

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462356

研究課題名(和文)新規癌骨転移決定因子の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)An exploratory study on a novel factor related to the decision of bone metastasis

研究代表者

灌口 総一 (Takiguchi, Soichi)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・研究員

研究者番号：00280793

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)：癌骨転移を決定する新規因子を探索するため、ヒト肺癌細胞株(HARA)を用いて、マウス骨転移モデルにより高骨転移クローン(HARA-B4)を樹立した。次に、HARAとHARA-B4において遺伝子発現を網羅的に解析した結果、骨転移性との関連が新規のケモカインCXCL14が選択された。CXCL14は、癌細胞での発現と癌悪性度の指標である足場非依存性増殖能との相関性、および骨髄細胞が癌細胞へ向かう走化性において促進効果があることが観察された。更に、ヒト肺癌の臨床検体においても、骨転移細胞および間質細胞におけるCXCL14の高発現が複数例で観察された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular mechanisms of lung cancer-induced bone metastasis, we established a bone-seeking subclone (HARA-B4) from a human squamous lung cancer cell line (HARA) using an in vivo selection method. From the comparison of comprehensive gene expression profiles between HARA and HARA-B4, we identified CXC chemokine ligand 14 (CXCL14) as a critical factor for the formation of bone metastasis. CXCL14 was expressed 5-fold greater in HARA-B4 than in HARA, and shown to be involved in the anchorage-independent growth of cancer cells, and enhancement of cancer cell tropism to the bone possibly by the recruitment of bone marrow cells to cancer cells. Furthermore, in clinical specimens of lung cancer-induced bone metastasis, expression of CXCL14 was observed in the tumor cells infiltrated in bone marrow in all specimens examined.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨転移 ケモカイン 走化性 足場非依存性増殖

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 転移は肝、肺転移と同じ血行性転移で、肺癌、乳癌、前立腺癌、メラノーマなどで高率に認められる。骨転移により、耐え難い骨痛、病的骨折、神経症状、運動制限、高カルシウム血症などを引き起こされ、通常の抗がん療法が効果を奏し難い。よって、骨転移の成立過程を明らかにし、その理論に基づいた分子標的治療薬の開発を行うことが急務である。

(2) 骨転移は癌細胞が標的臓器に移動した後、さらに骨といった硬い臓器に浸潤する過程が必要であり、これが骨転移の特異な点である。この過程の分子機構については長い間不明であり、以前はがん細胞が直接骨を破壊すると考えられていた。しかし近年がん細胞が骨を直接破壊するのではなく、がん細胞で産生されるサイトカインが骨芽細胞を介して破骨細胞を活性化し、その結果、破骨細胞による骨吸収亢進によって骨を破壊するという作用機序が明らかとなった(図1)。

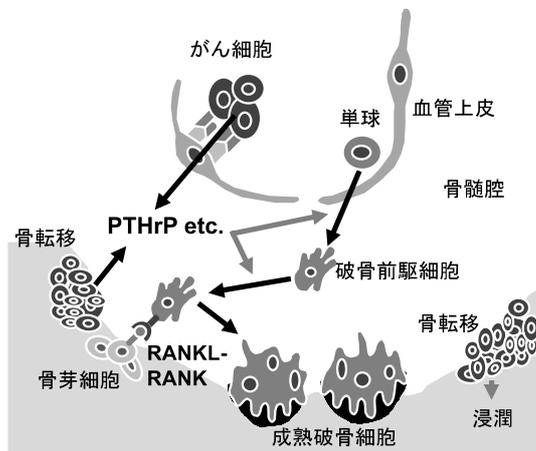


図1：骨転移を制御するサイトカイン

### 2. 研究の目的

(1) 癌細胞が発現する骨転移を決定する新規因子を探索し、その作用メカニズムを解明すること。

(2) 新規骨転移決定因子を標的とした創薬、臨床応用へと展開するための研究基盤を確立すること。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト肺癌細胞株によるヌードマウス骨転移モデルを使用して、骨に高率かつ特異的に転移を起こす高骨転移クローンを作成する。

