

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：33602  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K09863  
研究課題名(和文) 骨特異的Wntシグナル阻害分子スクレロスチンの臓器選択的がん転移に対する制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of sclerostin, a bone-specific Wnt signaling inhibitor, on organ-selective cancer metastasis

研究代表者  
平賀 徹 (Hiraga, Toru)  
松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70322170  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主に骨細胞から産生されることから、骨特異性が極めて高い液性因子スクレロスチンのがん骨転移に対する作用を検討した。モデルマウスを用いた検討では、古典的Wntリガンドに対する反応性を示すがん細胞の骨転移のみが、抗スクレロスチン抗体投与により有意に増加した。その際、破骨細胞数の有意な増加がみられた。また、古典的Wntリガンドは古典的Wntリガンド反応性がん細胞のスフェア形成を促進した。以上の結果から、スクレロスチンの遮断は古典的Wntシグナルを活性化することにより、古典的Wntリガンド反応性がん細胞の幹細胞様形質の増強と破骨細胞形成の亢進を介して骨転移を促進させることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は臓器選択的がん転移に対する制御機構の一端を解明するために、骨特異性が極めて高い分子であるスクレロスチンのがん骨転移に対する作用を検討したものである。本研究の結果から、一部のがん細胞においては抗スクレロスチン抗体投与によるスクレロスチン抑制が骨転移を促進する可能性が示唆された。抗スクレロスチン抗体は、現在、骨粗鬆症治療薬として臨床的に使用されていることから、がんの既往のある骨粗鬆症患者へ使用した際に、骨転移を誘発する危険性を示唆する学術的および社会的意義の大きい研究成果が得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effect of sclerostin, which is mainly produced by osteocytes and has a high bone specificity, on cancer bone metastasis. In a mouse model, only bone metastases of cancer cells responsive to canonical Wnt ligands were significantly increased by treatment with anti-sclerostin antibodies. A significant increase in the number of osteoclasts was also observed. In addition, canonical Wnt ligands promoted sphere formation of canonical Wnt ligand-responsive cancer cells. These results suggest that sclerostin blockade activates canonical Wnt signaling in canonical Wnt ligand-responsive cancer cells, thereby promoting their bone metastases by enhancing stem cell-like properties and osteoclastogenesis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん転移 スクレロスチン

## 1. 研究開始当初の背景

Wntシグナル伝達経路は、臓器の発生や恒常性維持、組織再生、疾患の発症をはじめとする多くの生命現象において重要な役割を果たすことが知られている。代表的なWntシグナル経路の一つである古典的経路では、 $\beta$ -カテニンの分解抑制・核内移行の結果、標的遺伝子の転写が誘導される。古典的Wntシグナルは、骨においては骨芽細胞分化および骨形成を強力に促進する。また、がんの形成・進展に対しても促進的に働くことが報告されている。

SOST遺伝子によってコードされる分泌タンパクであるスクレロスチンは、Wntリガンドと受容体LRP4/5/6との結合を阻害することにより、古典的Wntシグナルを抑制する。主として骨細胞から産生されることから、極めて骨に特異性の高いWntシグナル制御因子である。スクレロスチンが古典的Wntシグナル抑制を介して骨形成を低下させるとの知見にもとづき、抗スクレロスチン抗体製剤が骨粗鬆症の治療薬として開発・認可され、現在、臨床的に広く使用されている。

骨は肺、肝に次ぐがん転移の好発臓器である。骨転移の成立・進展には骨微小環境とのクロストークが重要であることが示されている。しかしながら、骨に特異性の高い液性因子であるスクレロスチンの骨転移に対する関与については詳細な検討が行われていない。骨芽細胞の分化・活性化の制御に関する所見から、骨微小環境では、古典的Wnt経路を活性化するWntリガンドとスクレロスチンの相互作用が、骨転移をコントロールしている可能性が考えられる。

以上の背景から、スクレロスチンはがん骨転移の成立・進展に対して臓器特異的な作用を有することが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨に特異性の高いサイトカインであるスクレロスチンの骨転移特異的な作用を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨転移がん細胞の古典的 Wnt に対する活性化解析

古典的 Wnt シグナルを活性化することが知られているリガンド (= 古典的 Wnt リガンド) に対するマウスモデルにおいて骨転移を形成することが知られているがん細胞 (= 骨転移がん細胞) の反応性について、TCF reporter plasmid を用いたリポーターアッセイ (= TOPFlash assay) および古典的 Wnt シグナルの代表的な転写産物の一つである Axin2 の発現変化の real-time PCR により検討した。

