

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07230

研究課題名（和文）「造骨性」骨転移の診断治療法の開発に向けたWntシグナルパスウェイの役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of the Wnt signaling pathway in the development of diagnostic treatments for "osteoblastic" bone metastases

研究代表者

須堯 綾 (Sugyo, Aya)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 分子イメージング診断治療研究部・主任技術員

研究者番号：00415415

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨代謝に関連するWnt1、Wnt3a、Wnt5aの発現ベクターを乳がん由来の5a-D-Luc-ZsGreen細胞に導入して高発現細胞株を作成し、心腔移植により骨転移モデルを作成した。発光イメージングと小動物用マイクロCTにより、Wnt1高発現細胞を移植した個体で造骨性骨転移を確認した。転移モデルと正常マウスの骨をサンプリングし、H&E染色や骨芽細胞の分化マーカーであるSATB2で免疫染色を行なった。SATB2免疫染色により骨転移部位において溶骨型に比べ造骨型の骨芽細胞の陽性数が有意に多く存在し、Wnt1が骨形成における重要な因子であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がん由来の溶骨性骨転移は動物モデルも既に確立し、治療診断法の研究が進んでいるが、前立腺がんによく発生する造骨性骨転移はモデルもなく、分子メカニズムが不明のため、治療法の開発が進んでいない。我々が注目したWntファミリーは骨形成や骨吸収を含む様々な生命現象に関与することが知られているが、造骨性骨転移に関与する直接の証拠は示されていなかった。我々のデータはWnt1の過剰発現が溶骨性の骨転移モデルにおいて、骨芽細胞の増加を誘発し、Wnt1が骨形成における重要な因子であることを明確に示すものであった。このモデルは造骨性骨転移の治療法の開発の促進に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The breast cancer derived 5a D Luc ZsGreen cells were transfected with Wnt1, Wnt3A, and Wnt5A expression vectors, producing stably highly expressing cells. These cells were intracardially injected into nude mice. Luminescence imaging confirmed mice with bone metastases in the hind limbs. Micro CT imaging found an osteoblastic change only in bone metastasis of mice injected with Wnt1 expressing cells. Hind limb bones of metastatic mice and normal mice were dissected. Sections were stained with hematoxylin and eosin, and immunohistochemically stained with an anti SATB2 antibody. SATB2 immunostaining showed differentiated osteoblasts were at the site of bone metastases in the diaphysis. It suggests that Wnt1 is an important factor in osteogenesis. Our osteoblastic bone metastasis model could be a powerful tool to promote bone metastasis treatment research.

研究分野：核医学

キーワード：造骨性骨転移 発光イメージング マイクロCT Wnt

1. 研究開始当初の背景

骨転移は痛み、骨折、麻痺を誘発し、患者の QOL を著しく低下させる。前立腺がんのおよそ 90%、乳がんの約 65~75% の高い頻度で骨転移が起こることが知られている¹⁾。骨転移は造骨型と溶骨型、造骨と溶骨の混合型が知られている。乳がんなどに多くみられる溶骨性骨転移の動物モデルはすでに確立されており^{2,3)}、分子メカニズムの理解が深まり、新しい治療法の開発が進んでいる。しかし、前立腺癌では造骨性の骨転移が頻繁に観察されるが、臨床に即した動物モデルはなく、分子メカニズムも不明なため、有効な治療法は開発されていない。Wnt シグナル伝達は カテニンを介して遺伝子発現を制御する カテニン経路と平面内細胞極性(planer cell polarity; PCP)経路と Ca²⁺経路の少なくとも 3 種類存在することが知られている⁴⁾。Wnt シグナル伝達が活性化すると細胞の増殖や分化、運動、極性を制御し、骨芽細胞の分化や破骨細胞の分化に重要な役割を果たしている。骨転移は、骨形成と骨溶解の間を相互に遷移し、骨吸収と骨形成のバランスの状態が、造骨型、溶骨型、混合型として観察される^{5,6)}。そのため、分子メカニズムを解明するには動物モデルの確立が必須である。今回、Wnt 遺伝子に着目し、造骨性骨転移の動物モデルの確立を目指した。

2. 研究の目的

我々が着目した Wnt ファミリーは、種を超えて保存されており、癌の発生などに様々な生物学的現象に関与し、骨形成や骨吸収への関与が報告されている。しかし、このファミリーが造骨性骨転移を引き起こす直接的な証拠は報告されていない。本研究の目的は、既に確立された溶骨性骨転移モデルにおいて、過剰発現した Wnt が造骨性骨転移を誘発するかどうかを評価することである。

