

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592181

研究課題名(和文) ヒアルロン酸ネットワークをターゲットとした新規骨転移保存的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel conservative therapeutic modality for patients with bone metastasis focusing on hyaluronan network

研究代表者

西田 佳弘 (NISHIDA, Yoshihiro)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50332698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では乳癌・肺癌の骨転移モデルマウスを作成し、癌の骨転移巣においてヒアルロン酸が高発現し、その産生を抑えることと癌の骨転移が抑制されることを明らかにした。またヒアルロン酸合成抑制剤である4-MUは、骨転移治療としてすでに実施されているゾレドロン酸、放射線と相乗効果を示し、癌骨転移巣を抑制することを明らかにした。また骨に転移した癌細胞だけではなく、その周囲に存在する正常な細胞もヒアルロン酸を合成して癌の骨転移に有利な環境を提供していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established mouse bone metastasis model of breast and lung cancer, and revealed that metastatic lesion in bone had marked expression of hyaluronan in both malignant cells and stromal cells including tumor-associated fibroblasts. 4-Methylumbelliferone (4-MU), an inhibitor of hyaluronan synthesis significantly suppressed the hyaluronan synthesis of breast and lung cancer as well as stromal fibroblast, resulting in the suppression of metastatic lesion in bone. 4-MU also affected the cellular event via a suppression of hyaluronan synthesis, that co-localization of CD44, a cell surface receptor of hyaluronan, ezrin, and actin was abrogated by 4-MU.

4-MU had synergistic inhibitory effects on the progression of bone metastasis, with zoledronic acid, a bisphosphonate, which is allowed to use for patients with bone metastasis in Japan. 4-MU also had synergistic effects with radiotherapy, a conventional anti-bone metastatic treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：糖鎖 骨転移 ヒアルロン酸 保存的治療 遺伝子改変マウス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がん患者の多くが骨転移を発症し、疼痛、病的骨折などでQOLを著しく低下することから、がんの骨転移患者に対する侵襲の少ない新規治療法の確立は急務である。

(2) これまでのがん骨転移の研究は、がん細胞のみに焦点をあてた解析、あるいは破骨細胞の抑制を図る解析にとどまり、骨の微小環境とがん細胞のネットワークに着目したものはほとんどない。我々は間葉系悪性腫瘍においてヒアルロン酸の発現・機能抑制が抗腫瘍効果を示すことを報告し、ヒアルロン酸をターゲットとした悪性腫瘍治療が可能であることを見出した。ヒアルロン酸をターゲットとした研究を進め、骨内の微小環境における他の細胞、分子とのネットワークの解明、抗がん剤やビスフォスフォネート製剤、放射線治療との相互作用、優位性が示されれば、他に注目されていないメカニズムによる新規治療法の開発につながる。

### 2. 研究の目的

(1) 骨転移における骨組織構成細胞間ネットワークとヒアルロン酸を中心としたマトリックス分子の関連を明らかにし、ヒアルロン酸の骨転移に果たす役割を解明する。

(2) 各種ヒアルロン酸制御法による骨転移病変に対する治療効果の解析、および4-MUを中心としたヒアルロン酸阻害による抗骨転移進展効果とビスフォスフォネート製剤・抗がん剤・放射線治療との比較、併用効果を解析する。ヒアルロン酸の合成を特異的に阻害する薬剤である4-MU、また新たな低分子治療薬として期待される低分子糖鎖(ヒアルロン酸オリゴ糖)を中心として治療効果を明らかにする。

(3) がん細胞ではなく、細胞外マトリックスをターゲットとしていることから、がんの種類を超えて応用できる可能性がある。つまり各種がんの骨転移への応用の可能性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) MDA-MB231 ヒト乳がん細胞株、Lewis マウス肺がん細胞株を用いて、マウス脛骨骨転移モデルを作製。ヒアルロン酸合成阻害剤である4-Methylumbelliferone (4-MU)の投与により、ヒアルロン酸合成が抑制されるかの評価を各種癌細胞および間質細胞である線維芽細胞について評価した。また4-MUのin vitroにおける各種癌細胞株に対する抗腫瘍効果、間質細胞増殖に対する効果、in vivoの骨転移モデルにおける骨転移抑制効果を解析した。

(2) 低分子ヒアルロン酸であるヒアルロン酸オリゴ糖の、内因性ヒアルロン酸の抑制を

介した抗腫瘍効果について解析した。MDA-MB231 ヒト乳がん細胞株を使用し、ヒアルロン酸オリゴ糖(4糖、8糖)と高分子ヒアルロン酸の抗腫瘍効果をin vitro、in vivoにて解析した。

