

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861341

研究課題名(和文)骨・造血作動薬による骨・造血系への相互作用

研究課題名(英文) Bone and hematological regulation by their modulators

研究代表者

宮本 佳奈 (Miyamoto, Kana)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：60464997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々はTNF α が骨肉腫細胞株、AX細胞の腫瘍形成に必須であることを見出した。AX細胞はガン遺伝子であるc-MycをInk4a欠損マウス由来の間葉系細胞に導入し作製した細胞で、野生型マウスの腹腔内移植により約21日以内に腫瘍死をまねくモデルである。このモデルにおいて我々は、腫瘍周辺にマクロファージが浸潤し、TNF α を発現することを見出した。TNF α 欠損マウスではAX細胞による腫瘍形成や腫瘍死が完全にキャンセルされた。我々はTNF α がAX細胞における骨芽細胞系分子の発現を抑制すること、この抑制はTNF α 阻害剤あるいはERK阻害剤の投与によってキャンセルされることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We found that tumor necrosis factor alpha (TNF α) is required for tumorigenesis of an osteosarcoma cell line, AX cells. AX cells were generated by transducing c-Myc oncogene into Ink4a-deficient mesenchymal stem cells. Transplantation of AX cells into wild-type mouse peritoneal cavity resulted in tumorigenesis leading to mortality within 21 days. We found that TNF α -expressing macrophages were recruited to tumor lesions, and lethal tumor development was not observed in TNF α -deficient mice, suggesting that TNF α is required for tumorigenesis of AX cells. Osteoblastic gene expression was significantly inhibited in AX cells by TNF α , and such inhibition was reversed by addition of either a TNF α -inhibitor or a MEK thereby ERK inhibitor. These results suggest that the undifferentiated state of AX cells was the TNF α -ERK pathway dependent.

研究分野：血液内科学

キーワード：腫瘍 骨代謝 腫瘍医学

1. 研究開始当初の背景

造血は骨髄組織で生まれ、造血幹細胞 (HSC) を維持するための“ニッチ”とよばれる特殊な領域も骨髄中にあることが示されていることから、骨へ作動する薬剤は造血系へ、逆に造血系へ作動する薬剤は骨代謝へ影響を及ぼす可能性が考えられた。確かに、破骨細胞分化が部分的に抑制される遺伝子改変マウスを用いた HSC の末梢への動員実験では、それが抑制されることが示されていた。しかし、申請者は、破骨細胞分化が完全に、あるいはほぼ完全に抑制される 3 種類の独立した遺伝子改変マウスを用いて、末梢への HSC の動員実験を実施したところ、HSC の末梢への動員は抑制されないことを見出した (J Exp Med 2011)。さらに、破骨細胞を強力に抑制する薬剤であるビスホスホネート系の薬剤である Alendronate や、破骨細胞分化に必須のサイトカインである receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) に対する中和抗体を投与しても、HSC の末梢への動員は抑制されないことを見出していた (J Exp Med 2011)。しかし、他の骨作動性の薬剤も造血系へ影響しないのか、あるいは逆に造血系の薬剤が骨に影響しないのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、造血系への作動薬の骨組織への影響、あるいは逆に骨への作動薬の造血系への影響について解析することを目的とした。このことにより、骨あるいは造血系への作動薬投与によって、お互いにどのような影響を受けるのか、あるいはその作用は無視できるものなのかを検証する。

3. 研究の方法

本研究では、造血系の中でも特に免疫系へ作用する薬剤について、骨への影響を解析することを目的とした。免疫系への作動薬としては関節リウマチやクローン病の治療剤として用いられる tumor necrosis factor 1 alpha (TNF α) 抑制薬を取り上げ、骨としては、造骨性の腫瘍として知られる骨肉腫への作用を検討することとした。

骨肉腫用細胞は Ink4a 欠損マウスの間葉系間細胞に proto-oncogene の 1 つである c-Myc を過剰発現して安定発現株とした AX 細胞を用いることとした。AX 細胞の同種移植によって、皮下あるいは腹腔内いずれの移植によっても移植部に骨形成を伴う腫瘍が形成され、さらに肺など様々な組織へ転移することによって、最終的には腫瘍死する。TNF α の抑制には TNF α 欠損マウスあるいは TNF α 受容体の阻害剤を用いることとし、AX 細胞を野生型あるいは TNF α 欠損マウスへ移植、もしくは野生型マウスへ AX 細胞を移植した際、TNF α 受容体の阻害剤あるいは vehicle を投与することで、その効果を比較することとした。

