

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861304

研究課題名(和文) Cathepsin Kの癌骨転移と腫瘍進展における役割

研究課題名(英文) The role of Cathepsin K in bone metastasis and tumor progression

研究代表者

小澤 英史 (KOZAWA, Eiji)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：60635572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：CatKは骨転移の際に破骨細胞や腫瘍細胞、腫瘍周囲にあるマクロファージや線維芽細胞から産生され、骨基質破壊において重要な役割を担うと考えられている。今回我々はマウス骨転移モデルを作製するために、MDA-MB-231乳癌細胞とLewis肺癌細胞をマウスの脛骨に注射して、脛骨に溶骨性病変が形成されるのを確認した。2週間と4週間目にレントゲン撮影を行い、骨破壊が2週間で進行した。組織を採取して組織染色を行ったが優位な差はみられなかった。

カテプシン類の発現をみるため、ヒト変形性股関節症(OA)の軟骨と滑膜における発現を調べた。OAでは明らかにCa²⁺発現の上昇が確認された。

研究成果の概要(英文)：CatK synthesized by osteoclasts and/or tumor cells, tumor microenvironmental macrophage/ fibroblasts to be an obvious candidate for a key enzyme involved in the destruction of bone matrix.

To establish a murine bone metastasis model, a needle with syringe was used to inject MDA-MB-231 cells and Lewis lung cancer cells into the tibia of mice. Osteolytic lesions progressed markedly at tibia of mice. Scion image analysis revealed that the size of the osteolytic increased from 2 to 4 weeks. The expansion of bone lytic areas of tibia with Lewis lung cancer progressed rapidly for 2 weeks. Histological stain for bone tumor was performed.

To investigate the expression of Cathepsins, histological stain was performed on human cartilage and synovium. Increased expression of CatK in human OA cartilages/chondrocytes and synovial cells, compared with control cartilages/chondrocytes and synovial cells. Moreover, enzymatically activated CatK was also upregulated in OA chondrocytes.

研究分野：整形外科学

キーワード：腫瘍 カテプシンK 癌骨転移 遠隔転移 細胞・組織 軟骨・滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の骨転移は対し破骨細胞を制御する製剤が臨床で使用され、その効果が確認され、骨転移症例の骨関連事象が減少し QOL 維持に重要な役割を果たしている。破骨細胞からは蛋白分解酵素である Cathepsin K (CatK) が産生され、それを抑制することにより同様な効果が期待されている。さらに、CatK は癌細胞にも存在し、腫瘍細胞の移動能にも関与していることが報告されている。腫瘍間質の腫瘍関連マクロファージ (TAM) や腫瘍関連線維芽細胞 (TAF) から CatK が産生され、骨転移巣の形成や拡大に重要な役割を果たすことが解明されてきている。癌患者に対し CatK を阻害すると破骨細胞から産生される CatK 抑制効果による骨関連事象の減少や骨破壊進行の抑制が期待され、腫瘍細胞や腫瘍間質細胞から産生される CatK を制御できれば、腫瘍の進展も抑制するような抗腫瘍効果も期待される。CatK 阻害剤はすでに骨粗鬆症治療剤として第 II 層試験が行われている。

(2) 乳癌や肺癌、前立腺癌において腫瘍細胞に CatK が存在していることが確認されているが、乳癌ではサブタイプごとに発現がことなる報告もあり、サブタイプごとの発現の違いはわかっていない。腫瘍微小環境において炎症反応、血管新生、免疫制御、遠隔転移、血管侵入、がん細胞浸潤などに関与する腫瘍随伴マクロファージ (TAM) の役割が報告され、CatK が発現している。ここで CatK がどのような働きをし、骨転移や骨破壊にどのように関与しているか、また予後との関係は解明されていない。

(3) CatK は様々な疾患への関与が報告され、整形外科領域においては変形性関節症に関与している報告がある。我々は Ctsk 欠損マウスにおいて変形性膝関節症進行が抑制されることを報告した。ヒト変形性関節症にお

いても発現上昇が報告されていたが、軟骨や滑膜組織における局在や発現の程度は十分に調べられていなかった。CatK が変形性関節症に関与していれば、CTK 阻害剤がその進行抑制に有効である可能性も期待される。

2. 研究の目的

(1) 肺癌や乳癌、前立腺癌における CatK の発現や局在、発現している細胞の種類を調べること。

(2) CatK が乳癌や肺癌で骨転移に果たす役割を解析することにより、現在、治験が進んでいる CatK 阻害剤などの CatK を標的とした新規骨転移治療法の開発における基礎的データを蓄積すること。