(3) 骨転移の治療として臨床で使われているゾレドロン酸と4-MUを併用して、相加・相乗効果を示すかの実験を実施した。Lewis マウス肺がん細胞株を用いて、単層培養のin vitro実験、マウス癌骨転移モデルを作成してのin vivo実験を実施した。

(4) 骨転移の治療として臨床で実施されている放射線治療について、4-MUが増感作用を有するかについての解析を実施した。Lewis マウス肺がん細胞株を用いて、in vitro実験、in vivo実験で放射線治療と4-MUの併用効果を解析した。

### 4. 研究成果

(1) MDA-MB231 ヒト乳がん細胞株においてヒアルロン酸合成酵素2の発現は4-MU投与で減少した。HA binding assay解析結果で、4-MUにより有意にHA合成量が低下した。4-MUは細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。ヒアルロン酸-CD44相互作用の下流にある細胞内のAktリン酸化は4-MUにより有意に低下した。細胞運動能・浸潤能も4-MUにより抑制された。また間質細胞としての線維芽細胞NIH3T3細胞に対しても4-MUはその運動能・浸潤能を抑制した。マウスによる脛骨骨転移モデルに対するin vivoの4-MU投与では、骨転移である脛骨融解病変の進行を有意に抑制した(図1)。In vivoの脛骨骨転移部組織評価で、4-MU投与によりHAの蓄積はより辺縁で抑制されていた。以上の内容は論文発表した(Urakawa H, Nishida Y et al, Int J Cancer, 2012; 130: 454-466)。

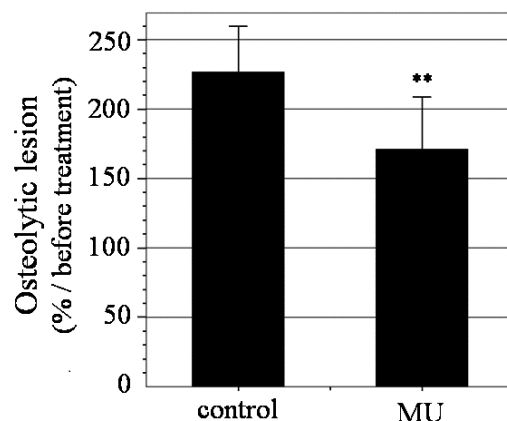


図1. 4-MUにより乳癌骨転移の進行は有意に抑制された(Urakawa et al, Int J Cancer 2012より)

(2) MDA-MB231 ヒト乳がん細胞株において、HA10糖は有意に細胞増殖・運動・浸潤能を抑制したが、HA4糖ではその効果を示さなかつ

た。HA4 糖、HA10 糖投与によりヒアルロン酸合成酵素 2 の発現は変化した。HA10 糖投与後 1 時間で Akt のリン酸化の抑制が起こり、その効果は抗 CD44 抗体の前投与により減弱した(図 2)。In vivo において、HA10 糖の局所投与により、脛骨骨転移巣の進行は有意に抑制された。脛骨骨転移巣の組織学的検討では、内因性の HA 蓄積が抑制されていた。以上の内容は論文発表した(Urakawa H, Nishida Y et al, J Orthop Res, 2012; 30: 662-672)。

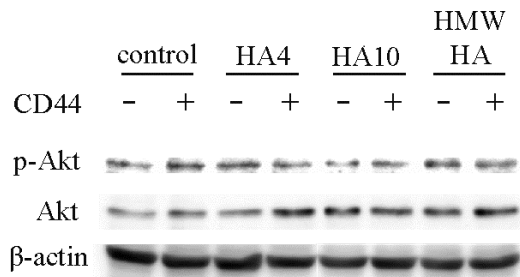


図 2. Akt のリン酸化は HA10 糖投与により抑制され、その効果は抗 CD44 抗体前投与により減弱した(Urakawa H et al, J Orthop Res 2012 より)

(3) Lewis マウス肺がん細胞株およびヒト肺がん細胞株 (A549、SK-MES-1) に対して、ゾレドロン酸と 4-MU はそれぞれ単独で細胞増殖・運動・浸潤能を抑制した。またゾレドロン酸と 4-MU の併投与による効果を Calcucyn ソフトウエアにより解析したところ相乗的に細胞増殖・運動・浸潤能を抑制した。ゾレドロン酸は単独でアポトーシスを誘導し、4-MU はアポトーシス誘導効果を持たなかったが、併投与により相乗的にアポトーシスを誘導した。ヒアルロン酸の細胞膜上受容体である CD44 とその細胞骨格との連結を果たす Ezrin の局在を細胞染色で評価したところ、4-MU 投与により 2 分子の併局在が阻害された。In vivo 実験において、ゾレドロン酸と 4-MU は相乗的に骨転移巣進展抑制効果を示した(図 3) それとともにヒアルロン酸蓄積の抑制および破骨細胞分化活性も抑制された(図 4)。以上の結果を論文発表した(Futamura N, Nishida Y et al, Clin Exp Metastasis 2013; 30: 595-606)。

