

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17119

研究課題名（和文）乳がん骨転移ニッチにおける宿主BMP-3bの役割

研究課題名（英文）The role of BMP-3b in the bone metastatic niche with breast cancer

研究代表者

柳沼 樹 (Yaginuma, Tatsuki)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60845064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：TGF-スーパーファミリー関連因子において、BMP-3bと同様にBMP-3、BMP-2、ACVR2B、TGF- β 1の発現量が低いほど乳がんの死亡予後が有意に悪いことがわかった。BMP-3bは骨芽細胞に発現していた。BMP-3bのノックアウトマウスの骨を解析したところノックアウトで骨量が大きく、またノックアウト由来の骨芽細胞は野生型に比べて骨芽細胞分化能が有意に高かった。すなわち、BMP-3bは骨芽細胞系細胞の骨形成を抑制することで骨量を負に制御している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ)はビスホスホネート製剤や抗RANKL抗体などの骨吸収抑制薬使用による有害事象である。MRONJの誘因としては乳がんなど骨転移や、それに伴う疼痛緩和のために骨吸収抑制剤が投与されているケースが多い。本研究から、乳がんの骨転移メカニズムの一端が明らかになり、将来的に骨代謝回転を低下させることなく骨転移をコントロールできるようになれば、MRONJの発症を減らすことが可能となり、MRONJの解決に大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：In the TGF- β superfamily-related factors, lower expression of BMP-3, BMP-2, ACVR2B, and TGF- β 1 as well as BMP-3b was associated with worse mortality of breast cancer, and BMP-3b was expressed in osteoblasts. BMP-3b knockout mice increased bone mass and knockout-derived osteoblasts had high capacity of osteoblast differentiation than wild-type. In other words, BMP-3b may negatively regulate bone mass by suppressing osteogenesis of osteoblast lineage cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：BMP-3b 乳がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) 誘因として、乳がんの骨転移のコントロールのために骨吸収抑制剤が投与されているケースが多い。

(2) 乳がんにより死亡に至る原因は、ほぼ例外なく遠隔臓器への転移で、特に骨への転移は最も一般的であり、転移性乳がんの女性の最大 80%に見られる。乳がんが骨転移しやすい理由として血流に乗り骨へたどり着いた乳がん細胞にとって骨が定着・生存・発育に適しているからである。今回このがんの骨転移成立におけるがん細胞と宿主の骨が織りなす微小環境を「骨転移ニッチ」と呼ぶこととする。乳がんの骨転移のほとんどは治療不能で、痛み、骨破壊、高カルシウム血症、衰弱性の骨格関連事象などの重篤な症状を惹きおこす。よって乳がん治療においては骨転移の制御が重要な戦略となっている。

(3) TGF- β , Activin, BMP などのサイトカインは TGF- β スーパーファミリー (SF) に属し、乳がんなどの悪性腫瘍に対して増殖、浸潤、転移などをコントロールする。TGF- β SF に属するサイトカインは、がん細胞自身からも分泌されるが、宿主の骨芽細胞や骨髄間葉系幹細胞から分泌され、骨基質に豊富に蓄えられている。そのため、乳がんの骨転移ニッチにおいて骨基質から供給される豊富なこれらサイトカインにより大きく影響を受ける。例えば TGF- β シグナルを受容した乳がん細胞は PTHrP を分泌し、分泌された PTHrP がさらに骨芽細胞に作用することで RANKL-RANK interaction を介して破骨細胞が分化・活性化し、骨吸収を促進することで乳がん細胞に“すみか”としてのスペースを提供する。

(4) BMP-3b は 1996 年に TGF- β SF に属するサイトカインとしてラットの大腿骨から同定された。その後、骨、脂肪、中枢神経などにおいてその生理的機能が研究されてきた。また、BMP-3b は小細胞肺癌、非小細胞肺癌、悪性胸膜中皮腫、肺扁平上皮がんなどの悪性腫瘍との関連が報告されている。最近になって、BMP-3b と口腔がん、さらに乳がんの EMT と関連が報告されるなど、“BMP-3b とがん”はまさにホットなテーマであるが、依然として“BMP-3b とがん骨転移”に着目した研究は皆無である。さらに実は、In vivo の骨における BMP-3b の機能も全くわかっていない。