4. 研究成果

AX 細胞を野生型マウスへ移植した際、腫瘍細胞へ宿主由来のマクロファージが浸潤し、TNF α を発現することを見出した (図 1: Oncogene 2014)。そこで、TNF α 欠損マウスへ

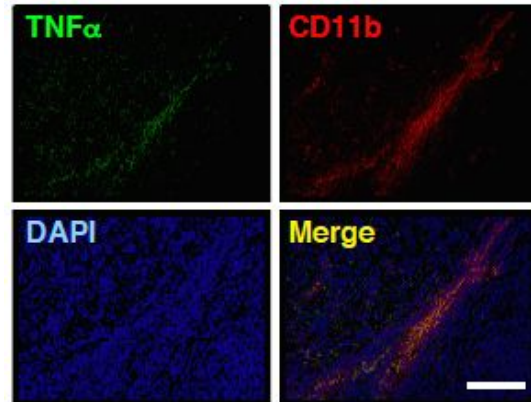


図 1: TNF α とマクロファージ (CD11b) の免疫染色

AX 細胞を移植したところ、野生型マウスでは腫瘍形成から転移を起こし、4 週間程度で死にいたるところ、そのような腫瘍死が完全にキャンセルされることを見出した (図 2、Oncogene 2014)。AX 細胞が移植されたマウス

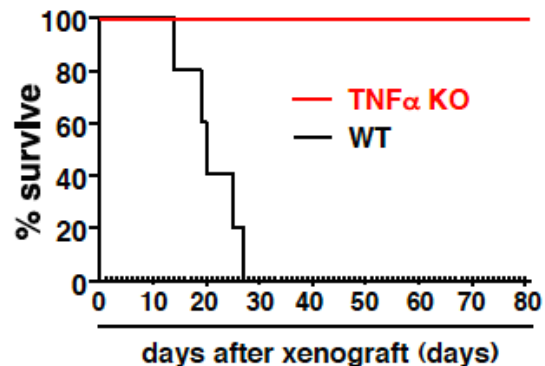


図 2: TNF α 欠損マウスと野生型マウスにおける AX 細胞移植後の生存率

では、血清中の IL-6 の濃度が上昇することを見出したが、IL-6 欠損マウスへの AX 細胞の移植では、野生型マウスの時と同様に移植後 4 週間程度で腫瘍死に至ったことから、AX 細胞による腫瘍死の回避には TNF α の抑制が特異的に効果を発揮する可能性が示唆された。さらに、野生型マウスへ AX 細胞を移植した際に、TNF α 受容体阻害剤を投与すると、部分的にはあるが明らかな腫瘍死阻害効果を認めた。AX 細胞を強力な骨形成能を有する骨形成性の腫瘍細胞であることから、TNF α の骨形成細胞としての AX 細胞への作用を解析したところ、alkaline phosphatase や runt related transcription factor 2 などの骨芽細胞系の分化マーカーの発現が TNF α の作用により有意に抑制されることを見出した。さらに、この TNF α による骨芽細胞系の分化抑制は MAPK の中でも ERK シグナルを介していることを明らかにした。ERK 阻害剤の投与では、部分的にはあるが AX 細胞移植による腫

瘍死が回避される、さらに興味深いことに、IL-1欠損マウスにAX細胞を移植しても、TNF α 欠損マウスの時と同様、腫瘍死が完全にキャンセルされることを見出した(図3)。IL-1を *in vitro* において AX 細胞に作用させると、

