

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791497

研究課題名（和文）

マウス正所性前立腺癌骨転移モデルの作成

研究課題名（英文）

Establishing orthotopic model of prostate cancer metastasis to bone in mice

研究代表者

金井 邦光 (KANAI KUNIMITSU)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80365361

研究成果の概要（和文）：

マウス前立腺癌細胞株TRAMP-C1にルシフェラーゼ発現遺伝子を遺伝子導入したTRAMP-C1/CBRを作成し、mesenchymal stem cell (MSC) を併用して、マウスに正所性に細胞を移植させ、腫瘍の生着および遠隔転移について検討を行った。ヌードマウス (BALB/c nu/nu) ではTRAMP-C1/CBR細胞の正着率は良好で、Luciferinへの反応も概ね良好であった。癌細胞とMSCを同時に移植することで、細胞の局所での浸潤能は増強されたが、残念ながら明らかな骨への転移は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：

TRAMP-C1 is derived from a prostate adenocarcinoma in transgenic C57BL/6 mice. TRAMP-C1/CBR cells were genetically modified to express the luciferase gene. Nude mice (BALB/c, nu/nu) were anesthetized and received injection of TRAMP-C1/CBR cells with/without mesenchymal stem cells (MSC) in the prostatic lobe through a midline lower abdominal incision. To detect cancer development in mice, we used bioluminescence imaging. In orthotopic model, we generally detected a hot spot of bioluminescence in lower abdomen of mice. By the combination injection of TRAMP-C1 and MSC, the local hot spot was remarkably enlarged, however, we could not confirm the hot spot to prove the bone metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、骨転移モデル

1. 研究開始当初の背景

欧米諸国において前立腺癌は男性の癌罹患率第一位および死亡率第二位を占めており、我が国においても近年では罹患数、死亡数は着実に増加傾向を示している。進行性前立腺癌においては骨転移を生じることが多

く、内分泌療法が奏効しなくなり治療抵抗性となった場合、癌の進展・骨転移の悪化が進行性前立腺癌の生存率およびQOLの改善に対する最大の障害となっていることは疑いの余地はない。

臨床現場において前立腺癌骨転移による

脊髄圧迫による急性麻痺症状は緊急の処置を要し、また患者のQOLを著しく悪化させることがある。そのため前立腺癌における骨転移のメカニズムの解明、治療標的の同定および新たな治療法の開発は急務の課題といえる。

2. 研究の目的

前立腺癌の転移には特徴がある。それは転移先として実質臓器ではなく骨が最も多いことである。正常の生理条件下では、骨リモデリングの過程は破骨細胞活性の上昇に始まり、その後に骨芽細胞（造骨）活性が誘導されて骨の成熟が起こる。結果として骨芽細胞により骨新生と骨吸収が起こる。前立腺癌ではホルモン療法が長期間にわたり行われていることが多く、骨量の減少が起こりやすい。さらに骨転移巣では癌細胞は骨病変でのミネラル放出と骨基質の再吸収を惹起する。この機序として癌細胞からPTHrPなどの因子が破骨細胞や骨芽細胞に分泌されこれらの細胞が刺激を受ける。骨芽細胞においてはreceptor activator of nuclear factor B ligand (RANKL) の発現を誘導しRANKLは破骨細胞にあるRANKを活性化する。その後、破骨細胞は骨吸収を起こし骨からIGFやTGF-などの増殖因子を分泌し、これが再び癌細胞を活性化する。活性化された癌細胞は更にPDGF-BBなどの増殖因子を分泌して骨芽細胞を刺激し新生骨形成を起こす。このようなサイクルにより前立腺癌の骨転移巣における骨強度の低下した造骨性変化が起こると考えられているが、骨転移の機序はまだ十分に解明されていない。更なる前立腺癌骨転移機序の解明として、マウス正所性前立腺癌骨転移モデルを作成し、生体内でどのような変化が起こり転移が生じているかを解明することを今回の研究テーマとした。