2. 研究の目的

(1) In vivo の骨組織における BMP-3b の役割を解明する。

(2) 乳がんにおける BMP-3b の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 乳がん細胞を用いた実験：細胞はヒト乳がん細胞株 MCF-7、マウス乳がん細胞株 4T-1 を用いた。Cell counting kit-8 を用いて細胞増殖能を経時的に検討した。BMP-3b 刺激を行った細胞と control 細胞を比較した。BMP-3b 刺激後 48 時間後のタンパク質を回収し、上皮マーカーとして E-cadherin、間葉マーカーとして Vimentin の抗体を用いてウェスタンブロットで発現量をそれぞれ検討した。BMP-3b 刺激後、リン酸化 Smad3, Smad2/3 の抗体を用いて発現量を検討した。

(2) TCGA 解析：Human Protein atlas (<https://www.proteinatlas.org>) を通じて TCGA (The Cancer Genome Atlas) にアクセスし利用した。乳がん患者 1075 名と腫瘍における各 mRNA の亜発現量 (FPKM) と予後の関係を示すデータを得た。解析遺伝子として BMP-3b, BMP-3b と近縁の BMP-3, 骨形成 BMP である BMP-2 と BMP-4, BMP リガンドの受容体 BMPR1A, BMPR1B, BMPR-II, ACVR2B, BMP と同様に TGF- β SF に属する TGF- β 1, Activin のサブユニット INHA, そして受容体の TGFBR1 と TGFBR2 に着目し解析した。

(3) μ CT 解析：13 週齢雌の BMP-3b ノックアウトマウス (KO) の脛骨を μ CT 撮影を行い野生型マウス (WT) と比較した (n=5)。WT マウスの各種細胞から RNA を抽出し、それぞれに発現する BMP-3b の mRNA 量を Real-time PCR 法 (qPCR) で比較した。8 週齢雄 BMP-3b KO と WT から骨髄間質細胞 (BMSC) を採取し、アスコルビン酸と α -Glycerophosphate で骨芽細胞分化を誘導した。骨芽細胞分化の指標としてアルカリホスファターゼ (ALP) の活性を測定した。同様に Osterix, I 型コラーゲン, ALP, 骨シアロタンパクなどの骨芽細胞分化マーカーならびに BMP-3b の mRNA 量は qPCR で定量した。

4. 研究成果

(1) 乳がん細胞株における BMP-3b と増殖能: MCF-7 では, 刺激後 7 日後でコントロールに比べ, BMP-3b で刺激した細胞の方が有意に細胞増殖能の低下を認めた. 4T-1 では刺激後 48 時間でコントロールに比べ BMP-3b で刺激した細胞の方が, 有意に細胞増殖能の低下を認めた.

(2) 乳がんにおける BMP-3b と移動能: MCF-7 では刺激後 7 日でコントロールに比べ BMP-3b で刺激した細胞の方が有意に細胞移動能の低下を認めた. MCF-7 では刺激後 48 時間でコントロールに比べ BMP-3b で刺激した細胞の方が有意に細胞移動能の低下を認めた.

(3) 乳がん細胞株における BMP-3b と上皮性質: MCF-7, 4T-1 とともにコントロールに比べ BMP-3b 刺激において E-cadherin の発現上昇, Vimentin の発現低下を認めた.

(4) 乳がん細胞株における BMP-3b と Smad3 のリン酸化: 4T1 において TGF- β 刺激後 30 分でリン酸化 Smad3 の発現ピークを迎えた TGF- β と BMP-3b とともに刺激した細胞では刺激後 10 分でリン酸化 Smad3 の発現ピークを迎えた. また, TGF- β と BMP-3b とともに刺激した細胞では TGF- β 単独刺激細胞に比べリン酸化 Smad3 の発現量が低下していた.

(5) BMP-3b を含めた TGF- β 関連遺伝子の発現レベルと生命予後: を利用したデータベース解析から, 乳がん細胞において BMP-3b, BMP-3, BMP-2, ACVR2B, TGF- β 1 の発現量が低いほど予後が有意に悪かった. それとは逆に INHA と TGFBR1 では発現量が高いほど予後が不良であった (図 1).