(3) 更に整形外科代表的疾患である変形性関節症の進行にも CatK の関与が報告されており、CatK 阻害剤の効果における基礎的データを蓄積すること。

3. 研究の方法

ヌードマウスや Ctsk^{-/-}と Ctsk^{+/+}マウスの脛骨に腫瘍を接種して骨転移モデルを作製し、マウス間における腫瘍増大や破骨細胞について検討した。

(1) 癌骨転移マウスモデルの作製

肺癌と乳癌細胞を使用して骨転移マウスモデルを作製し、破骨細胞や腫瘍細胞から産生される CatK の役割を明らかにすることだった。最初に C57BL/6 野生型マウスに癌細胞を右脛骨内に注射し骨転移モデルを作成して骨破壊の経過を観察した。

(2) 骨転移部位の評価

軟 X 線にて右脛骨に溶骨性転移巣が形成されたことを確認し、1 週間ごとに撮影し溶骨部の大きさを測定した。組織学的検討は還流固

定後、パラフィン切片を作成し CatK、RANKL、TRAP による破骨細胞染色、RANK、OPG、PTHrp を染色し、細胞の局在や形態、腫瘍内や周囲など染色される細胞の局在をしらべた。

(3) 正常組織における CatK と Cathepsin 類の発現をみるためにヒト大腿骨骨頭軟骨と股関節滑膜細胞を採取した。大腿骨頸部骨折にて人工骨頭置換術を施行した際に採取した大腿骨骨頭軟骨をコントロール群として、変形性股関節症にて人工関節置換術を行った際に採取した大腿骨骨頭軟骨を変形性関節症群とした。一緒に滑膜組織も採取した。軟骨は免疫染色し染色細胞数を数えた。また、軟骨を酵素で分解し軟骨細胞を採取しアルジネートゲルで3次元培養したのち、細胞を処理して real-time PCR にて mRNA、ELISA にて蛋白発現を解析した。Magic red CatK キットにて細胞内の CatK 酵素活性を発光の違いとして検出した。組織培養モデルとして骨頭から剥がした軟骨組織を 5mm 厚の切片として IL-1 β で濃度依存性に刺激し、CatK 発現を免疫染色と real-time PCR による mRNA 発現により解析した。

4. 研究成果

(1) 最初に 7 週齢雌の野生型マウス (C57BL/6) の脛骨にルイス肺癌細胞を注射し骨転移モデルを作った。投与後 2 週間でレントゲン上骨病変が確認できたものを採用し、4 週間目でレントゲン撮影と組織を採取した (図 1)。次に Ctsk $^{-/-}$ と Ctsk $^{+/+}$ マウスの脛骨に同様に肺癌細胞を摂取したが、CatK 欠損マウスでも腫瘍の進行がはやく、脛骨が残らないほど骨破壊が進行したものもみられ、Image J による溶骨性病変の範囲を比較したが差をみとめなかった。

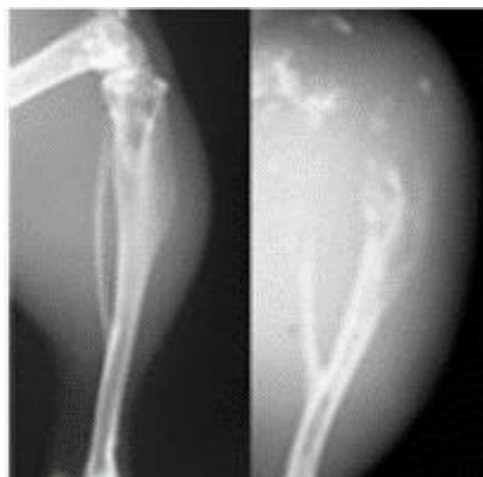


図 1.

ルイス肺癌細胞をマウスの脛骨に注射し 2 週間後 (左) に軟エックス線にて溶骨性病変を確認し、4 週間後に組織を採取した (右)。

組織による骨破壊の評価、CatK、RANKL、TRAP による破骨細胞染色、RANK、OPG、PTHrp を染色し、細胞の局在や形態、腫瘍内や周囲など染色される細胞の局在をしらべたが、明らかな違いを認めなかった。

そこで、MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞を 4 週齢 BALB/C nu/nu mice の脛骨に同様に注射して摂取した。2 週間で溶骨性病変を形成したものを 4 週間目に組織採取した (図 2)。



図 2.

