

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659883

研究課題名(和文) 前骨転移ニッチ仮説に基づく癌の骨選択的転移メカニズムの解析

研究課題名(英文) The mechanisms of bone-selective cancer metastases based on the pre-metastatic bone niche hypothesis

研究代表者

平賀 徹 (HIRAGA, TORU)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70322170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、担癌状態における骨髄の構成変化と骨転移形成との関連を検討した。その結果、担癌マウスの骨髄、および骨転移巣においては、腫瘍増殖と比例してGr-1+/CD11b+細胞の割合が増加することが示された。また、担癌マウス骨髄から単離したGr-1+/CD11b+細胞は、腫瘍増殖を促進させる傾向を示した。しかし、担癌による骨転移形成の明らかな促進は認められなかった。今後、骨髄Gr-1+/CD11b+細胞と骨転移形成に対するさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined whether the changes in bone marrow cell population in tumor-bearing mice affect the development of bone metastases. Both in the bone marrow in the tumor-bearing mice and in the bone marrow with tumor metastases, the ratio of Gr-1+/CD11b+ cells was markedly increased. Furthermore, the inoculation of tumor cells with Gr-1+/CD11b+ cells isolated from tumor-bearing mice enhanced the formation of subcutaneous tumors. However, bone metastases were not increased in the presence of subcutaneous tumors. Further studies are required to fully define the relationship between bone marrow Gr-1+/CD11b+ cells and the development of bone metastases.

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：癌 骨転移 前転移ニッチ

1. 研究開始当初の背景

癌患者を死に至らしめる最大の原因である転移のメカニズムの解明は、癌研究において最も重要な課題である。骨は肺、肝とならんで癌が最も転移しやすい臓器の一つである。癌の骨転移は、様々な合併症を引き起こし、患者の QOL を著しく低下させるのみならず、生命予後にも重大な影響を与える。にもかかわらず、骨転移に対する効果的な治療法は確立されていない。

近年、「前転移ニッチ (pre-metastatic niche)」の概念が提唱され、転移成立以前の転移標的臓器における微小環境変化と臓器選択的転移との関連が注目されている。

ヒトおよびマウスを用いた検討で、担癌状態が骨髄の細胞構成を変化させることが報告されている。また、骨転移巣では、転移癌細胞と骨髄細胞が直接接触することから (Hiraga et al. Cancer Res 67: 4157, 2007)、両者間の細胞間コミュニケーションが骨転移の成立・進展と関連することが推測される。

以上の所見を考え合わせると、骨転移の成立以前に生じる原発腫瘍に起因する骨髄の微小環境変化が、骨転移の成立・進展過程において重要な役割を果たしている可能性が推測される。

2. 研究の目的

本研究では、骨転移のメカニズム解明および新規治療法の開発を目的として、「原発腫瘍によって引き起こされる骨髄微小環境の変化が骨転移の成立・進展に重要な役割を果たす」という作業仮説に基づき、骨転移に対する骨の環境変化の関与を分子、細胞、及び個体レベルで明らかにするために、以下の検討を行った。

- (1) 担癌状態における骨髄細胞の構成変化
- (2) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の in vivo 局在
- (3) 骨転移巣における骨髄細胞の構成変化
- (4) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の in vivo 腫瘍増殖に対する作用
- (5) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の骨転移に対する作用

3. 研究の方法

(1) 担癌状態における骨髄細胞の構成変化
癌細胞を皮下移植したマウスにおける腫瘍増殖と骨髄内での Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の構成変化について、フローサイトメーターを用い、経時的な観察を行った。

(2) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の in vivo 局在
Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の皮下腫瘍、脾臓などでの局在を免疫組織化学的に検討した。

(3) 骨転移巣における骨髄細胞の構成変化
骨転移モデルマウスを用いて、骨転移巣における骨髄細胞の構成変化について、フローサイトメーターを用い、検討を行った。

(4) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の in vivo 腫瘍増殖に対する作用

骨髄からセルソーターにより単離した Gr-1⁺/CD11b⁺細胞を、腫瘍細胞とともにヌードマウスに接種し、腫瘍増殖に対する作用を検討した。

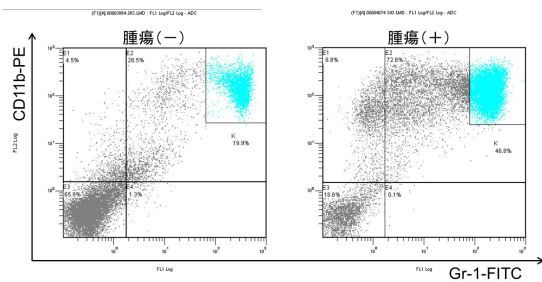
(5) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の骨転移に対する作用

ヌードマウス乳腺内に腫瘍細胞を接種し、その 4 週後に、腫瘍細胞の左心室内移植を行うという方法を用い、Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の骨転移に対する作用について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 担癌状態における骨髄細胞の構成変化

腫瘍増殖と比例して Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の割合が増加することが示され、担癌状態の関与が強く示唆された。



(2) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の in vivo 局在

担癌状態のマウス骨髄内での著明な増加が確認された Gr-1⁺/CD11b⁺細胞が、腫瘍内や脾臓内でも局在が確認され、また、増加していることが明らかにされた。

(3) 骨転移巣における骨髄細胞の構成変化

マウス骨転移モデルを用いた検討において、骨転移巣においても Gr-1⁺/CD11b⁺細胞が増加していることが確認された。この結果から、Gr-1⁺/CD11b⁺細胞と骨転移形成との関連の可能性が推測される。

(4) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の in vivo 腫瘍増殖に対する作用

正常マウスから単離した Gr-1⁺/CD11b⁺細胞は、腫瘍増殖に影響を与えなかった。一方、担癌マウスから単離した Gr-1⁺/CD11b⁺細胞は、腫瘍増殖を促進させる傾向を示した。

(5) Gr-1⁺/CD11b⁺細胞の骨転移に対する作用

乳腺部腫瘍の有無による骨転移形成の明らかな差異は認められなかった。4)の実験から、担癌マウスの骨髄 Gr-1⁺/CD11b⁺細胞には腫瘍増殖の促進作用が示唆されることから、本実験系では Gr-1⁺/CD11b⁺細胞以外の要素が関与した可能性が推測される。

以上の結果から、担癌状態における骨髄の構成変化と骨転移形成との関連が示唆されるものの、骨髄 Gr-1⁺/CD11b⁺細胞と骨転移形成に対するさらなる検討が必要と思われる。

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 23 件)

Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility and hyaluronan production. Cancer Res 73(13): 4112-22, 2013 査読有 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3801

Hosoya A, Yukita A, Ninomiya T, Hiraga T, Yoshiba K, Yoshiba N, Kasahara E, Nakamura H. Localization of SUMOylation factors and Osterix in odontoblast lineage cells during dentin formation and regeneration. *Histochem Cell Biol* 140(2): 201-11, 2013 査読有
DOI: 10.1007/s00418-013-1076-y
Ninomiya T, Hiraga T, Hosoya A, Ohnuma K, Ito Y, Takahashi M, Ito S, Asashima M, Nakamura H. Enhanced bone-forming activity of side population cells in the periodontal ligament. *Cell Transplant* (in press) 査読有
DOI:
<http://dx.doi.org/10.3727/096368913X663587>
Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N and Udagawa N. Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology* 154(2): 773-82, 2013 査読有
DOI: 10.1210/en.2012-1928
Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T. Role of heparan sulfate proteoglycans surrounding osteoblast lineage cells. *J Oral Biosci* 54(1): 43-7, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.job.2012.01.005
Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshiba K, Yoshiba N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H. Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol* 137(6): 733-42, 2012 査読有
DOI: 10.1007/s00418-012-0928-1
Hosoya A, Yukita A, Yoshiba K, Yoshiba N, Takahashi M, Nakamura H. Two distinct processes of bone-like tissue formation by dental pulp cells after tooth transplantation. *J Histochem Cytochem* 60(11): 861-73, 2012 査読有
DOI: 10.1369/0022155412459741
Yukita A, Hosoya A, Ito Y, Katagiri T, Asashima M, Nakamura H. Ubc9 negatively regulates BMP-mediated osteoblastic differentiation in cultured cells. *Bone* 50(5): 1092-9, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.bone.2012.02.008
Masago Y, Hosoya A, Kawasaki K, Kawano S, Nasu A, Toguchida J, Fujita K, Nakamura H, Kondoh G, Nagata K. The molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J Cell Sci* 125(Pt 5): 1118-28, 2012 査読有
DOI: 10.1242/jcs.089748

Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahara I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. *J Immunol* 188(4): 1772-81, 2012 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1101174
Chen YC, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Miyazawa H, Nakamura H. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts. *Arch Oral Biol* 57(5): 453-9, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.005
Hiraga T, Myoui A, Hashimoto N, Sasaki A, Hata K, Morita Y, Yoshikawa H, Rosen CJ, Mundy GR, Yoneda T. Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases. *Cancer Res* 72(16): 4238-49, 2012 査読有
DOI: 10.1158/0008-5472
Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of α -smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol* 138(4): 583-92, 2012 査読有
DOI: 10.1007/s00418-012-0978-4
Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Hosoya A, Shigetani Y, Yamanaka Y, Izumi N, Nakamura H, Okiji T. Expressional Alterations of Fibrillin-1 during Wound Healing of Human Dental Pulp. *J Endodont* 38(2): 177-84, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.joen.2011.09.016
Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential. *Oncol Rep* 25(1): 289-96, 2011 査読有
DOI: 10.3892/or_00001073
Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Koide M, Yamaguchi K, Oida H, Arai Y, Sahara N, Nakamura H, Ozawa H. Prostaglandin E(2) receptor EP(4)-selective agonist (ONO-4819) increases bone formation by modulating mesenchymal cell differentiation. *Eur J Pharmacol* 650(1): 396-402, 2011 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.10.021
Furuya Y, Mori K, Ninomiya T, Tomimori Y, Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Uchida K, Yasuda H. Increased bone mass in mice after single injection of anti-receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-neutralizing antibody: evidence for

bone anabolic effect of parathyroid hormone in mice with few osteoclasts. *J Biol Chem* 286(42): 37023-31, 2012 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M111.246280

Yoneda T, Hata K, Nakanishi M, Nagae M, Nagayama T, Wakabayashi H, Nishisho T, Sakurai T, Hiraga T. Involvement of acidic microenvironment in the pathophysiology of cancer-associated bone pain. *Bone* 48(1): 100-5, 2011 査読有

DOI: 10.1016/j.bone.2010.07.009

Yoneda T, Hata K, Nakanishi M, Nagae M, Nagayama T, Wakabayashi H, Nishisho T, Sakurai T, Hiraga T. Molecular events of acid-induced bone pain. *IBMS BoneKEy* 8(4): 195-204, 2011 査読有

DOI: 10.1138/20110507

Lee JM, Shin JO, Cho KW, Hosoya A, Cho SW, Lee YS, Ryoo HM, Bae SC, Jung HS. Runx3 is a crucial regulator of alveolar differentiation and lung tumorigenesis in mice. *Differentiation* 81(4): 261-8, 2011 査読有

DOI: 10.1016/j.diff.2011.02.001

- 21 Yonezawa T, Hasegawa S, Asai M, Ninomiya T, Sasaki T, Cha BY, Teruya T, Ozawa H, Yagasaki K, Nagai K, Woo JT. Harmine, a b-carboline alkaloid, inhibits osteoclast differentiation and bone resorption in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 650(2-3): 511-8, 2011 査読有

DOI: 10.1016/j.ejphar.2010

- 22 Kariya Y, Honma M, Hanamura A, Aoki S, Ninomiya T, Nakamichi Y, Udagawa N, Suzuki H. Rab27a and Rab27b are involved in stimulation-dependent RANKL release from secretory lysosomes in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 26(4): 689-703, 2011 査読有

DOI: 10.1002/jbmr.268

- 23 Ikawa T, Kawaguchi A, Okabe T, Ninomiya T, Nakamichi Y, Nakamura M, Uehara S, Nakamura H, Udagawa N, Takahashi N, Nakamura H, Wakitani S. Hypergravity suppresses bone resorption in ovariectomized rat. *Adv Space Res* 47(7): 1214-24, 2011 査読有

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.asr.2010.12.004>

[学会発表] (計 38 件)

平賀 徹 癌幹細胞マーカーCD44 の骨転移に対する促進的関与 第 16 回 癌と骨病変研究会、2013 年 11 月 15 日、千代田放送会館(東京)

平賀 徹 骨転移の基礎 (骨転移に対する治療 ガイドライン作成 公開シンポジウム) 第 11 回 日本臨床腫瘍学会学術集会、2013 年 8 月 29 日、仙台国際センター(宮城)

Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Functional roles of the cancer stem cell marker CD44 in the development of bone metastasis. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013 年 5 月 31 日、神戸コンベンションセンター(兵庫)

平賀 徹, 中村浩彰 癌幹細胞マーカー CD44 は癌細胞の造腫瘍能, 細胞運動能, 基質形成能の亢進を介して骨転移を促進する 第 30 回 日本骨代謝学会学術集会、2012 年 7 月 21 日、京王プラザホテル(東京)

平賀 徹 癌幹細胞マーカーCD44 の乳癌骨転移に対する機能的役割 第 71 回 日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、札幌市教育文化会館(北海道)

Hiraga T, Ito S, Nakamura H. The cancer stem cell marker CD44 promotes bone metastasis of breast cancer by enhancing tumorigenicity, cell motility, and matrix production. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012 年 10 月 12 日、Minneapolis, Minnesota, USA

[図書] (計 1 件)

平賀 徹 骨転移進行抑制と疼痛緩和 pp. 49-55 高橋俊二編 「がん骨転移治療 - ビスホスホネート治療による Bone Management - 」 2012 年、先端医学社、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平賀 徹 (HIRAGA TORU)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 70322170

(2) 研究分担者

細矢 明宏 (HOSOYA AKIHIRO)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 70350824

二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号: 00360222