(2) 親株と高骨転移クローンの間での、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析して、高骨転移クローンで発現が高くなった遺伝子群をピックアップする。

(3) 骨転移の特殊性を再現した *in vitro* および *in vivo* の解析系により新規骨転移決定因

子の同定を行う。

(4) ヒトの癌臨床サンプルを使用して、新規骨転移決定因子の発現解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) 癌骨転移を決定する新規因子を探索するため、ヒト肺癌細胞株 (HARA) を用いて、ヌードマウス骨転移モデルにより高骨転移クローン (HARA-B4) を樹立した。HARA-B4 を心腔内に接種したマウスでは、4週後に下肢に多くの骨転移巣 ( $15.5 \pm 3.7$  個 / マウス) が X 線撮影で確認されたのに対し、HARA を接種したマウスでは骨転移巣は確認出来なかった。しかし、解剖時に HARA 接種マウスでは全例に見られた副腎転移が、HARA-B4 接種マウスでは見られなかった。このことより HARA-B4 は、親株 (HARA) と比較して、骨転移性および骨指向性が高くなっていると考えられた。

(2) HARA および HARA-B4 における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、HARA-B4 で発現量が 5 倍以上増加した遺伝子として、骨転移との関連が既知の PTHrP、MMP2 などが選択されたが、骨転移との関連が未知のケモカイン CXCL14 も選択されたため、以降の実験では CXCL14 を中心に解析を進めることとした。

(3) ニードマウス骨転移モデルを使用して、CXCL14 を siRNA によりノックダウンした HARA-B4 を心腔内接種した場合、対照群を比べて 4 週後に下肢できた骨転移巣は、半分に減少した。それに対し副腎転移は、全例で観察された。このことより HARA-B4 の骨転移性および骨指向性は、CXCL14 の発現量と相関性があることが示唆された。

次に、癌細胞の悪性度の指標である足場非依存性増殖能における CXCL14 の関与を検討した。まず、HARA-B4 では足場非依存性増殖能が HARA と比べて 5 倍以上高いことが判明した。さらに HARA-B4 において CXCL14 をノックダウンした場合、足場非依存性増殖能は HARA のレベル以下に低下した。このことより、HARA-B4 細胞では、足場非依存性増殖能と CXCL14 の発現量には相関性があると考えられる。

次に、骨芽細胞 (MC3T3-E1) および破骨細胞 (RAW264.7) と、HARA-B4 との相互作用における CXCL14 の関与を検討した。ケモタキシスチャンパーを用いて、上層に MC3T3-E1 または RAW264.7 を入れ、下層に HARA または HARA-B4 を入れた場合、上層の細胞の移動度は、いずれの場合も下層に HARA-B4 を入れた場合に大きかった。また、CXCL14 をノックダウンした HARA-B4

を下層に入れた場合、上層の細胞の移動度は下層に HARA を入れた場合と同程度まで低下した。以上より、骨芽細胞 (MC3T3-E1) および破骨細胞 (RAW264.7)の走化性と、誘引する HARA-B4 における CXCL14 の発現量には、相関性があると考えられる。

(4) ヒト肺癌の臨床検体において、骨転移細胞および間質細胞における CXCL14 の高発現が 7 例中全例で観察された。

以上より、CXCL14 は肺癌細胞の骨転移性および骨指向性に、正の関与をしている可能性が示唆される。そのメカニズムとしては、癌細胞が骨髄腔に侵入した後に骨転移巣を形成するため、骨髄細胞(骨芽細胞、破骨細胞)を誘引する過程の促進であると考えられる。したがって CXCL14 は骨転移の治療標的として有望であると考えられる(図 2)。