MDA-MB-231 をマウスの脛骨に注射し 2 週間後 (左) に軟エックス線にて溶骨性病変を確認し、4 週間後に組織を採取した (右)。

CatK 免疫染色し腫瘍内に染色される細胞を確認し、破壊された骨周囲に破骨細胞を多く認めた。今後 CatK 阻害効果のある薬剤を投

与して違いを比較して、 μ CTでの骨破壊の評価も予定していた。

(2) ヒト軟骨・滑膜細胞に CatK が存在することがわかり、ヒトの関節より軟骨・滑膜組織を採取し mRNA と蛋白の発現を解析した。結果、ヒトの変形性股関節症では軟骨と滑膜細胞から CatK が多く発現しており、これらの疾患の進行への関与が疑われた。

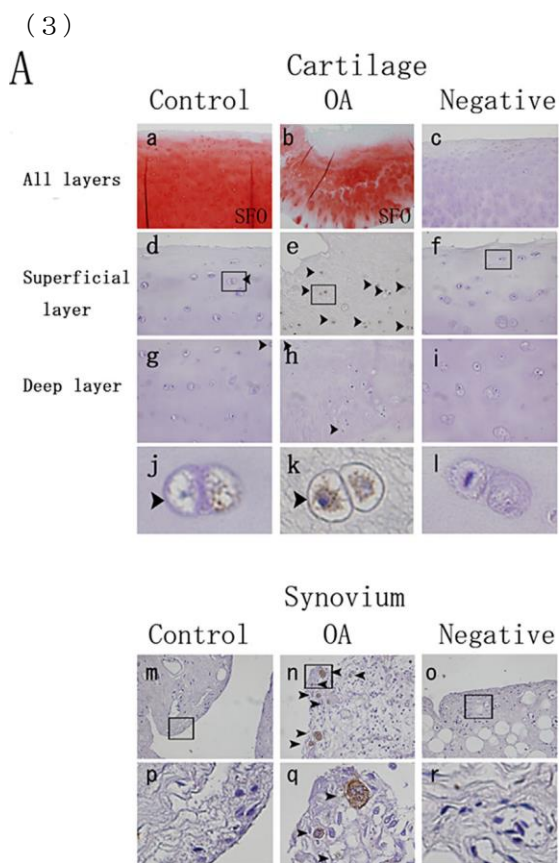


図 3.
(A) 大腿骨骨頭軟骨 (コントロール) と変形性股関節症 (OA) 軟骨に対し CatK 免疫染色を行った (a-l)。また、同様に滑膜も免疫染色した (m-r)。軟骨組織をサフラニン O 染色した (a: コントロール軟骨, b: OA 軟骨)。d と e, f は軟骨表層で、g と h, i は軟骨深層であり j と k, l はそれぞれ d と e, f の拡大像を示した。CatK は軟骨細胞に染色されていることがわかった (矢頭)。特に軟骨表層において軟骨細胞が強く染色され、損傷のある部

位に存在する軟骨はよく染色されていた (m-r)。滑膜組織 (m と n, o) と拡大像 (p と q, r) を示す。特に OA の滑膜内にある多核巨細胞と線維芽細胞が CatK に強く染色された (矢頭)。

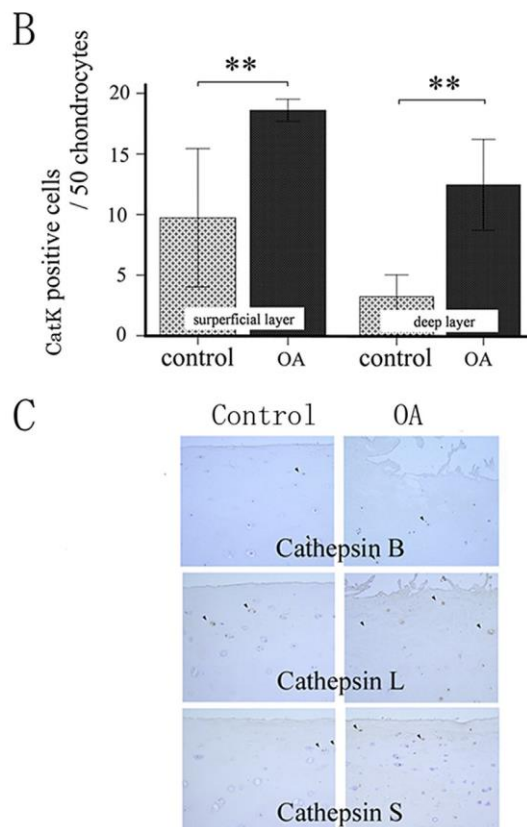


図 4.
(B) CatK 陽性細胞 (/50 軟骨細胞) を 3 つの異なる箇所で集計した。コントロールと比べて明らかに染色された軟骨細胞数が多くみられた (mean ± SD; **p < 0.01)。
(C) CatB と CatL, CatS の免疫染色を行い、軟骨細胞にわずかに染色されるのみであることを確認した。