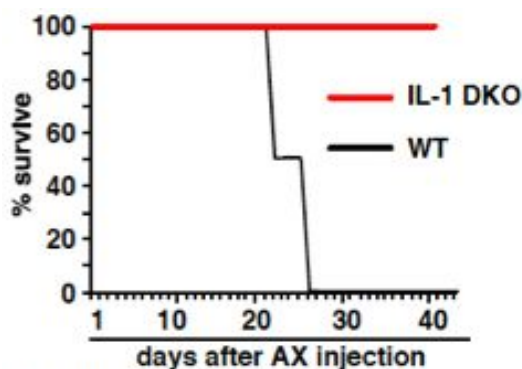


図3: IL-1欠損マウス(IL-1 DKO)と野生型マウスにおけるAX細胞移植後の生存率

TNF α と同様に骨芽細胞系のマーカー分子の発現を有意に抑制した。以上のことから、炎症性サイトカインであるTNF α やIL-1は、骨芽細胞系の悪性腫瘍である骨肉腫の発生および進展において、腫瘍の分化を抑えることで未分化状態を保ち、腫瘍死へ至らしめることを明らかにした。逆に、TNF α やIL-1の抑制によっては、AX細胞は未分化性を維持できず、分化してしまうことで腫瘍としては増殖しないことが明らかになった。造血系、ここでは免疫系作動薬は、腫瘍免疫応答として発生する炎症により自身の未分化性を維持するタイプの腫瘍に対しては、その未分化性を抑制することで抗腫瘍能を発揮する可能性が示された(Oncogene 2014)。

これまで、腫瘍形成は慢性炎症に長くさらされることにより腫瘍形成に至るか、あるいは遺伝子変異により腫瘍を形成するモデルが考えられてきた。今回の発見では、腫瘍モデルとして用いたAX細胞は、Ink4a欠損マウス由来の細胞でかつc-Myc過剰発現という遺伝子変異により誘導された腫瘍モデルであるが、そのような遺伝子変異型腫瘍モデルでも、proto-oncogeneの影響のみによって腫瘍化能を獲得するわけではなく、炎症も必要とすることがあるという、腫瘍化における新たなパラダイムを提案できたと考えている。今後は、このような現象が他の腫瘍にも観察され、炎症を標的化することで腫瘍形成を抑制できる可能性や、骨と造血に相互作用において、さらに腫瘍とは異なる作用の出口が出てくるような発展性が考えられる。

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 6件)

*equally contributed 1st author

1. Fujie A, Funayama A, Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Kanagawa H, Katsuyama E, Hao W, Tando T, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Kanaji A, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y and Miyamoto T. Bcl6 promotes osteoblastogenesis through Stat1 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Feb 13;457(3):451-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.012. 査読あり
2. Kanagawa H, Niki Y, Kobayashi T, Sato Y, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Watanabe R, Morita M, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. Mycobacterium tuberculosis promotes arthritis development through toll-like receptor 2. *J Bone Miner Metab.* 2015 Mar;33(2):135-41. doi: 10.1007/s00774-014-0575-9. 査読あり
3. Katsuyama E, Miyamoto H, Kobayashi T, Sato Y, Hao W, Kanagawa H, Fujie A, Tando T, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Niki Y, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) promotes inflammatory osteolysis by activating osteoclasts and inhibiting formation of foreign body giant cells. *J Biol Chem.* 2015 Jan 9;290(2):716-26. doi: 10.1074/jbc.M114.568360. 査読あり
4. Sato Y, Miyauchi Y, Yoshida S, Morita M, Kobayashi T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Watanabe R, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. The Vitamin D Analogue ED71 but Not 1,25(OH)2D3 Targets HIF1 α Protein in Osteoclasts. *PLoS One.* 2014 Nov 6;9(11):e111845. doi: 10.1371/journal.pone.0111845. 査読あり
5. Mori T, Sato Y, *Miyamoto K, Kobayashi T, Shimizu T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Iwasaki R, Kawana H, Morioka H, Matsumoto M, Saya H, Toyama Y, Miyamoto T. TNF α promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. *Oncogene.* 2014 Aug 14;33(33):4236-41. doi: 10.1038/onc.2013.545. 査読あり
6. Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Morioka H, Matsumoto M, Chambon P, Johnson RS, Kato S, Toyama Y, Miyamoto T. HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 8;110(41):16568-73. doi: 10.1073/pnas.1308755110. 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

1. 宮本健史、宮本佳奈、破骨細胞による
HSC 制御、第 1 回日本骨免疫会議
平成 26 年 7 月 4-6 日 ザ・ブセナ
テラス(沖縄県名護市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 佳奈(Miyamoto Kana)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号: 60464997