

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670806

研究課題名(和文)ヒトの骨転移病態を再現する遺伝子改変マウスモデルの樹立

研究課題名(英文)Development of a novel mouse model that recapitulates bone metastasis seen in human.

研究代表者

米田 俊之(Yoneda, Toshiyuki)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：80142313

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):がんは高率に骨に転移し、患者のQOLを低下させる。効果的な骨転移治療法の開発には、骨転移を再現する前臨床動物モデルの開発が望まれる。ヒトで見られる骨転移を再現する遺伝子改変モデルマウスを樹立するために、MMTV遺伝子プロモーター下に骨転移に重要なカドヘリン11(Cdh11)遺伝子と、改良型GFP/ルシフェラーゼ融合遺伝子ffLucを2A配列を介して組み込んだTgベクター(MMTV-Cdh11-2A-ffLuc)を構築し、FVB系マウスの受精卵にインジェクションした。MMTV-Cdh11-2A-ffLucマウスをライン化した後、MMTV-neuマウスと交配し、骨転移モデルマウスを樹立する。

研究成果の概要(英文): Many types of cancers preferentially spread to bone, developing bone metastases. To develop novel therapeutic interventions for bone metastasis and to test their effectiveness, establishment of pre-clinical animal models that resemble bone metastasis occurring in cancer patients has been awaited. Here, we attempted to develop a novel mouse model that recapitulates the entire steps of bone metastasis seen in human. The MMTV-Cdh11-2A-ffLuc transgenic (Tg) vectors were designed and constructed. The ffLuc is a novel chemiluminescent/fluorescent protein that enables the dynamic imaging of bone metastasis with high resolution. The linealized Tg vectors were then injected into fertilized eggs of FVB mice. Our next plan will be to generate double Tg mice by crossing MMTV-neu mice and MMTV-Cdh11-2A-ffLuc mice and monitor bone metastases spontaneously developed in these mice by in vivo imaging. This mouse model will be a useful tool to understand the mechanism underlying cancer bone metastasis.

研究分野：生化学

キーワード：骨転移 動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎える我が国において発生頻度が増加している乳がん、前立腺がんおよび肺がんは高頻度に骨に転移する。骨転移自体は直接生命を脅かすことは稀であるが、骨関連事象(SRE:Skeleta-related events)と呼ばれる病的骨折、骨痛や麻痺を伴い、がん患者のQOLを著しく低下させマネージメントを困難にする。さらに近年、骨に定着したがん細胞は一定期間潜伏した後に他の臓器に遠隔転移し、患者の死亡率を高めることが示されている。したがって、骨転移に対する有効な治療法ならびに早期診断法の確立が強く望まれている。

様々な疾患の分子メカニズムを解明し治療戦略を開発するうえで、動物実験モデルは非常に強力、かつ必須のツールである。申請者は20年前に乳がん細胞を心腔内に直接注入し骨転移を誘発するモデルマウスを構築し(*Breast Cancer Res Treat.* 1994)、骨転移の分子メカニズム解明を精力的に進めてきた。さらにはこの動物実験モデルを用いて、現在では骨転移治療の第一選択となっているビスホスホネート製剤が骨転移治療に有効であることを世界に先駆けて報告した(*Cancer Res.* 1995)。

しかしながら、乳がん細胞の心腔内注射による骨転移モデルは、骨転移の臨床病理的特性を完全に反映していないという問題がある。骨転移は発がん、血管内への侵入と生存、そして骨組織への定着と増殖など様々な段階を経て成立するが、本モデルでは血管内侵入以降から最終段階である骨組織への定着と増殖までを再現できるのみである。したがってこの動物モデルで得た知見はヒト乳がん患者の骨転移の病態を理解し、治療開発へと応用するには不十分であり、骨転移の全ステップを再現するモデルマウスの構築が不可欠である。これらの研究背景から、ヒトの骨転移病態を再現するモデルマウスの開発を目指す本研究の発想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者の骨転移研究に関する豊富な経験と知識を基盤として、最新の遺伝子改変動物作製技術とバイオイメージングシステムを駆使し、発がんから骨転移成立までの全過程を再現するモデルマウス作製に挑戦する。

