

## 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 21日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659078

研究課題名（和文）血管内皮細胞の内皮間葉移行による癌細胞の骨親和性獲得メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of bone metastasis of tumor cells by endothelial-mesenchymal transition of vascular endothelial cells.

研究代表者

津田 真寿美（TSUDA MASUMI）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30431307

研究成果の概要（和文）：高頻度に骨転移を引き起こすヒト滑膜肉腫細胞と口腔癌細胞を用いて、血管内皮細胞との相互作用を検討した結果、滑膜肉腫細胞では Src 依存的な VEGF 発現誘導によって、また口腔癌細胞では腫瘍組織特異的な RANKL 発現誘導によって、血管内皮細胞が腫瘍組織内へと導引されることが明らかとなった。また、腫瘍微小環境を模倣した *in vitro* 3次元培養系において、滑膜肉腫細胞は血管内皮細胞（HUVECs）が形成する管腔構造に積極的に浸潤し、HUVECs は間葉系細胞様へと形態変化を遂げた後、マトリゲル上での運動能を亢進させ、結果として腫瘍細胞と HUVECs が一体化した異常な管腔構造を形成した。

研究成果の概要（英文）：We clarified that human synovial sarcoma and oral cancer cells induced vascular endothelial cells into the tumors by Src-dependent VEGF production and oral environment specific induction of RANKL, respectively. In addition, using *in vitro* 3D culture system we have established, synovial sarcoma cells aggressively invaded into the tubes formed by HUVECs, leading to the morphological alterations like endothelial-mesenchymal transition in HUVECs, resulted in the aberrant tube formation combined with synovial sarcoma cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：腫瘍生物学、実験病理学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：血管内皮細胞、内皮間葉移行、腫瘍微小環境、骨転移

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年増加傾向にある乳癌、前立腺癌、肺癌には、腫瘍発生後比較的早期から骨転移・骨浸潤が高頻度に出現する特徴がある。これら骨病変の存在は患者の生活予後及び生命予後を著しく増悪させるため、癌の骨転移・骨浸潤抑制

法の確立は極めて重大かつ急務の課題であるが、なぜこれらの癌が骨転移を起こしやすいかすら未だ明らかではない。

(2) 最近、腫瘍血管内皮細胞が内皮-間葉転換による脱分化の後、骨・軟骨細胞へ再分化して腫瘍組織の石灰化を誘導するという現象が報

告された。これは、癌細胞と血管内皮細胞間の相互作用の結果、血管内皮細胞が作りだした骨類似環境によって、癌細胞が原発巣にいながらにしてすでに高骨親和性を獲得するようにプログラミングされる可能性を示唆している。

(3) 一方、腫瘍血管は、癌細胞と血管内皮細胞の直接接合、および癌細胞が分泌するサイトカインや増殖因子等によってその形質を大きく変化させ、正常血管とは異なる管腔構造を形成していることが明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

上記のような背景を受け、本研究では、血管内皮細胞と癌細胞の相互作用の分子メカニズムを解明するとともに、この相互作用を標的とする新規コンセプトの癌骨転移・骨浸潤抑制法開発に向けた布石を投じることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 癌細胞と血管内皮細胞の相互作用の分子メカニズムの解明

癌細胞と血管内皮細胞の相互作用の分子メカニズムを解明するため、臨床的に高頻度に骨転移・骨浸潤を引き起こすヒト滑膜肉腫細胞と口腔癌細胞を研究対象とした。

[ヒト滑膜肉腫]

① ヒト滑膜肉腫細胞 Fuji が血管内皮細胞 HUVECs を誘導する能力を有しているかを、Transwell chamber を用いた migration assay によって検討した。

② Fuji 細胞における VEGF mRNA 発現量 (real-time PCR 法) と培養上清への分泌量 (ELISA) を解析した。また、それらが Src ファミリーキナーゼ (SFK) によって制御されているかを、SFK 特異的阻害剤 SU6656 を用いて検討した。

③ ノードマウスの皮下に Fuji 細胞を接種し、SU6656 の腹腔内投与によって腫瘍の形成および腫瘍血管新生が抑制されるかを検討した。

[ヒト口腔癌]

① 骨転移・骨浸潤に関連する破骨細胞分化因子 RANKL が、ヒト口腔癌組織で発現しているかを免疫組織学的検索により検討した。

② ヒト口腔癌細胞株 HSC-3 を用いて、*in vitro* での RANKL の発現量を解析し、ヒト口腔癌組織における発現量と比較した。

③ RANKL 過剰発現 HSC-3 細胞株を樹立し、マウスの後肢筋内に接種後、腫瘍の形成能力と腫瘍血管の新生を、コントロール群と比較検討した。

④ RANKL 過剰発現 HSC-3 細胞が血管内皮細胞 HUVECs を導引できるかを Transwell chamber を用いた migration assay によって検討した。さらに、RANKL の decoy receptor である OPG、あるいは抗 VEGF 抗体によって HUVECs の migration が抑制されるか否かを検討した。