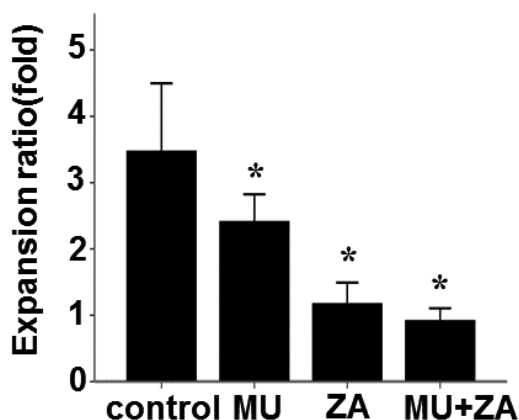


図 3. Lewis マウス肺がん細胞マウス骨転移モデルにおいてゾレドロン酸と 4-MU は骨転移進行を相乗的に抑制した(Futamura Net al, Clin Exp Metastasis 2013 より)

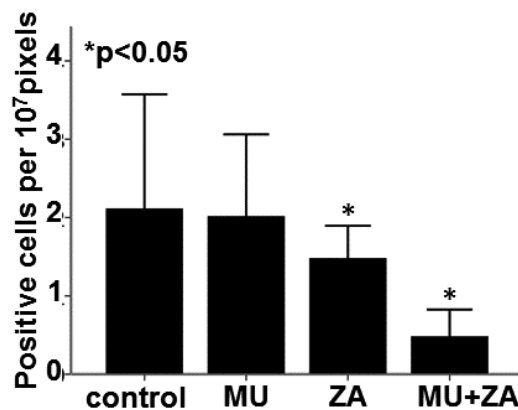


図 4. Lewis マウス肺がん細胞マウス骨転移モデルにおいてゾレドロン酸と 4-MU は骨転移巣における破骨細胞分化を相乗的に抑制した(Futamura Net al, Clin Exp Metastasis 2013 より)

(4) Lewis マウス肺がん細胞株に対して放射線(8Gy、1 回照射)と 4-MU はそれぞれ単独で細胞増殖・運動・浸潤能を抑制した。4-MU は細胞増殖・運動・浸潤能について放射線の増感作用を示した。放射線によるアポトーシス誘導が見られたが、その効果は 48 時間で減弱したが、4-MU 投与によりアポトーシス誘導が長時間にわたって見られた。細胞周期解析では MU は G0/1 アレストを誘導し、放射線は G2 アレストを誘導した。併用では強い G2 アレストを示した。In vivo の実験では、単独投与でも骨転移巣進展抑制が見られたが、併用により相乗的に抑制した。以上の結果は 2013 年アメリカ整形外科学会で発表した。

### 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 6 件)

Yoshioka Y, Kozawa E, Urakawa H, Arai E, Futamura N, Zhuo L, Kimata K, Ishiguro N, Nishida Y.

Suppression of hyaluronan synthesis alleviates inflammatory responses in murine arthritis and in human rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 2013; 65(5):1160-70

doi: 10.1002/art.37861. 査読有

Futamura N, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Ishiguro N, Nishida Y.

Hyaluronan synthesis inhibitor supplements the inhibitory effects of zoledronic acid on bone metastasis of lung cancer. Clin Exp Metastasis. 2013; 30(5):595-606.

doi: 10.1007/s10585-012-9563-4. 査読有  
Wasa J, Nishida Y, Shinomura T, Isogai Z, Futamura N, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Tsukushi S, Ishiguro N.

Versican V1 isoform regulates cell-associated matrix formation and cell behavior differentially from aggrecan in Swarm rat chondrosarcoma cells.

Int J Cancer. 2012; 130(10):2271-81.

doi: 10.1002/ijc.26230. 査読有

Urakawa H, Nishida Y, Knudson W, Knudson CB, Arai E, Kozawa E, Futamura N, Wasa J, Ishiguro N.

Therapeutic potential of hyaluronan oligosaccharides for bone metastasis of breast cancer.

J Orthop Res. 2012; 30(4):662-72.

doi: 10.1002/jor.21557. 査読有

Urakawa H, Nishida Y, Wasa J, Arai E, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N.

Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-Methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo.

Int J Cancer. 2012; 130(2):454-66.

doi: 10.1002/ijc.26014. 査読有

Arai E, Nishida Y, Wasa J, Urakawa H, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N.