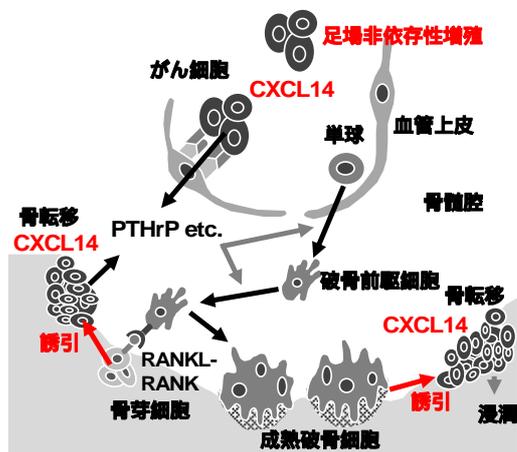


図 2: 骨転移を制御するケモカイン CXCL14

## 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)

Nishimura Y, Hyuga S, Takiguchi S, Hyuga M, Itoh K, Hanawa T. Ephedrae herba stimulates hepatocyte growth factor-induced MET endocytosis and downregulation via early/late endocytic pathways in gefitinib-resistant human lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 48: 1895-1906, 2016.

DOI: 10.3892/ijo.2016.3426.

査読: 有

Nishimura Y, Takiguchi S, Ito S, Itoh K. EGF-stimulated AKT activation is mediated by EGFR recycling via an early endocytic pathway in a gefitinib-resistant human lung cancer cell line. *Int. J. Oncol.* 46: 1721-1729, 2015.

DOI: 10.3892/ijo.2015.2871

査読: 有

Matsusue K, Aibara D, Hayafuchi R, Matsuo K, Takiguchi S, Suzuki T, Gonzalez FJ, Yamano S. Hepatic PPAR and LXR independently regulate lipid accumulation in the livers of genetically obese mice. *FEBS Lett.* 588: 2277-2281, 2014.

DOI: 10.1016/j.febslet.2014.05.012

査読: 有

Takiguchi S, Korenaga N, Inoue K, Sugi E, Kataoka Y, Matsusue K, Futagami K, Li YJ, Kukita T, Teramoto N, Iguchi H. Involvement of CXCL14 in osteolytic bone metastasis from lung cancer. *Int. J. Oncol.* 44: 1316-1324, 2014.

DOI: 10.3892/ijo.2014.2293

査読: 有

Nishimura Y, Takiguchi S, Ito S, Itoh K. Evidence that depletion of the sorting nexin SNX1 by siRNA promotes HGF-induced MET endocytosis and MET phosphorylation in a gefitinib-resistant human lung cancer cell line. *Int. J. Oncol.* 44: 412-426, 2014.

DOI: 10.3892/ijo.2013.2194

査読: 有

Aibara D, Matsusue K, Matsuo K, Takiguchi S, Gonzalez FJ, Yamano S. Expression of Hepatic Fat-Specific Protein 27 Depends on the Specific Etiology of Fatty Liver. *Biol. Pharm. Bull.* 36: 1766-1772, 2013.

DOI: 10.1248/bpb.b13-00351

査読: 有

[学会発表](計 3 件)

瀧口総一, 井上和子, 松末公彦, 寺本典弘, 井口東郎: 肺がん腹膜播種に対する c-Met 阻害剤 (crizotinib) の効果: 第 74 回日本癌学会学術総会 2015.10.8-2015.10.10, 名古屋 (示説)

瀧口総一, 井上和子, 松末公彦, 寺本典弘, 井口東郎: Involvement of CXCL14 in osteolytic bone metastasis~癌骨転移形成におけるケモカインCXCL14の役割の解析~: CXCL14の役割: 第73回日本癌学会学術総会 2014.9.25-2014.9.27, 横浜 (示説)

瀧口総一, 井上和子, 片岡泰文, 松末公彦, 寺本典弘, 井口東郎: Involvement of CXCL14 in osteolytic bone metastasis~癌骨転移の新規分子機構の解明~: CXCL14の役割: 第 72 回日本癌学会学術総会

2013.10.3-2013.10.5, 横浜 (示説)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧口 総一 (TAKIGUCHI, Soichi)  
九州がんセンター・臨床研究センター・研究員  
研究者番号: 00280793

(2) 研究分担者

井口 東郎 (IGUCHI, Haruo)  
四国がんセンター・臨床研究センター・顧問  
研究者番号: 90393438

(3) 連携研究者

松末 公彦 (MATSUSUE, Kimihiko)  
福岡大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 10389364