(2) ヒト腫瘍環境を模倣した *in vitro* 3 次元培養系の構築と癌細胞-血管内皮細胞相互作用の解明

血管内皮細胞を標的とした癌の骨転移・骨浸潤抑制法の開発を考える時、腫瘍細胞と血管内皮細胞との相互作用を分子レベルまで詳細に理解することが必須であり、そのためにはヒト腫瘍組織に近い状態を模倣した *in vitro* 3 次元培養系を構築する必要がある。そこで、各腫瘍組織に豊富な細胞外基質を含むゲル内での癌細胞と血管内皮細胞の 3 次元共培養系を構築し、バイオイメージング技術を活用して、癌細胞-血管内皮細胞のダイナミックな相互作用を時空間情報と共に解析する。

① *in vitro* 3 次元培養系での血管内皮細胞と腫瘍細胞の相互作用のイメージング

3 次元マトリゲル上で血管内皮細胞 HUVECs を管腔形成させた後、臨床的に高頻度に骨転移を引き起こす GFP 標識滑膜肉腫細胞 Fuji を播種し、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いて、血管内皮-腫瘍細胞間の相互作用を時空間的に検討した。

② 腫瘍細胞と血管内皮細胞の相互作用における Src ファミリーキナーゼ阻害剤の効果

① で観察された腫瘍細胞と HUVECs の相互作用が、Src ファミリーキナーゼ阻害剤 SU6656 の処理によって、どのように変化するかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 癌細胞と血管内皮細胞の相互作用の分子メカニズムの解明

癌細胞と血管内皮細胞のどのような相互作用が腫瘍血管新生を惹起するのか、その詳細な分子メカニズムを解析した。

[ヒト滑膜肉腫]

① 「臨床的に高頻度に骨転移を引き起こす滑膜肉腫細胞 Fuji の培養上清によって、血管内皮細胞 HUVECs を遊走させることが可能であった。

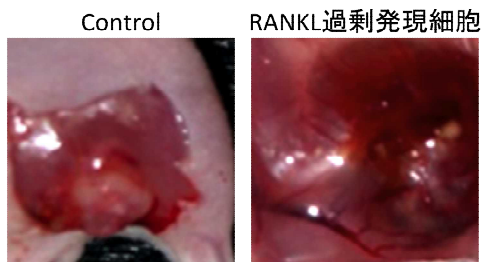
② 「Fuji 細胞は、VEGF mRNA を発現し、さらに培養上清中に大量の VEGF を分泌していることが明らかとなった。また、腫瘍細胞の SFK を SU6656 により活性抑制することにより、Fuji 細胞からの VEGF 発現、および HUVECs

の遊走を有意に抑制した。

- ③ 「 SFK 阻害剤 SU6656 をマウスの腹腔内へ投与したマウスでは、腫瘍血管新生が有意に抑制されると同時に、腫瘍の体積及び重量も著明に減少した。
- ④ 「 以上より、高頻度に骨転移を引き起こす滑膜肉腫において、腫瘍細胞の Src ファミリーキナーゼ活性依存的に発現分泌する VEGF により、血管内皮細胞が腫瘍組織へ積極的に導引され、腫瘍の形成に寄与していることが明らかとなった。

[ヒト口腔癌]

- ① ヒト口腔癌組織において、腫瘍細胞での破骨細胞分化因子 RANKL の発現は、腫瘍の分化度と有意に相関した。
- ② ヒト口腔癌細胞株における RANKL mRNA の発現量は、口腔癌組織に比較して著しく低レベルであった。しかし、これらの細胞株をマウスの口筋内に接種し、腫瘍を形成させた所、RANKL の発現が著しく増加した。
- ③ RANKL 過剰発現口腔癌細胞株 HSC-3 をマウスの後肢筋層内に接種したところ、コントロール細胞を接種した腫瘍と比較して、血管が豊富な大きな腫瘍を形成した。



- ④ RANKL 過剰発現口腔癌細胞株 HSC-3 の培養上清に、RANKL の decoy receptor である OPG、あるいは抗 VEGF 抗体を処理し、migration assay を施行したところ、OPG 処理でのみ HUVECs の遊走能が有意に抑制された。
- ⑤ 以上より、高頻度に骨浸潤を引き起こす口腔癌では、癌細胞が分泌する破骨細胞分化因子 RANKL 依存的に血管内皮細胞が腫瘍組織へ導引されることが明らかとなった。この RANKL の発現は *in vitro* 実験環境下では観察されず、*in vivo* マウス口腔環境下で初めて誘導されることから、癌細胞と周囲微小環境との相互作用が RANKL の誘導に重要であると示唆される。