## 3. 研究の方法

本研究では自然発症型乳がんマウス乳がんウイルス MMTV (mouse mammary tumor virus) 遺伝子プロモーターの制御下に、申請者らが同定した骨転移に重要な遺伝子である Cadherin-11 (*Int J Oncol.* 2008) と高感度バイオイメージングを可能にする ffLuc (*BBRC* 2012) を同時に遺伝子導入したトランスジェニックマウスを作製する。ffLuc 遺伝子は理化学研究所 脳科学総合研究センターの宮脇敦史博士らにより開発され、改変型 GFP 遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を融合させることにより蛍光タンパク質と発光タンパク質の利点を併せ持つ遺伝子である。乳がん細胞に ffLuc 遺伝子を導入することにより、ハンディ型 LED ライトを用いた骨転移の簡便な検出と In Vivo イメージングによる定量的モニタリングが可能になる。そして、Cadherin-11(Cdh11) と ffLuc の遺伝子導入には、複数の遺伝子を同時にかつ同量発現誘導することが可能な 2A 配列システムを応用する。従来使用されてきた IRES による 2つの遺伝子の同時発現では、下流の遺伝子発現が減少するなど予測困難な発現量の調節が問題視されてきたが、2A 配列は 2つの遺伝子発現量が等しくすることが可能である。

この Cdh11 と ffLuc を導入した Tg マウスと、MMTV 遺伝子プロモーター制御下に HER2 遺伝子を過剰発現させたマウス乳がんモデルマウス MMTV-*neu* マウスを交配させダブルトランスジェニックマウスを作製し、骨転移モデルマウスとする。

## 4. 研究成果

### (1) ffLuc 遺伝子の有効性の確認

まずはじめに ffLuc 遺伝子を入手し、乳がん細胞株への遺伝子導入を行い、ffLuc 遺伝子の有効性を確認した。ffLuc 遺伝子をレンチウイルス発現ベクター pLVSIN-CMV-Puro(タカラバイオ株式会社)に組み込んだ(pLVSIN-CMV-ffLuc-Puro)。LentiX-293T 細胞に pLVSIN-CMV-ffLuc-Puro と Lentiviral High Titer Packaging Mix をトランスフェクションし 48 時間後にレンチウイルスを含む上清を回収した。MDA-MB-231 細胞に ffLuc レンチウイルスを感染させたのちピューロマイシンにて薬剤選択を行い、MDA-MB-231-ffLuc 細胞を樹立した。蛍光顕微鏡による確認ならびにルシフェラーゼ活性の測定を行い、蛍光顕

顕鏡による蛍光たんぱく質の発現、およびルシフェリン投与によるルシフェラーゼ活性測定により ffLuc 遺伝子が機能していることを確認した。

この MDA-MB-231-ffLuc 細胞は、Tg マウスによる骨転移モデルの樹立が予定通り進まなかった場合のバックアップに用いる予定である。

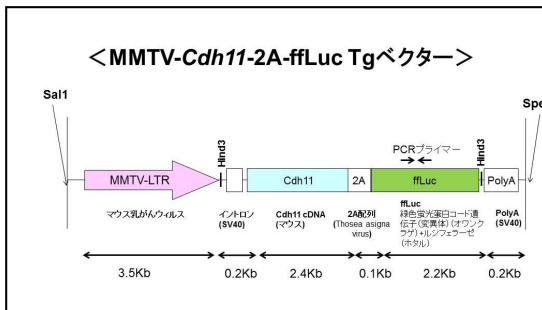
### (2) MMTV-*neu* マウスの入手と維持

乳がんモデルマウスとして MMTV-*neu* マウス(Guy CT, *et al.*, 1992. *Proc Natl Acad Sci USA*)を京都大学大学院 生命科学研究所 生体制御学講座 松田道行教授より供与いただいた。MMTV-*neu* マウスは出生後平均 205 日で乳がんを発症する発がんモデルマウスであり、古くから乳がんの実験で用いられてきている。現在、大阪大学歯学研究科 P2 動物実験施設にてホモマウスで維持している。

### (3) MMTV-*Cdh11-2A-ffLuc* マウスの作製

#### トランスジェニックベクターの構築

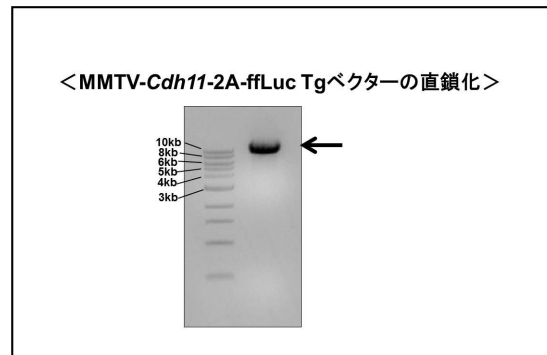
MMTV 遺伝子プロモーター制御下に *Cdh11* 遺伝子と ffLuc 遺伝子を発現するためのトランスジェニックベクターの構築を行った。Addgene 社より MMTV-SV40-Bssk(#1824)を入手し、Hind3 にて直鎖化し *Cdh11-2A* をライゲーションした。*Cdh11-2A* は合成オリゴにて作成している。その後、2A 配列の 3'側に付与した Xho1 サイトを用いて ffLuc 遺伝子を組み込みトランスジェニックベクターを作製した。最終的にシーケンス解析により Tg ベクターの塩基配列を確認し、変異が無いことまた *Cdh1* および ffLuc が正しくライゲーションされていることを確認した。Tg ベクターの DNA マップを下図に示す。