基礎実験における前立腺癌転移モデルとしては様々な方法での報告があるが、骨転移モデルとしてDirect injection model（脛骨内に癌細胞を直接注射する）が多く行われており、このモデルの特徴として他のモデル（intracardiac, orthotopic, intravenous）と比べ正着率が高い点が挙げられる。しかしながら、前立腺癌が前立腺から骨に転移する機序を解明していくには、骨に前立腺癌細胞を直接注射して骨に癌細胞を生着させるモデルでは不十分であると考ええる。

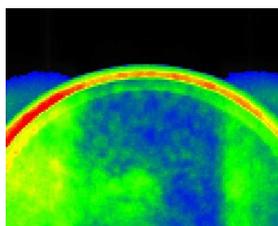
正所性モデルとしてはYang M, *et al.* (Cancer Res. 1999)、Thalmann GN, *et al.* (Cancer Res. 1994)、Thalmann GN, *et al.* (Prostate. 2000)などが報告しているが、腫瘍の生着・転移率は20-30%以下と低く、正所性転移モデルとして確立されたものがない現状から、正所性での前立腺癌骨転移モデルの作成を試みた。

3. 研究の方法

(1)

前立腺癌の基礎研究においては、ヒト前立腺癌細胞株としてPC-3(骨転移巣から樹立)、DU145(脳転移巣から樹立)、LNCaP(リンパ節転移から樹立)の3種が広く使用されており、マウス前立腺癌細胞株としてはTRAMP-C1(加齢に伴ってアンドロゲン依存性の前立腺癌を発現するTRAMPマウスから樹立)がある。ヒト前立腺癌細胞を単に前立腺に細胞移植してもなかなか転移をきたさないことは、以前の報告を参考にすると容易に想像できる。そこで腫瘍の生着率を高めるため同種性移植となるマウス前立腺癌細胞TRAMP-C1を使用することとした。またマウスが生存した状態のまま腫瘍の状態を評価するために、TRAMP-C1にルシフェラーゼ発現遺伝子を遺伝子導入したマウス前立腺癌細胞株TRAMP-C1/CBRを作成し、D-luciferin(125mg/kg)を腹腔内注射することでbioluminescence imaging systemを利用した。これにより画像上での腫瘍の進展状況が経時的に観察可能な状況とする。

【TRAMP-C1/CBR細胞の発光の確認】



- ┆ TRAMP-C1をC57 BL/6 マウスに正所性・異所性に移植し、腫瘍の生着について検討する。
- ┆ TRAMP-C1/CBRをC57 BL/6 マウスに正所性・異所性に移植し、腫瘍の生着およびluciferinへの反応について検討する。

(2)

Antoine E. *et al.* (Nature. 2007) はマウスにmesenchymal stem cell (MSC) と乳癌細胞株を一緒に移植することで転移能が促進されたことを報告している。これは乳癌細胞がMSCからchemokine CCL5の分泌を刺激され、その結果、浸潤・転移能が増強されたと報告している。CCL5の発現が上皮間葉転換(epithelial mesenchymal transition; EMT)に関与しており、EMTが生じることが癌の浸潤・転移をきたすメカニズムであることが指摘されている。原発巣の微小環境の変化として実際の臨床検体で腫瘍の浸潤部を詳細に観察すると、中心部が腺癌としての形態を維持し

ていても腫瘍の先進部では間葉系様細胞の部位が観察されることを当教室では腎細胞癌で確認している。このことを踏まえて、TRAMP-C1/CBR細胞単独で転移が確認できなかった場合は、TRAMP-C1/CBR細胞と一緒にMSCを移植して、転移モデルが作成できるかどうか検討を行う。MSCとしてはwild-typeのMSC (WT-MSC) とINK4をknockoutしたMSC (INK4^{-/-}-MSC) を使用する。

