

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460062

研究課題名(和文) 乳がんの増殖と転移におけるプロスタグランジンEの関与とEP阻害剤を用いた創薬展開

研究課題名(英文) Effects of prostaglandin E and its EP receptors on the growth and metastasis of breast cancer.

研究代表者

宮浦 千里 (MIYURA, CHISATO)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20138382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳がんは骨転移しやすい。乳がん細胞をマウスに移入して、骨転移系を確立した。骨転移巣では、PGE産生が亢進し、骨吸収が亢進した。骨転移巣の骨破壊は4種のPGE受容体の内、EP4選択的アンタゴニストの投与により改善された。乳がん細胞と宿主の骨芽細胞を接着させると、PGE産生と骨吸収が亢進した。従って、骨芽細胞から産生されるPGEが乳がん骨転移巣における骨吸収を促すと考えられる。前立腺がんのマウスへの移入実験を実施したところ、全身転移と骨転移を検出し、全身転移と骨転移ともに、EP4アンタゴニストの投与により改善した。骨転移の治療薬としてEPs作働薬の創薬展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bone metastasis is a frequent occurrence in breast cancer patients, but little is known about the role of prostaglandin E (PGE) in the cancer. We established the model for bone metastasis of breast cancer in mice. When breast cancer cell (4T1) was injected in to tibia, severe bone resorption was detected in the metastasis area by micro-CT analysis. Bone resorption induced by PGE is mainly regulated by the signaling via EP4 receptor, one of the PGE receptor subtypes. The bone metastasis of breast cancer with increased bone resorption was abrogated by EP4 receptor antagonist in vivo. The cell-cell interaction with 4T1 induced PGE production in osteoblasts, suggesting that PGE-EP4 signaling may be critical for bone destruction in bone metastasis of breast cancer. Metastasis of prostate cancer PC-3 was detected in vivo, and both metastasis into various tissues and bone metastasis was clearly suppressed by the treatment with EP4 antagonist in mice.

研究分野：医歯薬学、薬学、生物系薬学、生化学、がんの骨転移

キーワード：乳がん 骨転移 骨吸収 プロスタグランジンE 血管新生 固形腫瘍 イメージング解析

## 1. 研究開始当初の背景

乳がんは骨に転移しやすく、骨転移巣は散在性に発生して、予後を大きく左右する。乳がん細胞(4T1)をマウスに移入し、骨転移のモデル系を確立した。骨転移巣では激しい骨破壊が起こることを検出した。この知見を基盤とし、宿主細胞が産生するPGEが乳がんの転移を制御するメカニズムを解明する。また、PGEレセプター作働薬(EP1~EP4アンタゴニスト)によりPGEシグナルを遮断する創薬展開を進め、転移抑制剤の開発を目指す。

がんの増殖と転移には、宿主細胞が産生するPGEが重要な役割を担うことを示してきた。また、メラノーマの骨転移巣や炎症時における骨破壊にはPGEが関与し、PGEレセプター(EP1~EP4)のうち、EP4を選択的に阻害するEP4アンタゴニストの投与は骨転移を抑制することを報告した(FEBS Lett. 581:565-571, 2007)。我々は、乳がんが骨転移しやすいことに注目し、乳がん細胞(4T1)をマウスに移入し、骨転移モデル系を確立する。骨の3次元CT解析により、骨転移巣における激しい骨破壊を検出している。本課題では、乳がんの骨転移解析、骨の3次元CT解析を実施し、乳がんの増殖と転移におけるPGEの役割を解明する。さらに、EPsアンタゴニストの投与効果を検証して、乳がん転移阻止の創薬展開につなげたい。さらに、乳がんと同様に骨へ転移しやすい前立腺がんに着目し、その全身転移と骨転移についても解析する。

## 2. 研究の目的

乳がん細胞をマウスに移入し、骨転移モデル系を確立する。乳がんの骨転移におけるPGEの役割を解明し、選択的PGEレセプター作働薬を駆使して転移治療薬の開発につなげる。具体的な目的は以下の通りである。

(1) 乳がん細胞(4T1)をマウスに移入し、骨3次元CT解析・形態計測を駆使して、乳がんの転移評価系を確立する。さらに、PGE受容体であるEPsのアンタゴニストを駆使した創薬展開を行なう。特に、EP4アンタゴニストに着目した検討を実施する。