3. 研究の方法

(1)Wnt 過剰発現細胞株の作成

Wnt ファミリーメンバーは 19 種あり、骨代謝に関連する可能性の高いファミリーメンバーとして、Wnt1、Wnt3a 及び Wnt5a を選択した。市販の pcDNA3.1-Wnt1、pcDNA3.1-Wnt3A、pcDNA3.1-Wnt5A に Gateway クローニングでハイグロマイシン耐性を発現させた過剰発現ベクターを構築した。この 3 つの発現ベクターを、我々が樹立した乳がん由来の溶骨型骨転移モデル 5a-D-Luc-ZsGreen 細胞³⁾に導入し、ハイグロマイシン含有培地によるセレクション及びクローニングにより、安定発現株をそれぞれ 8 クローンずつ樹立した(5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt1、5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt3A、5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt5A)。発現レベルをリアルタイム RT-PCR で確認し、動物モデル作成のために、最も Wnt を高発現している細胞株を選択した。

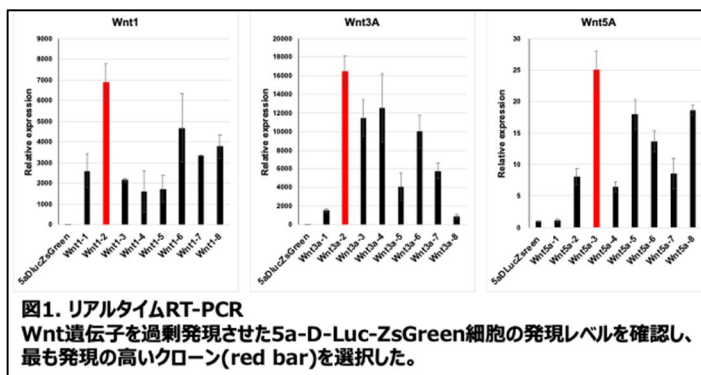
(2)造骨性骨転移モデルマウスの作成

Wnt1、Wnt3a 及び Wnt5a の高発現株とコントロールとして溶骨型を示す 5a-D-Luc-ZsGreen 細胞をメスのヌードマウスの左心室に 1×10^5 cells/100 μ L 心腔内移植し、骨転移動物モデルを作成した。IVIS を用いたルシフェラーゼによる発光イメージングで、骨転移の経過を確認した。下肢に骨転移が見られた個体は小動物用マイクロ CT で造骨性骨転移の有無を確認した。造骨性骨転移モデルと溶骨性骨転移モデルと正常マウスの大腿骨と脛骨をサンプリングし、HE 染色を行った。また骨芽細胞の分化マーカーである SATB2 で免疫染色を行い、一視野あたりの成熟骨芽細胞の陽性細胞数を比較した。

4. 研究成果

(1)Wnt 過剰発現細胞株の選択

リアルタイム RT-PCR で発現レベルを確認したところ、Wnt1-2(約 6,900 倍)、Wnt3A-2(約 16,000 倍)、Wnt5A-3(約 25 倍)で最も高く発現し、この 3 つのクローンを選択した(図 1; red bar)。これらのクローンは 5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt1、5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt3A、5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt5A とした。



(2)Wnt 高発現株を用いた 1 回目の実験

5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt1、5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt3A、5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt5A、コントロールとして親株の 5a-D-Luc-ZsGreen をヌードマウスのメスに移植し、体重の 20%減少、または最大 42 日までをエンドポイントとした。発光イメージングで骨転移の経過を週 1 回観察し(図 2A) 下肢に転移が見られた個体を選択し、大腿骨と脛骨をサンプリング後、マイクロ CT で撮像を行っ

た(図2B) コントロールの 5a-D-Luc-ZsGreen と 5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt3A、5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt5A は溶骨のみが観察された。5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt1 は 7 匹中 2 匹に造骨像が確認でき、Wnt1 が造骨に関与する可能性が示された。

(3) 5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt1 を用いた 2 回目の実験

Wnt1 が造骨を示すことを確認するために、匹数を増やしてコントロールの 5a-D-Luc-ZsGreen と造骨が観察された 5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt1 を用いて 2 回目の実験を行った。また、親株の性質が溶骨型であり、溶骨性の進行を軽減するため、エンドポイントを 28 日に設定した。5a-D-Luc-ZsGreen は 11 匹中 8 匹に骨転移が見られ、全て溶骨性病変を示した。5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt1 は 27 匹中 23 匹に骨転移が見られ、そのうち 13 匹に造骨性病変が観察された。