(4) OA 軟骨とコントロール軟骨における Cathepsins と抑制剤である cystatine C の mRNA 発現を調べた。酵素処理して軟骨細胞を採取したのち、アルジネートビーズとして 3 次元培養した。軟骨細胞を用いて real-time RT-PCR にて mRNA 発現レベルを解析した。

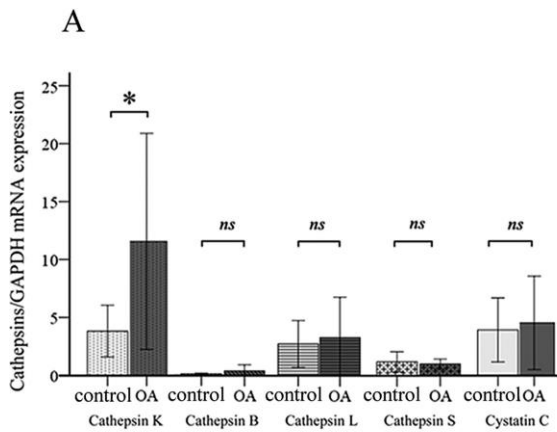


図 5.

(A) CatK の発現レベルはコントロール軟骨と比べて OA 軟骨で明らかに上昇していた (* $p=0.043$; ns, not significant)。

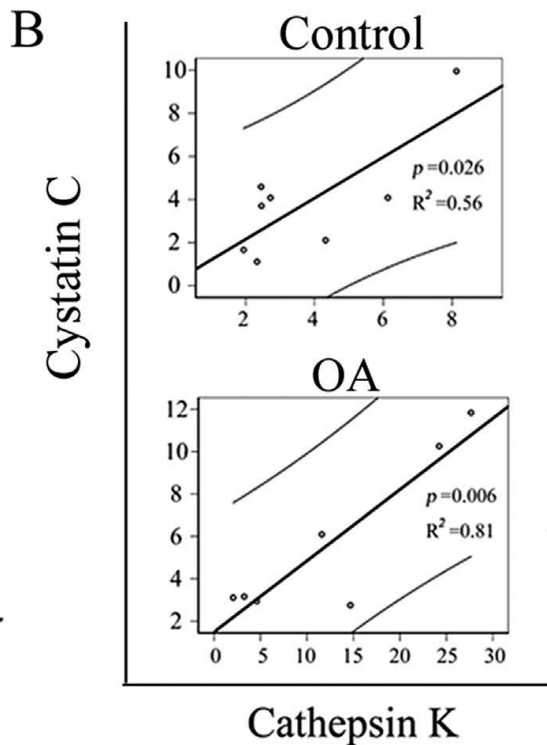


図 6.

(B) CatK と CysC の mRNA 発現の関係を Pearson's test で解析した。CatK と CysC mRNA 発現レベルは OA 軟骨で強い相関を示した ($p=0.006$, $R^2=0.81$)。コントロール軟骨においても相関はみられた ($p=0.026$, $R^2=0.56$)。

(5) 軟骨細胞内の CatK 蛋白量と酵素活性をしらべた。

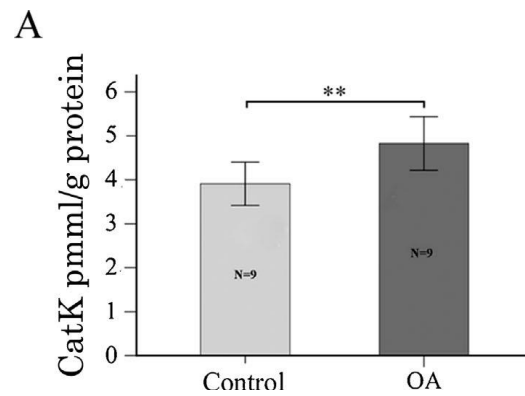


図 7.