(2) 乳がんの骨転移や腫瘍形成のメカニズムについて、宿主の細胞が産生するPGEに着目し、がん細胞と宿主細胞の相互作用を解析する。

(3) 乳がんのみならず、骨に高率に転移する前立腺がんについて、マウスへの移入実験を実施し、転移解析と創薬展開を実施する。

本研究により、がんの骨転移におけるPGEの役割解明が進み、転移の治療薬と

してEPs作働薬の創薬展開が進めば、がんの克服への道が拓ける点で極めて意義深い。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳がんの骨転移評価系におけるPGE受容体EPsアンタゴニストの有用性

#### ①骨転移評価系:

マウス乳がん細胞(4T1)をマウス頸骨に移入して骨転移巣モデルを確立する。移植10日後に頸骨を採取し、DEXA法による骨密度測定ならびにマイクロCTを用いた骨3次元解析を行なう。骨転移巣における局所PGE産生・骨破壊・関連遺伝子の発現も解析する。切片を作成して骨形態観察し、転移巣の骨破壊と骨吸収を調べる。

#### ②EPsアンタゴニストの効能評価:

上記の骨転移モデル系において、マウスにEPsアンタゴニストを経口投与する。PGEレセプター(EP1~EP4)の各EPに対するアンタゴニストを用いる。これまでに、PGEの骨吸収作用は主としてEP4を介して発現することを報告してきた。そこで、特に、EP4アンタゴニストの有効性に着目する。

### (2) 乳がんの骨転移や腫瘍形成のメカニズム解析

#### ①乳がん細胞へのPGEの直接作用:

4T1細胞の培養系にPGEを添加し、4T1細胞の増殖に対するPGEの直接作用を生細胞数の計測およびMTTアッセイにより検討する。4T1細胞に発現しているPGEレセプター(EP1~EP4)について、RT-PCR法により発現の有無を解析する。

#### ②宿主骨芽細胞と乳がん細胞の相互作用:

4T1細胞と宿主由来骨芽細胞の共存培養を実施し、PGE産生をEIA法により計測、COX-2, mPGES-1, RANKLの遺伝子発現はRT-PCR法により解析する。骨芽細胞に発現しているPGEレセプター(EP1~EP4)について、RT-PCR法により発現の有無を調べる。共存培養に用いる4T1細胞と骨芽細胞は、生細胞と固定細胞の両方を用い、組み合わせ実験を実施する。

#### ③破骨細胞形成の解析:

マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養を実施して、破骨細胞形成を解析する。破骨細胞は、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色により同定する。この培養系に、固定した4T1細胞を共存させ、4T1への接着が破骨細胞形成を誘導するか否か、解析する。

### (3) 前立腺がんの転移解析と創薬展開

ヒト前立腺がん細胞(PC3)にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、マウス心臓に移入する。経日的に全身への転移について、ルシフェリン投与による発光検出により検討する。全身発光検出と同時に、軟エックス

線解析も実施して、骨転移箇所の骨破壊を検出する。発光検出で明らかとなった骨転移巣を有する骨を採取し、マイクロ CT を用いた骨 3 次元解析を行なう。切片を作成して骨形態観察し、転移巣の骨破壊と骨吸収を観察する。マウスに EP4 アンタゴニストを経口投与し、全身への転移における EP4 アンタゴニストの効果について、発光検出する。骨転移巣については、マイクロ CT を用いた骨 3 次元解析、切片による骨形態観察を行なう。

#### 4. 研究成果

##### (1) 乳がんの転移評価系における PGE 受容体 EPs アンタゴニストの有用性

###### ①骨転移評価系：

4T1 細胞をマウス頸骨に移入して骨転移巣モデルを確立した。移植 10 日後に頸骨を採取し、DEXA 法による骨密度を測定したところ、顕著な骨密度低下を認めた (図 1 A)。マイクロ CT を用いた骨 3 次元解析を実施したところ、4T1 細胞を移入した近位において、顕著な骨破壊を認め、その骨破壊は海綿骨のみならず皮質骨も破壊されて薄層化を認めた (図 1 B)。骨転移巣の骨・骨髄から RNA を採取し、破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) の遺伝子発現を調べたところ、骨破壊が進行している骨では、RANKL mRNA 発現が亢進しており、骨髄液中の PGE レベルも高値を示した。