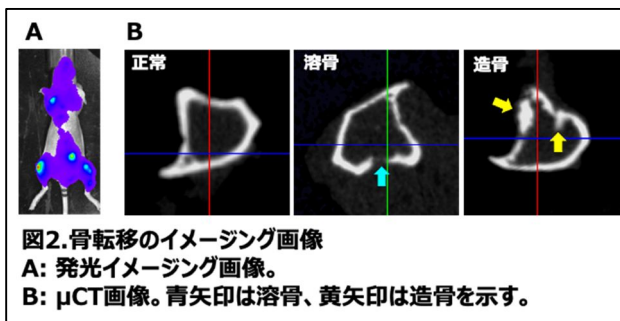


図2.骨転移のイメージング画像

A: 発光イメージング画像。

B: μCT画像。青矢印は溶骨、黄矢印は造骨を示す。

(4) SATB2 免疫染色

正常マウス、5a-D-Luc-ZsGreen 移植マウスの骨転移が見られたサンプルと、5a-D-Luc-ZsGreen-Wnt1 移植マウスのマイクロCTで造骨が観察されたサンプルを骨芽細胞の分化マーカーである SATB2 で免疫染色を行った(図3A)。非転移部位において正常と溶骨型に比べ造骨型の SATB2 の陽性細胞数は若干減少するが有意差は見られなかった。転移部位において陽性細胞数は溶骨型が 8.0 ± 5.9 、造骨型が 66.2 ± 26.3 (図3B) 観察され、有意差が見られた。

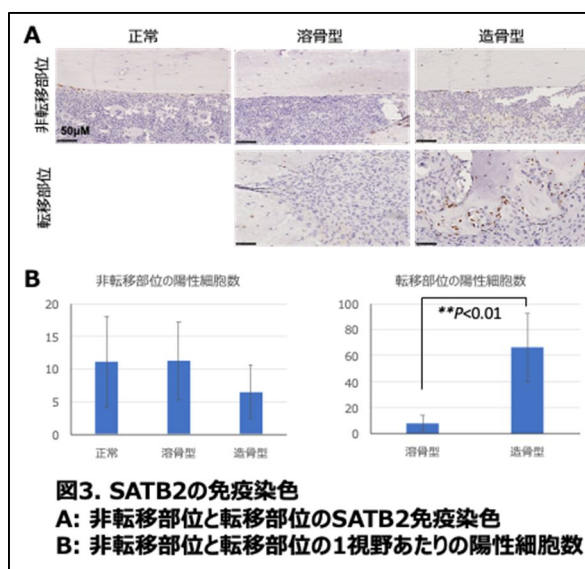


図3. SATB2の免疫染色

A: 非転移部位と転移部位のSATB2免疫染色

B: 非転移部位と転移部位の1視野あたりの陽性細胞数

(5)まとめ

本研究結果は Wnt1 が造骨性の骨転移を促進するという、直接的な証拠を示すことができた。この骨転移モデルは造骨型の分子メカニズムを解明し、治療法を開発する強力なツールとなることが期待される。

<引用文献>

1. Maurizi A, Rucci N. The osteoclast in bone metastasis: player and target. *Cancer*. 2018;10(7):218. doi: 10.3390/cancers10070218
2. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer*. 2000;88(S12):2979-2988. doi: 10.1002/1097-0142(20000615)88:12+<2979::aid-cnrc13>3.0.co;2-u
3. Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, et al. Establishment and evaluation of a new highly metastatic tumor cell line 5a-D-Luc-ZsGreen expressing both luciferase and green fluorescent protein. *Int J Oncol*. 2015;48(2):525-532. doi: 10.3892/ijo.2015.3300
4. 菊池 章, Wnt シグナルネットワークとその異常による病態、生化学、第 81 巻第 9 号、2009、780-792
5. Keller ET, Brown J. Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity. *J Cell Biochem*. 2004;91(4):718-729. doi: 10.1002/jcb.10662
6. Akoto T, Saini S. Role of exosomes in prostate cancer metastasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3528. doi: 10.3390/ijms22073528

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugyo Aya, Tsuji Atsushi B., Sudo Hitomi, Sugiura Yoshiya, Koizumi Mitsuru, Higashi Tatsuya	4. 巻 6
2. 論文標題 Wnt1 induces osteoblastic changes in a well established osteolytic skeletal metastatic model derived from breast cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Reports	6. 最初と最後の頁 e1909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cnr2.1909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------