Inhibition of hyaluronan retention by 4-methylumbelliferone suppresses osteosarcoma cells in vitro and lung metastasis in vivo.

Br J Cancer. 2011; 105(12):1839-49.

doi: 10.1038/bjc.2011.459. 査読有

[学会発表](計11件)

Ikuta K, Futamura N, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Hamada S, Tsukushi S, Ishiguro N, Nishida Y.

Hyaluronan is a Useful Prognostic Marker and a Possible Therapeutic Target in Patients with MPNSTs

2014 Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons,  
New Orleans (USA) 2014.3.11-15

生田 国大, 浦川 浩, 新井 英介, 小澤 英史, 二村 尚久, 濱田 俊介, 石黒 直樹, 西田 佳弘

ヒト悪性末梢神経鞘腫瘍細胞に対するヒアルロン酸合成阻害剤の抗腫瘍効果

第5回レックリングハウゼン病学会学術大会  
東京慈恵会医科大学(東京都港区)  
2013.10.20

吉岡 裕, 小澤 英史, 浦川 浩, 新井 英介, 二村 尚久, 卓 麗聖, 木全 弘治, 石黒 直樹, 西田 佳弘

4-methylumbelliferone はヒアルロン酸合成阻害を介してコラーゲン誘発関節炎マウス

の炎症と関節破壊を抑制する

第28回日本整形外科学会基礎学術集会

幕張メッセ(千葉市)2013.10.17-18(Day2)

西田 佳弘

関節症における内因性・外因性ヒアルロン酸の意義

第5回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会  
札幌コンベンションセンター(札幌市)

2013.6.20-22(Day1)

Nishida Y.

Hyaluronan, a possible therapeutic target, for musculoskeletal malignancies  
9th International Conference on Hyaluronan,  
Oklahoma city (USA) 2013.6.2-7(Day5)

生田 国大, 二村 尚久, 小澤 英史, 新井 英介, 浦川 浩, 筑紫 聡, 石黒 直樹, 西田 佳弘

悪性末梢神経鞘腫瘍におけるヒアルロン酸、ヒアルロン酸合成酵素、CD44の発現様式と予後との関連

第86回日本整形外科学会学術総会

広島グリーンアリーナ(広島市)

2013.5.23-26(Day3)

Futamura N, Nishida Y, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Ikuta K, Hamada S, Ishiguro N.  
Radiosensitization Effects of Hyaluronan Synthesis Inhibitor on Bone Metastasis of Lung Cancer

2013 Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons,  
Chicago (USA) 2013.3.19-23

二村 尚久, 浦川 浩, 新井 英介, 小澤 英史, 生田 国大, 浜田 俊介, 石黒 直樹, 西田 佳弘

マウス肺がん骨転移に対するヒアルロン酸合成阻害薬による骨破壊抑制効果 放射線治療との比較

第27回日本整形外科学会基礎学術集会

名古屋国際会議場(名古屋)

2012.10.26-27(Day2)

二村 尚久, 西田 佳弘

ヒアルロン酸合成阻害を介した肺がん骨転移に対する放射線治療効果増感作用

(Radiosensitization effects of hyaluronan synthesis inhibitor on bone metastasis of lung cancer)

第71回日本癌学会学術集会

ロイトン札幌(札幌市)2012.9.19-21(Day2)

Futamura N, Nishida Y, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Ishiguro N.

Suppressive Effects of Hyaluronan Synthesis Inhibitor on Bone Metastasis of Lung Cancer

2012 Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons,  
San Francisco (USA) 2012.2.7-11

Nishida Y, Urakawa H, Arai E, Zhuo L, Kimata K, Futamura N, Ishiguro N.

Hyaluronan inhibition suppresses tumorigenicity of primary and metastatic

malignant bone tumors  
2011 Combined Meeting of the Connective  
Tissue Oncology Society and the  
Musculoskeletal Tumor Society,  
Chicago (USA) 2011.10.26-29

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 佳弘 ( NISHIDA, Yoshihiro )  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 5 0 3 3 2 6 9 8

(2)研究分担者

筑紫 聡 ( TSUKUSHI, Satoshi )  
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師  
研究者番号 : 9 0 3 7 8 1 0 9

浦川 浩 ( URAKAWA, Hiroshi )  
名古屋大学・医学系研究科・特任助教  
研究者番号 : 6 0 5 8 4 7 5 3

新井 英介 ( ARAI, Eisuke )  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号 : 4 0 6 1 2 8 4 1

(3)連携研究者

篠村 多摩之 ( SHINOMURA, Tamayuki )  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准  
教授  
研究者番号 : 7 0 2 0 6 1 1 8