###### ②EPs アンタゴニストの効能評価：

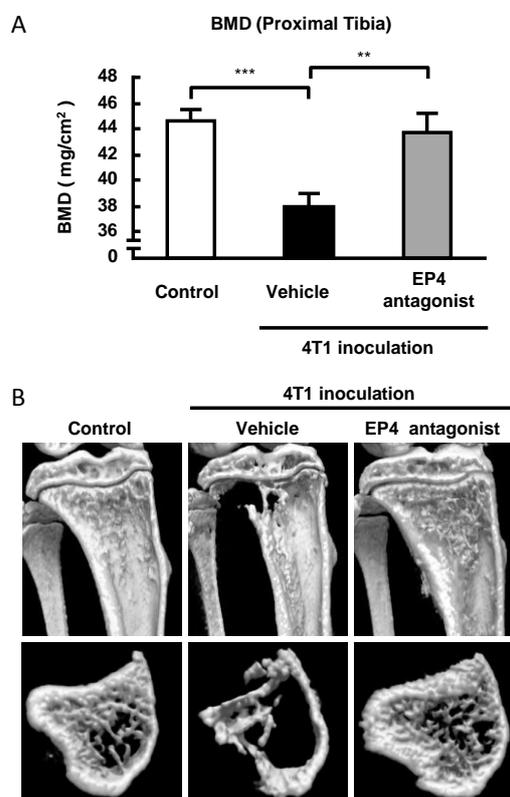


図1. マウス乳がんの骨転移巣における骨破壊

上記の骨転移モデル系において、マウスに EPs アンタゴニストを経口投与した。EP1~EP4 の各 EP に対するアンタゴニストを用いて、骨転移モデルへの改善効果を比較したところ、EP4 アンタゴニストの投与により、骨破壊の有意な改善を認めた。EP4 アンタゴニストを投与したマウスでは、乳がん細胞の骨における増殖が顕著に抑制され、骨密度は有意に回復した (図 1 A)。マイクロ CT を用いた骨 3 次元解析を実施したところ、EP4 アンタゴニストを投与したマウスの骨では、正常な海綿骨構造を認め、骨破壊がほとんど起らなかった (図 1 B)。

##### (2) 乳がんの骨転移や腫瘍形成のメカニズム解析

###### ①乳がん細胞への PGE の直接作用：

4T1 細胞の培養系に PGE を添加し、4T1 細胞の増殖に対する PGE の作用を検討した結果、0.01-1 $\mu$ M の濃度範囲において、濃度依存的に細胞数が増加した。RT-PCR 法により 4T1 細胞に発現している PGE レセプター (EP1~EP4) について調べた結果、EP1 と EP4 の mRNA 発現が検出された。PGE の増殖促進効果は、EP1 アンタゴニストにより部分的に抑制され、EP4 アンタゴニストにより完全に抑制された。また、細胞遊走能 (マトリゲルアッセイ) も PGE 添加により促進され、その作用も EP4 アンタゴニストの併用添加により有意に抑制された。

###### ②宿主骨芽細胞と乳がん細胞の相互作用：

生存した骨芽細胞に固定した 4T1 を接着させたところ、骨芽細胞からの PGE 産生が顕著に亢進された (図 2 A)。生存した 4T1 細胞は PGE を産生するが、固定した骨芽細胞との接着により、PGE 産生が有意に上昇した (図 2 A)。これら培養系から RNA を抽出し、RT-PCR 法により COX-2, mPGES-1 および RANKL の mRNA 発現を調べたところ、生存した骨芽細胞に固定 4T1 を接着させることにより、COX-2, mPGES-1 および RANKL の mRNA 発現がいずれも上昇し、PGE 産生亢進のデータの結果に一致した (図 2 B)。生存した 4T1 に固定した骨芽細胞を接着させる実験では、COX-2 と mPGES-1 の mRNA 発現が上昇したが、RANKL は発現しなかった (図 2 B)。

③破骨細胞形成の解析：マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養系において、固定した 4T1 細胞を接着させることにより、破骨細胞の形成が誘導され、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ陽性の破骨細胞を確認した (図 3)。この効果は、EP4 アンタゴニストにより完全に抑制された (図 3)。一方、EP1 アンタゴニストはほとんど影響を示さなかった。COX-2 阻害剤である NS398 により完全に抑制された。従って、4T1 細胞