(A) ELISA にて軟骨細胞内の蛋白濃度を測定し、コントロール軟骨 (3.91 pmol/g protein) と OA 軟骨 (4.83 pmol/g protein) で比較したところ明らかに OA 軟骨における CatK 蛋白濃度が上昇していた ($p=0.001$)。

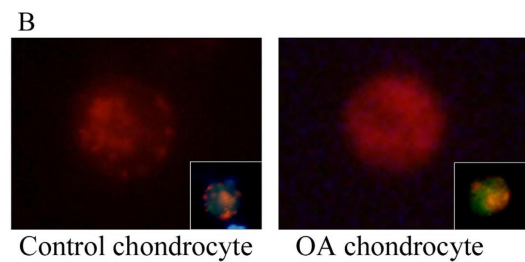


図 8.

(B) CatK の細胞内酵素活性をみるために Magic Red™ CatK kit を用いて軟骨を染色した。OA 軟骨細胞では明らかに赤く発光する細胞が多くみられ、OA 軟骨細胞内には活性化された CatK が多いことがわかった。

(6) コントロール軟骨の組織片培養を行い、IL-1 β で刺激して CatK 発現の反応を調べた。

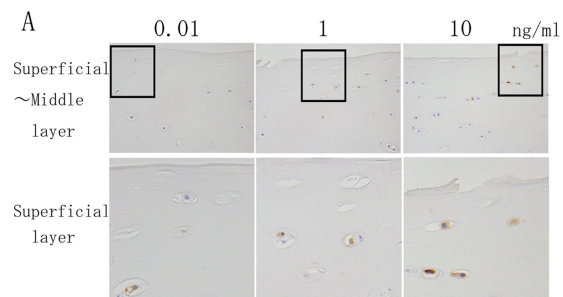


図 9.

(A) 上段には軟骨組織を CatK 免疫染色したものを、下段には軟骨組織表層を拡大したも

のを示した。IL-1 β で刺激したところ濃度依存性に CatK の染色性が強くなり、IL-1 β により CatK 発現が強くなることがわかった。

B

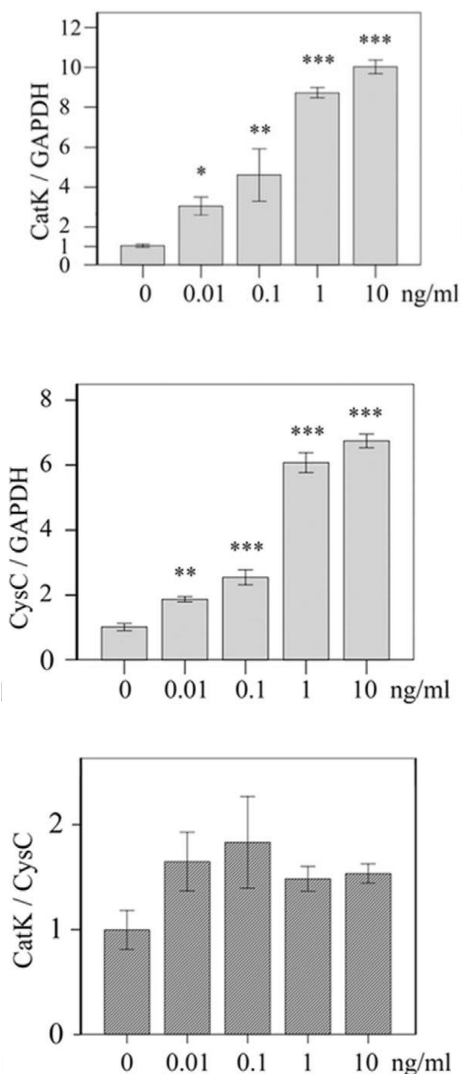


図 10.

(B) CatK と CysC の mRNA 発現も IL-1 β の濃度依存性に上昇していた。CatK/CysC 比は大きく変わらなかった (mean SD; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001)。

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 1 件)

Increased expression and activation of cathepsin K in human osteoarthritic cartilage and synovial tissues.

Kozawa E, Cheng XW, Urakawa H, Arai E, Yamada Y, Kitamura S, Sato K, Kuzuya M, Ishiguro N, Nishida Y.

J Orthop Res. 査読有り

2016 Jan;34(1):127-34.

doi: 10.1002/jor.23005.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 英史 (KOZAWA, Eiji)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 60635572

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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: 50332698

浦川 浩 (URAKAWA, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号: 60584753

生田 国大 (IKUTA, Kunihiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 40732657

濱田 俊介 (HAMADA, Shunsuke)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 90747289