TRAMP-C1、TRAMP-C1/CBR、TRAMP-C1/CBR + MSC を C57 BL/6 マウスに正所性・異所性に移植し、腫瘍の生着および luciferin への反応について検討する。

(3)

ルシフェラーゼを含む細胞の増殖力が弱い傾向は、他癌である乳癌細胞株である 4T1 と 4T1 にルシフェラーゼ発現遺伝子を遺伝子導入した 4T1/CBR を用いた動物実験で経験している。しかしながらヌードマウス (BALB/c nu/nu) に 4T1/CBR 移植すると細胞の増殖力が保たれ、また luciferin での細胞の長期間の発光が保たれることを以前の実験で経験している。そのため上記で無効の場合は、ヌードマウスを使用する方針とする。

TRAMP-C1/CBR、TRAMP-C1/CBR + MSC をヌードマウス (BALB/c nu/nu) に正所性・異所性に移植し、腫瘍の生着および luciferin への反応について検討する。

4. 研究成果

(1)

TRAMP-C1 を C57 BL/6 マウスに正所性・異所性に移植し、腫瘍の生着について検討を行った (正所性: n=15、皮下: n=7、腹腔内: n=2)。12w の時点で皮下腫瘍の平均腫瘍径は 1655 mm³ と十分に腫瘍の生着は認められた。また正所性でも前立腺局所の増大を認めており生着率に問題はなかった。しかしながら肉眼的に明らかな転移の所見は認められなかった。

TRAMP-C1/CBR を C57 BL/6 マウスに正所性・異所性に移植し、腫瘍の生着および luciferin への反応について検討を行った (正所性: n=6、皮下: n=6、腹腔内: n=2)。TRAMP-C1/CBR 細胞の C57 BL6 マウスへの正着率は悪く、腫瘍の増殖スピードも TRAMP-C1 細胞の時と比べて明らかに遅かった (8w 時点での皮下腫瘍モデルでの比較; TRAMP-C1: 530 ± 219 mm³、TRAMP-C1/CBR: 56 ± 103 mm³)。また luciferin での発光も満足のいく結果で

はなかった。

(2)

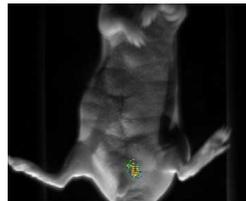
C57 BL6 マウスに TRAMP-C1/CBR 細胞と mesenchymal stem cell (MSC) を同時に移植した。MSC としては wild-type の MSC (WT-MSC) と INK4 を knockout した MSC (INK4^{-/-}-MSC) を使用した。正着は正所性・皮下モデルともに確認できたが、局所でゆっくりと増大していたものの増殖スピードは今一つであった (8w の時点での皮下腫瘍モデルでの比較; TRAMP-C1: 529.9 ± 218.9 cm³、TRAMP-C1/CBR: 56.3 ± 103.0 cm³、TRAMP-C1/CBR + WT-MSC: 84.8 ± 101.6 cm³、TRAMP-C1/CBR + INK4^{-/-}-MSC: 66.6 ± 49.5 cm³)。また 14w の時点では骨・肺などへの明らかな遠隔転移は認められなかった。腫瘍の増殖具合から C57 BL6 マウスを使用しての実験には限界が感じられた。

(3)

ヌードマウス (BALB/c nu/nu) を使用して、TRAMP-C1/CBR 細胞と MSC を同時に移植した。TRAMP-C1/CBR 細胞単独での移植、TRAMP-C1/CBR 細胞と WT-MSC or INK4^{-/-}-MSC を同時に移植した群では、いずれも腫瘍の正着は正所性・皮下モデルともに確認できた (8w の時点での皮下腫瘍モデルでの平均腫瘍径; TRAMP-C1/CBR: 329.1 cm³、TRAMP-C1/CBR + WT-MSC: 276.9 cm³、TRAMP-C1/CBR + INK4^{-/-}-MSC: 298.6 cm³)。また luciferin への反応も概ね良好であった。