以上より、腫瘍組織における腫瘍血管新生は、腫瘍の種類によって異なる分子メカニズムによって制御されていることが明らかとなった。

(2) ヒト腫瘍環境を模倣した *in vitro* 3次元培養系の構築と癌細胞-血管内皮細胞相互作用の解明

腫瘍血管は、腫瘍細胞との直接接触や腫瘍細胞が分泌するサイトカインや増殖因子等によってその形質を大きく変化させ、正常血管とは異なる管腔構造を獲得する。そこで、生体内腫瘍組織を模倣した *in vitro* 3次元培養系を構築し、癌細胞と血管内皮細胞間で生じる相互作用を観察、その後どのような管腔構造変化が惹起されるかを解析した。

- ① GFP 標識滑膜肉腫細胞 Fuji は HUVECs が形成する管腔内に積極的に浸潤した。一方、HUVECs は間葉系細胞様へと形態変化を遂げた後、マトリゲル上での運動能を亢進させ、結果として HUVECs と腫瘍細胞が一体化した異常な管腔構造を形成した。
- ② Src ファミリーキナーゼ (SFK) 阻害剤 SU6656 は、滑膜肉腫細胞 Fuji や HUVECs の Src の活性を抑制すると同時に、腫瘍細胞からの VEGF 産生を抑制し、HUVECs の間葉転換や腫瘍細胞を含んだ管腔形成を著しく抑制した。

近年、骨に存在する破骨細胞において、Src が活性化状態にあることが報告されており、腫瘍細胞・血管内皮細胞・破骨細胞の恒常的な Src の活性化によって生じる相互作用が、腫瘍の骨転移の成立に重要な役割を果たしていることが示唆される。以上より、Src は癌の骨転移・骨浸潤を抑制するための有効な治療標的分子となり得ると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Arai R, Tsuda M, Watanabe T, Ose T, Obuse C, Maenaka K, Minami A, Ohba Y. Simultaneous inhibition of Src and Aurora kinases by SU6656 induces therapeutic synergy in human synovial sarcoma growth, invasion and angiogenesis *in vivo*. *Eur J Cancer*. 2012:Epub ahead of print. 【査読有】
2. Yamada T, Tsuda M, Takahashi T, Totsuka Y, Shindoh M, Ohba Y. RANKL expression specifically observed *in vivo* promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression. *Am J Pathol*. 2011;178; 2845-56. 【査読有】
3. Mizutani T, Kondo T, Darmanin S, Tsuda M, Tanaka S, Tobiume M, Asaka M, Ohba Y. A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its

response to drugs in living cells. *Clin Cancer Res.* 2010;16; 3964-3975. 【査読有】

研究者番号：

〔学会発表〕（計 15 件）

1. Wagatsuma T, Yamada T, Tsuda M, Fujioka Y, Kaibara T, Totsuka Y, Shindoh M, Ohba Y. RANKL upregulates integrin  $\alpha 2$  expression and cell adhesion in oral cancer cells. 第 34 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜. 2011 年 12 月 16 日
2. Arai R, Tsuda M, Watanabe T, Ose T, Obuse C, Maenaka K, Minami A, Ohba Y. SU6656 suppresses human synovial sarcoma progression through Src and Aurora kinase inhibition. 第 34 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜. 2011 年 12 月 14 日
3. Tsuda M, Arai R, Watanabe T, Ose T, Obuse C, Maenaka K, Minami A, Ohba Y. Dual inhibition of Src and Aurora kinases abrogates tumor growth, invasion, and angiogenesis of synovial sarcoma in vivo. 第 70 回日本癌学会総会. 名古屋国際会議場. 2011 年 10 月 4 日
4. 山田珠希、津田真寿美、戸塚泰則、進藤正信、大場雄介. RANKL 発現は腫瘍形成と EMT を亢進する. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場. 2010 年 9 月 24 日
5. 山田珠希、津田真寿美、進藤正信、戸塚泰則、大場雄介. RANKL は微少環境特異的に発現し細胞接着・EMT・腫瘍形成を促進する生体内特異的機能マーカーである. 第 62 回日本細胞生物学会. 大阪国際会議場. 2010 年 5 月 20 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hokudai.ac.jp/~clilab-w/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津田 真寿美 (TSUDA MASUMI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30431307

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )