

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791668

研究課題名(和文)新規骨代謝改善薬の転移性骨腫瘍に対する効果の解析

研究課題名(英文)The analysis of the effect of novel agent for bone metabolism on bone metastasis

研究代表者

前田 和洋 (Maeda, Kazuhiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50548849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、本申請者は、Wnt5a-Ror2経路が、マクロファージ上のRANKの発現を促進する事を報告してきた。一方、腫瘍細胞におけるRANKの発現は骨転移を促進するという報告があることから、腫瘍細胞が発現するWNTは自身に作用しRANKの発現を誘導し骨転移を促進するという仮説が考えられた。

以上の背景より、骨に親和性のある株化癌細胞を用い実験を行った。その結果、これらの細胞株ではRANKを高発現していた。さらに、Wnt5aやRor1/2の発現も認めた。以上の結果より、腫瘍細胞が発現するWnt5aは自身のRor1/2に作用し、RANKの発現を誘導し骨転移を促進するという可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：RANK is a receptor of RANKL which is an essential molecule for osteoclastogenesis. Previously, we reported that the Wnt5a-Ror2 pathway enhances the expression of RANK in macrophages. On the other hand, another group reported that the expression of RANK in tumor cells enhance bone metastasis.

Taken together, these findings suggest that the Wnt expressed by tumor cells affects itself in an autocrine manner, and promotes bone metastasis through the induction of RANK expression. To test this hypothesis, we performed experiments using cell lines which have affinity for the bone such as breast and prostate cancer cell lines. In results these cells highly expressed RANK, Wnt5a and Ror1/2 in comparison with control cells. These results indicate that Wnt5a expressed by tumor cells act on Ror2 expressed in itself in an autocrine manner, and enhanced bone metastasis through the induction of RANK expression in tumor cells.

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：Wntシグナル 転移性骨腫瘍

1. 研究開始当初の背景

我が国において、悪性腫瘍は 1981 年以後死亡原因の第 1 位で、現在国民の 3 人に 1 人はガンで死亡し、さらに増加傾向にある。転移性骨腫瘍を罹患する患者の大部分は、原発腫瘍の終末期の状態にあり、その治療法は、疼痛や麻痺の管理が主体の対症療法しかないのが実情である。従って、新規治療法の確立は、終末期の患者の QOL を維持する上でも急務である。これまで、本申請者は、Wnt 非古典経路が骨吸収を促進する事を発見し、それを遺伝子欠損マウスを用いた手法で報告してきた。そこで、本研究では、転移性骨腫瘍における Wnt 非古典経路の役割を解析する。

2. 研究の目的

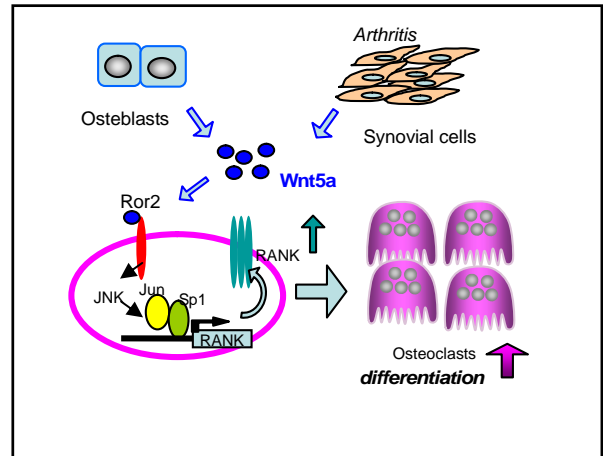
国内・国外の研究動向及び位置づけ

Wnt は、胎生期の器官形成から発癌に至るまで、組織の改造が盛んな時期に機能するサイトカインである。Wnt のシグナル経路は、 β -カテニンを介する古典経路と介さない非古典経路の 2 つに大別される。これまで、哺乳動物では、Wnt は 19 種類が同定されている。その中でも、Wnt5a は、非古典経路を活性化する Wnt として知られている。Wnt5a の遺伝子欠損マウスは、心肺の低形成で胎生 18.5 日で致死である。また、短い四肢、鼻、尾および外性器を有する特徴的な表現型を呈する²⁾。また、腫瘍細胞における Wnt5a の役割として、細胞自身の移動や組織への浸潤に重要である、と報告されている。一方、受容体型チロシンキナーゼである Ror2 は、Wnt5a の受容体である。Ror2 の遺伝子欠損マウスも、Wnt5a の遺伝子欠損マウスと同様に心肺の低形成で胎生 18.5 日で致死である。Wnt5a と同様に、腫瘍細胞における Ror2 の役割として、組織への浸潤に重要である、と報告されている。

これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

本申請者は、1)Wnt5a が骨芽細胞、滑膜細胞より産生される事、2)Wnt5a は破骨細胞の分化を強力に促進する事、3)破骨細胞前駆細胞特異的に Ror2 を欠損させたマウス (cKO) では、骨吸収が低下する事により骨量が著しく増加する事、4)関節リウマチ (RA) モデルマウスに Ror2 のデコイ受容体を投与すると関節破壊が顕著に抑制される事を報告してきた。即ち、Wnt5a-Ror2 経路をターゲットとした新規骨代謝改善薬の可能性を世界に先駆け報告した。また、破骨細胞前駆細胞特異的に Ror2 を欠損させたマウスを用い、骨吸収が低下した分子メカニズムを解析した。その結果、破骨細胞前駆細胞において Wnt5a-Ror2 経路は、JNK を介し RANK の発現を亢進し、骨吸収を促進させるというこ

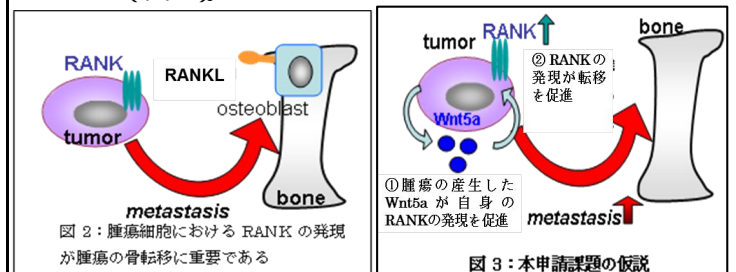
とが明らかとなった (図 1)。



(図 1) Wnt5a-Ror2 経路は JNK を介し RANK の発現を亢進し、骨吸収を促進させる (Maeda K. et al. Nat Med.18: 405-412, 2012)

オーストリアの Penninger のグループは、腫瘍細胞における RANK の発現が腫瘍の骨転移に重要であると報告している。即ち、腫瘍細胞の RANK が seed (種) であり、骨芽細胞上の RANKL が soil (土) であるという説を発表した (図 2)。

彼らの説と、我々の実験結果を考え合わせると『腫瘍細胞に発現する Wnt5a は、オートクライン的に働き自身の RANK の発現を亢進させる。』『RANK の発現が亢進した腫瘍細胞は骨へと転移する。』という仮説が考えられた (図 3)。



3. 研究の方法

骨親和性のある株化癌細胞において、Wnt5a-Ror2 経路が、RANK の発現を制御するかどうかを検討するために以下の実験を行う。細胞株は、株化乳癌細胞 (MDA-MB-231、Hs578T、MCF-7)、株化前立腺癌細胞 (PC3、LNCaP、DU145) を使用した。これらの細胞株に RANK が発現しているかどうかを検討した。さらに、WNT5A や ROR2 が発現しているかどうかどうかも併せて検討した。さらに、WNT5A/ ROR2 に対する siRNA 導入による機能喪失実験を行い、Wnt5a の機能喪失により RANK の発現に影響があるかどうかを検討する。また、各種阻害剤を添加し、腫瘍細胞における RANK の発現にどのシグナル経路が深く関わっているかを検討する。

4. 研究成果

骨親和性のある株化癌細胞における RANK の発現について

株化乳癌細胞 (MDA-MB-231、Hs578T、MCF-7)、株化前立腺癌細胞 (PC-3、LNCaP、DU145) より、cDNA を調製し、リアルタイム PCR に供した。その結果、これらの細胞では、コントロールの株化大腸癌細胞と比較し 5-40 倍 RANK を発現していることが明らかとなった。

骨親和性のある株化癌細胞における Wnt の発現について

RANK の検討と同様の実験を WNT5A について行った。その結果、骨親和性のある株化癌細胞では、コントロールと比較し 16-2800 倍 WNT5A を発現していることが明らかとなった。

骨親和性のある株化癌細胞における ROR2 の発現について

同様の実験を ROR2 について行った。当初の仮説に反して、ROR2 の発現上昇を認めた細胞株は上記の中の 1 種類のみであった。そこで、ROR2 と機能的重複が報告されている ROR1 の発現について検討を行った。その結果、ROR2 が低発現であった株では、ROR1 が高発現していた。以上の結果より、ROR2 が発現していない細胞では、ROR1 が ROR2 の機能を代償している可能性が示唆された。また、骨に親和性のあるヒト癌細胞において WNT5A-ROR1/2 経路が、RANK の発現を制御し、骨転移に關与する可能性が示唆された。現在、siRNA による機能喪失実験や阻害剤を用いた実験により、さらなる検討を行っている。

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 11 件)

前田和洋, 斎藤充, 丸毛啓史; Wnt シグナルと sclerostin. *腎と骨代謝* 2014, in press (査読無)

Maeda K, Saito M, Marumo K; Wnt signals and bone metabolism. *J Phys Sports Med.* 2014, in press (査読有)

Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, et al; Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis. *Sci Rep.* 2014 Mar 27;4:4493. doi: 10.1038/srep04493 (査読有)

前田和洋, 小林泰浩, 高橋直之, 丸毛啓史; 最新用語解説 臨床 Wnt 非古典経路と骨疾患. *骨粗鬆症治療* 12: 130-134, 2013

http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ae6kotue/2013/001202/013&name=0130-0134j&UserID=202.223.144.130&base=jamas_pdf (査読無)

小林泰浩, 前田和洋, 高橋直之; 【Wnt 協奏曲: 新たな活性化機構と他の増殖・分化シグナルとの協調による形態形成】(第2部) Wntシグナルと幹細胞からの組織形態形成 Wnt5a-Ror2シグナルによる破骨細胞分化制御. *細胞工学* 32: 414-418, 2013 <http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901412.html> (査読無)

Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y; Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J. Mol. Med.* 91:15-23, 2013 doi: 10.1007/s00109-012-0974-0. (査読有)

小林泰浩, 前田和洋, 高橋直之; Wnt5a-Ror2シグナルは破骨細胞形成を亢進する. *実験医学* 30: 1933-1936, 2012

<http://www.fujisan.co.jp/product/1281679805/b/819655/> (査読無)

小林泰浩, 前田和洋, 上原俊介; Wnt による破骨細胞の分化制御機構. *細胞* 44: 274-277, 2012

http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2012/05/6_1.html (査読無)

Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N; Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* 18: 405-412, 2012 doi: 10.1038/nm.2653. (査読有)

Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y; Regulatory Mechanism of Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) and Wnt Signals. *Front Biosci.* 16: 21-30, 2011 (査読有)

Kobayashi Y, Maeda K, Uehara S, Yamashita T, Takahashi N; Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by Wnt signaling. *Inflammation and Regeneration.* 31:413-419, 2011 (査読有)

[学会発表](計 8 件)

前田和洋; 骨芽細胞系細胞と破骨細胞前駆細胞間の Wnt5a-Ror2 シグナルは破骨細胞分化を促進する

平成 25 年度日本整形外科学会研究奨励賞第二次選考会 2013.10.16 千葉

前田和洋; 骨代謝における Wnt シグナルの役割

第 68 回日本体力医学会ランチョンセミナー
2013.9.23 東京 .

Maeda K, Kobayashi Y, Takahashi N, Marumo K; Wnt5a-Ror2 signaling boosts bone destruction in arthritis.

JCR international school 2013 2nd Aug. 2013, Karuizawa

前田和洋; 破骨細胞研究の新展開 歴史から臨床応用、現状の問題点まで

東京慈恵会医科大学大学院特別講義
2013.5.31 東京 .

Maeda K ; Wnt5a-Ror2 signaling boosts bone destruction in arthritis

The 6th Bone & Cartilage Frontier 17th Nov. 2012, Tokyo

小林泰浩, 前田和洋, 上原俊介, 高田伊知郎, 加藤茂明, 丸毛啓史, 宇田川信之, 高橋直之

Wnt5a-Ror2 シグナルは関節炎に伴う骨破壊を増悪する

第 30 回 日本骨代謝学会学術集会
2012.7.19 東京

前田和洋, 齊藤充, 上野豊, 中村陽介, 木田吉城, 白勝, 荒川翔太郎, 高橋基, 丸毛啓史, 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之

骨芽細胞系細胞と破骨細胞前駆細胞間の Wnt5a-Ror2シグナルは破骨細胞の分化を促進する - 関節リウマチ新規治療法の分子基盤の確立 -

第111回 成医会第三支部例会 2012.7.6
東京

前田和洋, 小林泰浩, 岡本正則, 高田伊知郎, 加藤茂明, 可児修一, 西田満, 南康博, 宇田川信之, 丸毛啓史, 高橋直之

Wnt非古典経路はRANKの発現を亢進し破骨細胞分化を促進する

第 26 回 日本整形外科学会基礎学術集会
2011 . 10 . 20 前橋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

http://www.jikei.ac.jp/academic/course/57_seikei.html

6 . 研究組織

研究代表者

前田 和洋 (MAEDA, Kazuhiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 50548849