胞の膜上分子との接着により骨芽細胞で PGE 産生が誘導され、産生された PGE が RANKL 誘導を介して破骨細胞形成を亢進すると考察される。

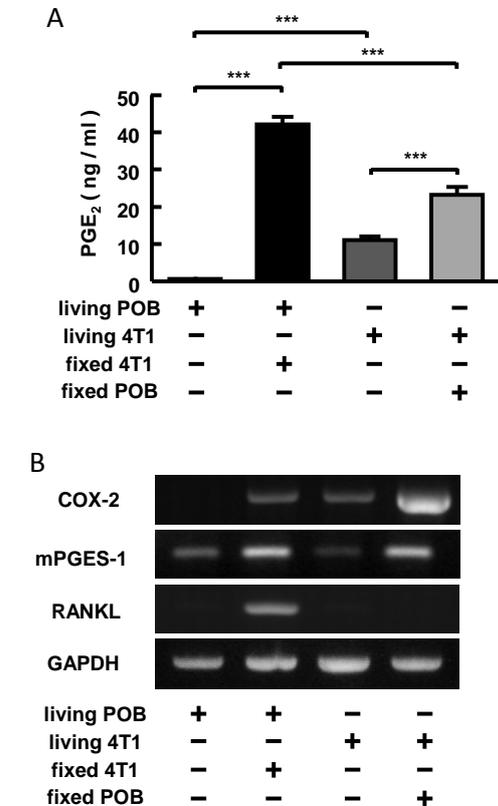


図2. 乳がん細胞との接着による骨芽細胞からのPGE産生の亢進

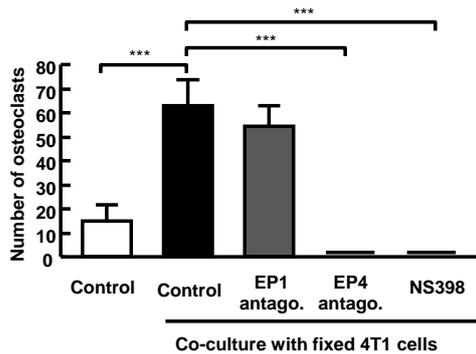
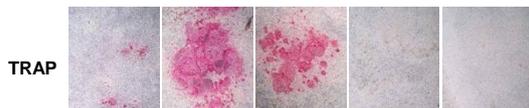


図3. 乳がん細胞との接着による破骨細胞分化の誘導とEP4阻害剤による抑制

### (3) 前立腺がんの転移解析と創薬展開

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した PC3 細胞をマウス心臓に移入し、経日的に全身への転移を観察した。ルシフェリン投与による発光検出した結果、転移巣では明瞭な発光を検出した (図 4 A)。軟エックス線解析も実施したところ、骨転移の転移巣を明

瞭に検出し、その転移巣では骨破壊が認められた。骨転移巣を有する骨を採取し、マイクロ CT を用いた骨 3 次元解析を実施した結果、転移巣では、激しい骨破壊が進行し、皮質骨と海綿骨の両方で骨吸収による骨量減少と骨穿孔が認められた (図 4 B)。骨切片を作成して TRAP 染色による形態観察を行なったところ、転移巣では、がん細胞の増殖と骨吸収を認めた。この骨転移に伴う骨破壊は、EP4 アンタゴニストの経口投与により顕著に改善し、発光検出による転移巣の数も減少し、骨破壊も認められなかった (図 4)。