### (2) 骨転移がん細胞における古典的 Wnt シグナルに関わる受容体とリガンドの発現

骨転移がん細胞における古典的 Wnt シグナル受容体 (FZD1 ~ FZD10, LRP5, LRP6)、古典的 Wnt リガンド (Wnt1, Wnt3a 他全 19 種類)、そして古典的 Wnt シグナル阻害分子 (スクレロスチン、DKK-1) の発現を RT-PCR にて検討した。

### (3) マウス骨転移モデルにおけるスクレロスチンの機能解析

骨転移に対するスクレロスチンの作用を明らかにするために、スクレロスチン欠損マウスにおける骨転移形成、骨転移形成に対する抗スクレロスチン抗体の作用を検討した。同様の方法で、スクレロスチン

チンの原発腫瘍に対する作用についても検討した。

また、骨転移巣における古典的 Wnt シグナルの活性化について  $\beta$ -カテニンの発現を指標に評価した。また、破骨細胞数についても解析した。

#### (4) 古典的 Wnt リガンドの骨転移がん細胞の増殖、遊走に対する作用

骨転移がん細胞の増殖、遊走に対する古典的 Wnt リガンドの作用について、WST-8 assay および wound healing assay にて解析した。

#### (5) 古典的 Wnt リガンドのがん幹細胞様形質に対する作用

骨転移がん細胞の幹細胞様形質に対する古典的 Wnt リガンドの作用について、浮遊培養系での sphere 形成能にて評価した。

#### (6) 骨転移がん細胞によるスクレロスチン発現の制御

骨転移がん細胞の培養上清を、スクレロスチン発現が確認されているラット骨芽細胞系細胞株 UMR106 に添加し、スクレロスチンの発現を real-time PCR にて評価した。また、原発腫瘍および骨転移を有するマウスの血漿中および骨髄液中のスクレロスチン濃度を ELISA にて測定した。さらに、骨転移巣におけるスクレロスチンの発現を免疫組織化学的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 骨転移がん細胞の古典的 Wnt に対する活性化解析

古典的 Wnt シグナルを活性化することが知られている代表的なリガンドである Wnt3a に対する骨転移がん細胞の反応性について検討したところ、著明な反応性を示すがん細胞がある一方、全く反応性を示さない細胞も存在し、Wnt3a に対する反応性はがん細胞間で大きく異なることが示された。その際、TOPFlash assay と Axin2 の発現変化の結果は一致していた。

### (2) 骨転移がん細胞における古典的 Wnt シグナルに関わる受容体とリガンドの発現

古典的 Wnt シグナル受容体および古典的 Wnt リガンドについては、検討した骨転移がん細胞において、様々な発現レベル、発現パターンが認められた。しかし、(1)でみられた Wnt3a に対する反応性の差異の原因については明らかにされなかった。DKK-1 については、発現レベルは異なるものの、全ての細胞で発現が認められた。一方、スクレロスチンはいずれの細胞においても発現が認められなかった。

### (3) マウス骨転移モデルにおけるスクレロスチンの機能解析

マウス乳がん細胞 (E0771/Bone) + スクレロスチン欠損マウス:スクレロスチン欠損マウスの背景が C57BL/6 であるため、同系統由来のマウス乳がん細胞株 E0771/Bone を用い、移植実験を行った。しかし、野生型マウスとの比較で骨転移形成に有意な差は認められなかった。原発腫瘍の増殖にも差はみられなかった。

マウス乳がん細胞 (4T1) + 抗スクレロスチン抗体:マウス乳がん細胞株 4T1 を BALB/c マウスに移植し、抗スクレロスチン抗体の作用を検討したが、骨転移形成に対して抗体投与の有意な効果は認められなかった。原発腫瘍の増殖に対しても同様であった。なお、本実験ではヒト化抗スクレロスチン抗体 romosozumab を用いた。ヒト化抗体をマウスに投与した場合には抗抗体抗体

が産生されることによる作用の減弱が懸念される。我々は予備実験において romosozumab がマウスに対して少なくとも短期間の投与においては抗スクレロスチン作用を有することを確認している。

ヒト乳がん細胞(MDA-MB-231) + 抗スクレロスチン抗体:ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 をヌードマウスに移植し、抗スクレロスチン抗体の作用を検討した。その結果、  
の実験とは異なり、抗スクレロスチン抗体は骨転移を有意に増加した。

~ のいずれの組合せにおいても、原発腫瘍の増殖に対して差異は認められなかった。

骨転移巣のがん細胞における  $\beta$ -カテニンは、  
のモデルにおいてのみ抗スクレロスチン抗体投与により発現増加が認められた。すなわち、抗スクレロスチン抗体によるスクレロスチンの阻害によりがん細胞の古典的 Wnt シグナルが活性化されたことが示唆される。

