2

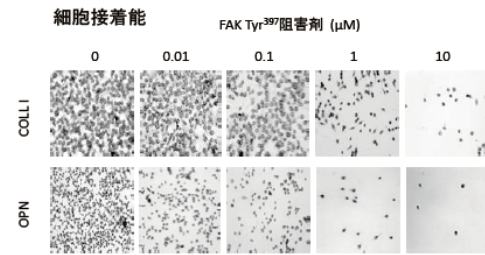


図3

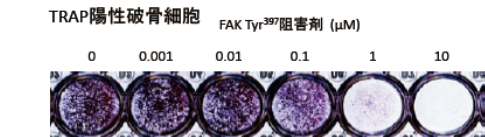


図4

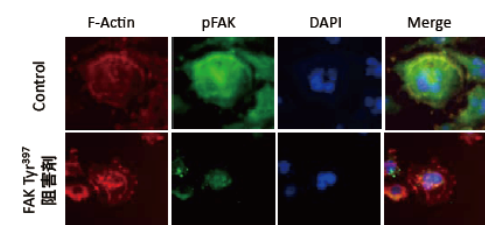


図5

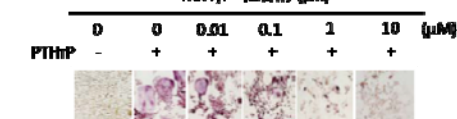


図6

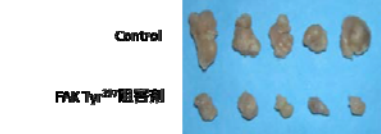


図7

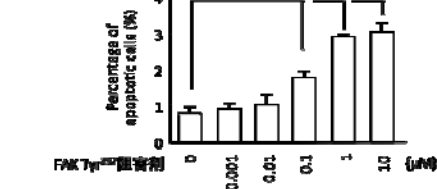
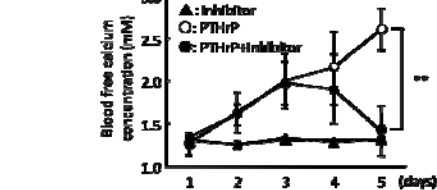


図8



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Naito Kurio, Tsuyoshi Shimo, Takuya Fukazawa, Tatsuo Okui, Nur Mohammad Monsur Hassan, Tatsuki Honami, Yuu Horikiri, Shinji Hatakeyama, Munenori Takaoka, Yoshio Naomoto, Akira Sasaki.: Anti-tumor effect of a novel FAK inhibitor TAE226 against human oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncology*, 2012, accepted (査読有)
2. Naito Kurio, Tsuyoshi Shimo, Takuya Fukazawa, Munenori Takaoka, Tatsuo Okui, Nur Mohammad Monsur Hassan, Tatsuki Honami, Shinji Hatakeyama, Masahiko Ikeda, Yoshio Naomoto, Akira Sasaki.: Effect of a novel FAK inhibitor TAE226 on the breast cancer associated with bone metastasis, *Experimental Cell Research*, 317(8):1134-1146, 2011 (査読有)
3. Tsuyoshi Shimo, Akira Sasaki.: Mechanism of cancer-induced bone destruction: An association of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in the bone metastasis. *Jap Dental Science Review*, 47(1):13-22, 2011 (査読有)
4. Tatsuki Honami, Tsuyoshi Shimo, Tatsuo Okui, Naito Kurio, Nur Mohammad Monsur Hassan, Masahiro Iwamoto, Akira Sasaki.: Sonic Hedgehog Signaling Promotes Growth of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells Associated with Bone Destruction, *Oral Oncology*, 48(1):49-55, 2011 (査読有)

- 読有)
5. Soichiro Ibaragi, Tsuyoshi Shimo, Masahiro Iwamoto, Nur Mohammad Monsur Hassan, Sachiko Isowa, Naito Kurio, Hiroki Mandai, Shinichi Kodama, Akira Sasaki.: Induction of MMP-13 Expression in Bone-metastasizing Cancer Cells by Type I Collagen through Integrin $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ -p38 MAPK Signaling, *Anticancer Research*, 31(4):1307-1314, 2011 (査読有)
 6. Tatsuo Okui, Tsuyoshi Shimo, Takuya Fukazawa, Naito Kurio, Nur Mohammad Monsur Hassan, Tatsuki Honami, Munenori Takaoka, Yoshio Naomoto, Akira Sasaki.: Anti-tumor Effect of Tamsirolimus against Oral Squamous Cell Carcinoma Associated with Bone Destruction, *Molecular Cancer Therapeutics*, 9 (11) 2010 (査読有)
 7. Sachiko Isowa, Tsuyoshi Shimo, Soichiro Ibaragi, Naito Kurio, Tatsuo Okui, Kiminori Matsubara, Nur Mohammad Monsur Hassan, Koji Kishimoto, Akira Sasaki.: PTHrP regulates angiogenesis and bone resorption via VEGF expression. *Anticancer Research*, 30(7):2755-2767, 2010 (査読有)
 8. Takeshi Goda, Tsuyoshi Shimo, Yasuto Yoshihama, Nur Mohammad Monsur Hassan, Soichiro Ibaragi, Naito Kurio, Tatsuo Okui, Tatsuki Honami, Koji Kishimoto, Akira Sasaki.: Bone destruction by invading oral squamous carcinoma cells mediated by the transforming growth factor- β signaling pathway.

- Anticancer Research*, 30(7):2615-2623, 2010 (査読有)
9. Soichiro Ibaragi, Tsuyoshi Shimo, Masahiro Iwamoto, Nur Mohammad Monsur Hassan, Shinichi Kodama, Sachiko Isowa, and Akira Sasaki, Parathyroid hormone-related peptide regulates *matrix metalloproteinase-13* gene expression in bone metastatic breast cancer cells, *Anticancer Research*, 30(12):5029-5036, 2010 (査読有)
- [学会発表] (計 28 件)
1. Naito Kurio, Tsuyoshi Shimo, Nur Mohammad Monsur Hassan, Tatsuo Okui, Tatsuki Honami, Shinji Hatakeyama, Munenori Takaoka, Yoshio Naomoto, Akira Sasaki. Anti-tumor effect of a novel FAK inhibitor TAE226 against human oral squamous cell carcinoma, The 5th International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society Okayama 3/15-16/2012
 2. Naito Kurio, Tsuyoshi Shimo, Nur Mohammad Monsur Hassan, Tatsuo Okui, Tatsuki Honami, Shinji Hatakeyama, Munenori Takaoka, Yoshio Naomoto, Akira Sasaki. A Novel Focal Adhesion Kinase Inhibitor TAE226 Suppresses Parathyroid Related Protein Induced Hypercalcemia and Reduced Osteoclast Activation. The 3rd International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society Okayama 2/3-4/2010
 3. Naito Kurio, Tsuyoshi Shimo, Munenori Takaoka, Tatsuo Okui, Norie Yoshioka,

Nur Mohammad Monsur Hassan, Shinji Hatakeyama, Yoshio Naomoto, Akira Sasaki. Inhibition of Focal Adhesion Kinase Suppresses Breast Cancer Induced Bone Metastasis, The American Society for Bone and Mineral Research 31st Annual Meeting, Colorado, USA, September 11-15, 2009 (plenary poster)

〔図書〕 (計 1 件)

1. Tsuyoshi Shimo, Akira Sasaki.: Squamous Cell Carcinoma: Role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in oral squamous cell carcinoma-induced bone destruction, *InTech*, Croatia, 175-194, February 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志茂 剛 (SHIMO TSUYOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 40362991

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者