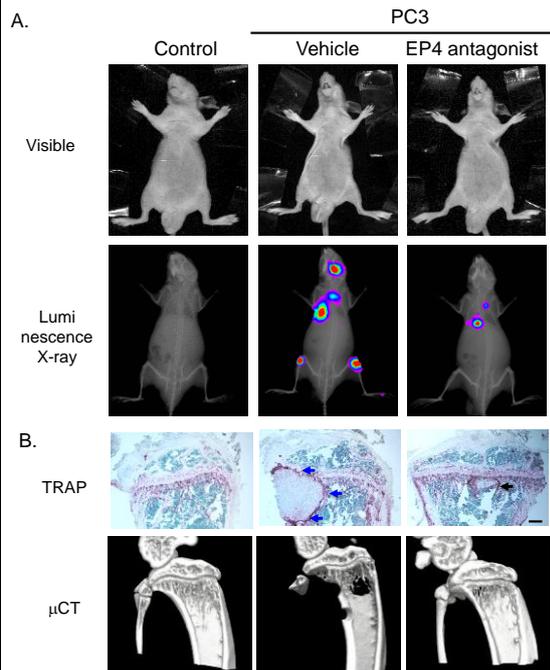


図4. 前立腺がんPC3の全身転移と骨転移巣  
A. 全身転移の発光検出 B. 骨転移巣の骨破壊

### 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 18 件 抜粋 10 件)

- ① Shimizu M, Noda H, Joyashiki E, Nakagawa C, Asanuma K, Hayasaka A, Kato M, Nanami M, Inada M, Miyaura C, Tamura T. The optimal duration of PTH(1-34) infusion is one hour per day to increase bone mass in rats. *Biol Pharm Bull.* 39(4):625-630. 2016 doi: 10.1248/bpb.b15-00756. 査読有
- ② Muhammad Shahzad Anjam; Yvonne Ludwig, Frank Hochholdinger, Chisato Miyaura, Masaki Inada, Shahid Siddique, Florian M.W. Grundler.; An improved procedure for isolation of high-quality RNA from nematode-infected Arabidopsis roots through laser capture microdissection. *Plant Methods* (2016)

- 12:25:2-9, 2016. doi: 10.1186/s13007-016-0123-9. 査読有
- ③ Inada M, Takita M, Yokoyama S, Watanabe K, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Maru Y, Maruyama T, Sugimoto Y, Narumiya S, Uematsu S, Akira S, Murphy G, Nagase H, Miyaura C: Direct Melanoma Cell Contact Induces Stromal Cell Autocrine Prostaglandin E2-EP4 Receptor Signaling that Drives Tumor Growth, Angiogenesis and Metastasis. *J. Biol. Chem.* 290(50):29781-29793, 2015. doi: 10.1074/jbc.M115.669481. 査読有
- ④ Nishide Y, Tousen Y, Tadaishi M, Inada M, Miyaura C, Kruger MC, Ishimi Y\*: Combined effects of soy isoflavones and  $\beta$ -carotene on osteoblast differentiation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12(11):13750-61. 2015 doi: 10.3390/ijerph121113750. 査読有
- ⑤ Hirata J, Hirai K, Asai H, Matsumoto C, Inada M, Miyaura C, Yamato H, Watanabe-Akanuma M: Indoxyl sulfate exacerbates low bone turnover induced by parathyroidectomy in young adult rats. *Bone* 79, 252 - 253, 2015 doi: 10.1016/j.bone.2015.06.010. 査読有
- ⑥ Tominari T, Matsumoto C, Watanabe K, Hirata M, Florian M.W. Grundler, Miyaura C, Inada M: Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory bone resorption, and protects against alveolar bone loss in mice. *FEBS Open Bio* 5: 522-527, 2015. doi: 10.1016/j.fob.2015.06.003. 査読有
- ⑦ Matsumoto C, Inoue H, Tominari T, Watanabe K, Hirata M, Miyaura C\*, Inada M: Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, suppresses inflammatory osteoclastogenesis and alveolar bone resorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79(1):155-8. 2015 doi: 10.1080/09168451.2014.952616. 査読有
- ⑧ Nishide Y, Tadaishi M, Kobori M, Tousen Y, Kato M, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y\*: Possible role of S-equol on bone loss via amelioration of inflammatory indices in ovariectomized mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 53(1):41-48. 2013 doi: 10.3164/jcfn.12-123. 査読有
- ⑨ Matsumoto C, Ashida N, Yokoyama S, Tominari T, Hirata M, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Inada M, Miyaura C\*: The protective effects of  $\beta$ -cryptoxanthin on inflammatory bone resorption in a mouse experimental model of periodontitis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77(4):860-862, 2013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+protective+effects+of+%CE%B2-cryptoxanthin+on+inflammatory+bone+resorption+in+a+mouse+experimental+model+of+periodontitis>. 査読有
- ⑩ Nishide Y, Tousen Y, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y\*: Bi-phasic effect of equol on adipocyte differentiation of MC3T3-L1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77(1):201-204, 2013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bi-phasic+effect+of+equol+on+adipocyte+differentiation+of+MC3T3-L1+cells>. 査読有
- [学会発表] (計 87 件 抜粋 7 件)
- ① 亀井雄介、渡邊健太、平田美智子、稲田全規、宮浦千里: PGE2 による前立腺癌細胞の移動調節作用 2015 年 12 月 2 日 (2015 年 12 月 1 日 (火)~4 日 (金)) 2P1119 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸)
- ② 渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規: 前立腺癌の浸潤と転移における 3 型コラゲナーゼ/MMP13 の関与 第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会 2015 年 7 月 23 日 (木)~24 日 (金) シティプラザ大阪、大阪
- ③ 丸山智佳子、渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規: 前立腺癌の増殖とアンドロゲン受容体拮抗薬の作用 2014 年 10 月 17 日 (2014 年 10 月 15 日 (水)~18 日 (土)) 第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都、京都
- ④ Watanabe K, Matsumoto C, Hirata M, Maruyama T, Inada M, Miyaura C: “Effects of PGE2 receptor EP4 antagonist on breast cancer-induced bone metastasis and bone destruction in the metastasis region” Session: Poster Session III & Poster Tours ASBMR2014(2014, September 14, 12:30 PM - 02:30 PM / Discovery Hall-Hall E/George R. Brown Convention Center Houston, U. S. A
- ⑤ 渡邊健太、松本千穂、平田美智子、丸山隆幸、稲田全規、宮浦千里: 乳癌の骨転移と骨破壊における PGE 受容体 EP4 アンタゴニストの効果 第 32 回日