骨転移巣における破骨細胞数においても、  
のモデルにおいてのみ抗スクレロスチン抗体投与により増加が認められた。in vitro で MDA-MB-231 細胞に Wnt3a を添加した際に DKK-1 の発現上昇が認められ、破骨細胞数の増加の一因と考えられる。

(4) 古典的 Wnt リガンドの骨転移がん細胞の増殖、遊走に対する作用

いずれの骨転移がん細胞においても、Wnt3a は細胞増殖および遊走に対して影響を与えなかった。

(5) 古典的 Wnt リガンドのがん幹細胞様形質に対する作用

Wnt3a の sphere 形成に対する作用について検討したところ、古典的 Wnt リガンドに対して反応性を示した細胞のみにおいて sphere 形成の増加が認められた。

(6) 骨転移がん細胞によるスクレロスチン発現の制御

骨転移がん細胞の培養上清を UMR106 細胞に添加したところ、スクレロスチンの発現が著明に低下した。今回使用した骨転移がん細胞はいずれもスクレロスチン産生を低下させることが知られている副甲状腺ホルモン関連タンパク(PTHrP)を産生することが確認され、スクレロスチン発現低下の一因と考えられる。また、原発腫瘍および骨転移を有するマウスの血漿中および骨髄液中のスクレロスチン濃度については、原発腫瘍担がんマウスの骨髄液のみにおいてスクレロスチン濃度の有意な低下が認められた。また、免疫組織化学的解析においては、骨転移巣において転移がん細胞に近接する骨細胞のスクレロスチンの発現低下が認められた。よって、がん細胞はスクレロスチン発現を抑制することにより自らが生育しやすい環境を作り出している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yokoyama Ayako, Hasegawa Tomoka, Hiraga Toru, Yamada Tamaki, Yimin, Hongo Hiromi, Yamamoto Tomomaya, Abe Miki, Yoshida Taiji, Imanishi Yasuo, Kuroshima Shinichiro, Sasaki Muneteru, de Freitas Paulo Henrique Luiz, Li Minqi, Amizuka Norio, Yamazaki Yutaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Altered immunolocalization of FGF23 in murine femora metastasized with human breast carcinoma MDA-MB-231 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 810 ~ 823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01220-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraga Toru, Ito Susumu, Mizoguchi Toshihide	4. 巻 19
2. 論文標題 Opposing Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on the Initiation and Progression of Breast Cancer Bone Metastases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2110 ~ 2119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-21-0243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraga Toru, Horibe Kanji, Koide Masanori, Yamashita Teruhito, Kobayashi Yasuhiro	4. 巻 114
2. 論文標題 Sclerostin blockade promotes bone metastases of Wnt responsive breast cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2460 ~ 2470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15765	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平賀 徹
2. 発表標題 がん骨転移における転移ニッチ
3. 学会等名 第41回日本骨形態計測学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 何 治鋒、平賀 徹、石 莉楠、李 若萱、中道裕子、山下照仁、小出正則、宇田川信之、小林泰浩
2. 発表標題 マクロファージはLepR(+)細胞を活性化し、骨再生を促進する
3. 学会等名 第91回松本歯科大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 何 治鋒、溝口利英、平賀 徹、村上康平、中道裕子、山下照仁、小出雅則、宇田川信之、小林泰浩
2. 発表標題 マクロファージはLepR陽性細胞を活性化し骨再生を促進する
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平賀 徹、溝口利英
2. 発表標題 顆粒球コロナー刺激因子は乳がん骨転移の開始と進展に対し相反する作用を示す
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 何 治鋒、溝口利英、平賀 徹、中道裕子、山下照仁、小出雅則、宇田川信之、小林泰浩
2. 発表標題 マクロファージはLepR陽性細胞を活性化し骨再生を促進する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平賀 徹、堀部寛治、小出雅則、山下照仁、小林泰浩
2. 発表標題 スクレロステチンの阻害はWnt応答性乳がん細胞の骨転移を促進する
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 何 治鋒、石莉楠、李若萱、平賀 徹、中道裕子、宇田川信之、小林泰浩
2. 発表標題 F4/80(+);Csf1r(-)マクロファージはLepR(+)細胞を活性化し、骨再生を促進する
3. 学会等名 第95回松本歯科大学学会
4. 発表年 2023年

〔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
研究 分担者	小出 雅則  (Koide Masanori)  (10367617)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授   (33602)	
研究 分担者	山下 照仁  (Yamashita Teruhito)  (90302893)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授   (33602)	

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
---------	---------