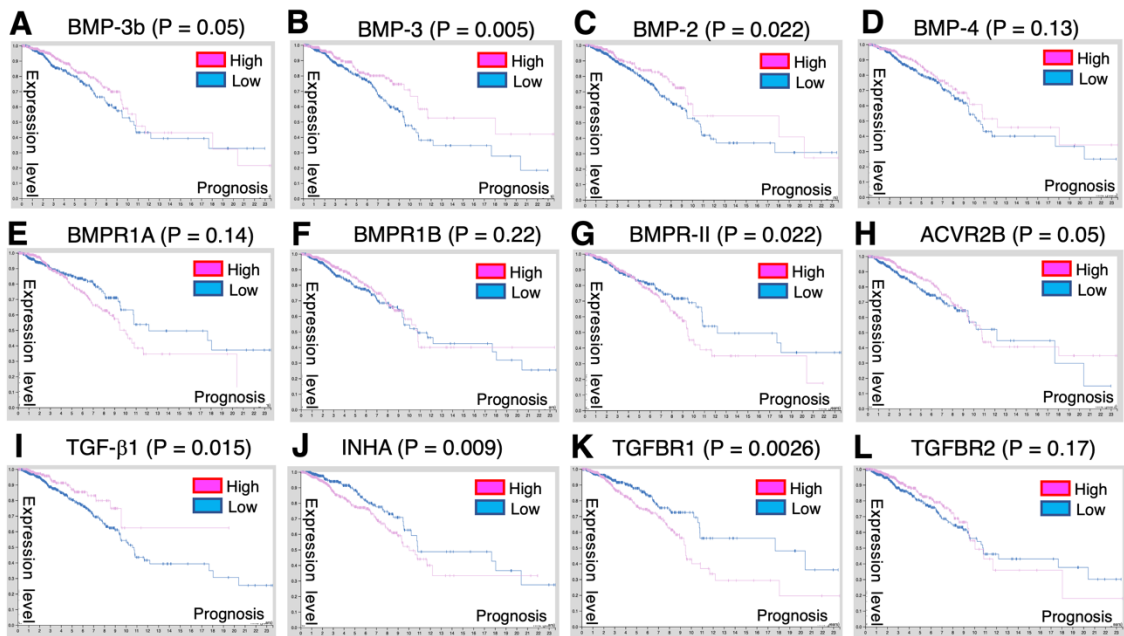


図1: 乳がん患者における各遺伝子の発現量と生存率の関係

(6) BMP-3b KO の骨フェノタイプ: BMP-3b KO の骨量は優位に大きかった (図 2). BMP-3b の発現量は BMSC の分化と共に上昇したが, 破骨細胞にはほとんどなかった. また BMP-3b KO 由来 BMSC では WT 由来 BMSC と比較して ALP 活性や骨芽細胞分化マーカー発現が上昇していた. 以上より BMP-3b は骨芽細胞系細胞の骨形成を抑制することで骨量を負に制御している可能性がある.

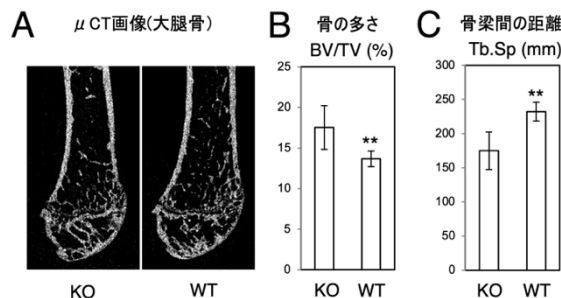


図2: BMP-3b KO の骨フェノタイプ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柳沼樹、水田奏、松原琢磨、吉賀大午、笹栗正明、吉岡泉、古株彰一郎、富永和宏
2. 発表標題 乳がん細胞の細胞増殖、移動能に関するBMP-3bの役割
3. 学会等名 第76回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 1.水田 奏, 松原 琢磨, 後藤 晶乃, 宮脇 有希, 野島 淳也, 佐藤 毅, 柳沼 樹, 吉賀 大午, 富永 和宏, 吉岡 泉, 古株 彰一郎
2. 発表標題 がん遺伝子Src結合分子Plectinは悪性黒色腫の増殖, 移動および接着を制御する
3. 学会等名 第75回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuta K, Matsubara T, Addison, W., Yaginuma T, Yoshioka I, Kokabu S
2. 発表標題 PLECTIN, a SRC oncogene-binding protein, promotes the growth and adhesion of malignant melanoma via regulation of SRC activity.
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuta K, Matsubara T, Addison W, Yaginuma T, Yoshioka I, Kokabu S
2. 発表標題 Oncogene Src binding protein Pectin control regulates growth of malignant melanoma by activation of oncogene Src.
3. 学会等名 International Association of Dental Research (IADR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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