【TRAMP-C1/CBR 正所性モデル】

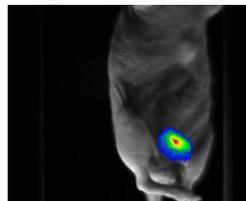
【3W】



【6W】



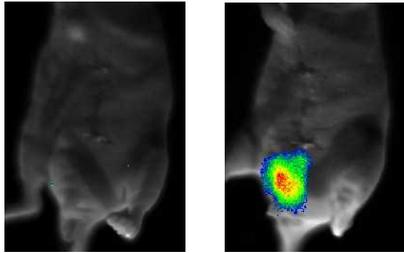
【12W】



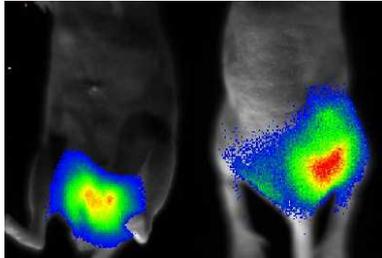
【TRAMP-C1/CBR + WT-MSC 正所性モデル】

【3W】

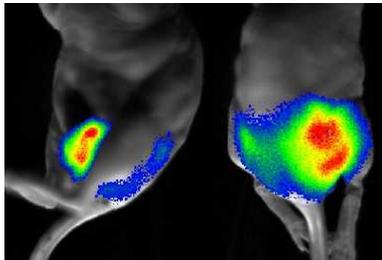
【5W】



【7W】

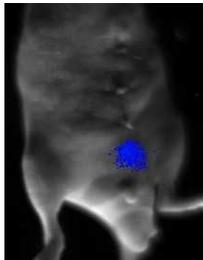


【11W】



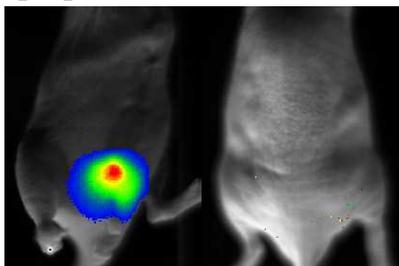
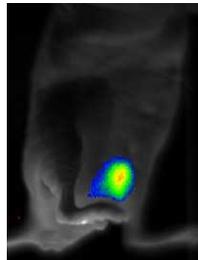
【TRAMP -C1/CBR + INK4^{-/-} MSC 正所性モデル】

【3W】

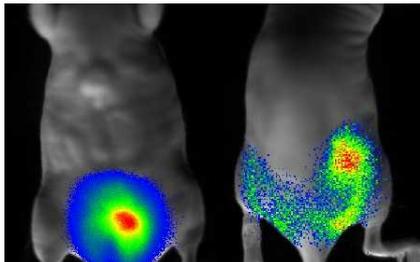


【7W】

【5W】



【10W】



TRAMP -C1/CBR + MSCの正所性での移植では、背面からの撮影でも発光を認めるものもあり、癌細胞にWT MSCあるいはINK4^{-/-} MSCを同時に移植することで、細胞の浸潤能については増強されていたが、骨・肺などへの明らかな遠隔転移は認められなかった。しかしながら移植後数週で前立腺からずれたところに発光を認めるものもあり、これについては転移というよりも移植の際に播種してしまった可能性が高いと考えられた。

正所性モデルの場合、侵襲に伴う移植後数日以内での死亡が、実験当初と比べると減ってはきているが、ある一定の確率で認められる点、正所性に移植をしたつもりでも、前立腺以外のところに移植している可能性がある点（前立腺の外側に細胞が漏れてしまっている可能性がある）等があり、正所性モデルとして確立するのは非常に困難であり、満足のいく結果は得られなかった。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 邦光 (KANAI KUNIMITSU)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80365361