本骨代謝学会学術集会 0-047 口演  
8 癌と骨病変／顎口腔病変 2014 年  
7 月 25 日 (金) 16:10~17:00 大阪国  
際会議場、大阪

- ⑥ Yokoyama S, Watanabe K, Hirata M,  
Matsumoto C, Maruyama T, Miyaura C,  
Inada M: PGE2 receptor EP4  
regulates breast cancer metastasis  
and bone resorption through  
osteoblastic RANKL production.  
ASBMR 2013 Annual Meeting, October  
4-7, 2013 Baltimore Convention  
Center in Baltimore, Maryland,  
U. S. A.
- ⑦ 横山智史、松本千穂、平田美智子、丸  
山隆幸、稲田全規、宮浦千里：EP4 受  
容体は骨芽細胞の RANKL 発現を介して  
乳癌の骨吸収を制御する 2013 年 9 月  
12 日 (2013 年 9 月 11 日 (水) ~13 日  
(金)) 第 86 回日本生化学会大会 パ  
シフィコ横浜、横浜

〔図書〕 (計 7 件 抜粋 3 件)

- ① 稲田全規、宮浦千里：がんの増殖と転  
移におけるプロスタグランジン E の関  
与と創薬展開 別冊 BIO Clinica Vol  
5. No.1 172 (pp147-151), 2016
- ② 稲田全規：骨ペディア 骨疾患・骨代  
謝キーワード事典 日本骨代謝学会  
Keyword(5) MMP/TIMP 328  
(pp184-185), 2015
- ③ 稲田全規、松本千穂、宮浦千里：THE  
BONE VOL.28 NO.4 特集『ステロイ  
ドホルモンと骨 -基礎から臨床ま  
で』Ⅱ. 性ステロイドと骨代謝 2. エ  
ストロゲンと骨代謝 124 (pp49-55),  
2014

〔産業財産権〕

○出願状況  
なし

○取得状況 (計 3 件 抜粋 2 件)  
名称：骨疾患予防又は治療用組成物  
発明者：宮浦千里、稲田全規  
権利者：国立大学法人東京農工大学  
種類：特許  
番号：特許第 5846350 号  
取得年月日：平成 27 年 12 月 4 日  
国内外の別：国内

名称：経口摂取が可能な天然成分由来  
の抗がん剤  
発明者：稲田全規、宮浦千里、  
権利者：国立大学法人東京農工大学  
種類：特許  
番号：特許第 5288397 号  
取得年月日：平成 25 年 6 月 14 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮浦千里 (MIYAURA, CHISATO)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：20138382

(2) 研究分担者

稲田全規 (INADA, MASAKI)  
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：80401454

平田美智子 (HIRATA, MICHIKO)  
東京農工大学・大学院工学研究院・講師  
研究者番号：40544060

(3) 連携研究者

なし