#### トランスジェニックベクターの直鎖化

トランスジェニックベクターは Sal1 および Spe1 で直鎖化した後、0.8%アガロースゲルに泳動し、TAKARA 社の NucleoSpin Gel

and PCR Clean-up を用いて精製し TE に溶解した。50ng/μl になるように調整し、アガロースゲルにて直鎖化トランスジェニックベク



ターが得られていることを確認した(図参照) 受精卵へのマイクロインジェクション

直鎖化し精製したトランスジェニックベクターを 1ng/μl になるように PBS(-)で希釈した。10 週齢の FVB マウス 30 匹を過排卵処理し、その後自然交配を実施し受精卵を回収した。受精卵に DNA をインジェクションした後、状態の良好な 250 個以上の胚を仮親マウスの卵管に移植した。しかし、そのほとんどが胎内死しており得られた産仔は 30 匹だけであった。これらマウスを 8 週齢まで飼育し、尻尾からゲノム DNA を採取し、ffLuc 遺伝子に特異的なプライマー (Fwd primer: 5'-TGGTGGTGCAAATCAAAGAA-3', Rev primer:

5'-TAGGCTTTCCACGTCGATCT-3')を用いてジェノタイピング PCR 行った。しかし、Tg マウスは得られなかった。現在、インジェクションする受精卵の数を増やして、再度 Tg マウスの作製を行っている。また、Tg マウスの作製効率を上げるために以下の2つも同時に実施している。(1)Tg マウス作製効率の高い Slc:BDF1 マウス受精卵に DNA をインジェクションし、Tg マウスを得た後 FVB 系統に戻し交配する、(2)トランスジェニックベクターの再構築と再精製を行い、再度 FVB 系統の受精卵へインジェクションする。そして、MMTV-*Cdh11-2A-ffLuc* のファウンダーマウス(F0)が得られれば、Tg マウス(F1)作製、ホモマウスを作製と増産を行い、MMTV-*neu* マウスと交配しダブルトランスジェニックマウスを作製する予定である。

### 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 2 件)

Yoneda T, Hiasa M, Nagata Y, Okui T, White F. Contribution of acidic extracellular microenvironment to cancer-associated bone pain. **Biochim Biophys Acta** 1848(10 Pt B):2677-2684, 2015,  
doi: 10.1016/j.bbamem.2015.02.004. PMID: 25687976.

Yoneda T, Hiasa M, Nagata Y, Okui T, White F. Acidic microenvironment and bone pain in cancer-colonized bone. **BoneKey** 4:690, 2015.

doi: 10.1038/bonekey.2015.58.  
PMID: 25987988.

〔学会発表〕(計 1 2 件)

奥井達雄, 日浅雅博, Fletcher A. White, G. David Roodman, 米田俊之. 乳がん骨転移および骨からの二次転移における痛覚神経の関与. 第18回癌と骨病変研究会、2015/11/13、東京

Hiasa M, Okui T Nagata Y, Allette YM, Ripsch MS, Delgado-Calle J, Bellido T, Roodman DG, Plotkin R, White F, Yoneda T  
Osteocytes are an Important Mediator of Bone Pain in Myeloma  
015 ASBMR annual meeting 2015/10/10 Seattle USA

Okui T, Hiasa M, Nagata Y, White F, Roodman DG, Yoneda T Reciprocal Interactions between Sensory Neurons and Tumor Cells Promote Breast Cancer Progression in Bone, Secondary Visceral Metastasis and Bone Pain 2015 ASBMR annual meeting 2015/10/11 Seattle USA

Yoneda T, Hiasa M, Okui T. Contribution of osteocytes to activation of sensory nerves and induction of bone pain. 2<sup>nd</sup> Mie University-UCSD Joint Symposium, 2015/8/2 San Diego, USA

Okui T, Yoneda T. Sensory nerves promote bone metastasis and secondary visceral metastasis from bone in breast cancer. 2<sup>nd</sup> Mie University-UCSD Joint Symposium, 2015/8/2 San Diego, USA

Yoneda T, Hiasa M, Okui T, Ripsch MS, Delgado-Calle J, Bellido T, Roodman DG, Plotkin R, White F Contribution of osteocytes to cancer-associated bone pain via

connexin43-mediated communications with sensory neurons under the acidic microenvironment in bone metastasis, 4<sup>th</sup> joint meeting of ECTS and IBMS 2015/4/26 Rotterdam, The Netherlands

Yoneda T, Hiasa M, Nagata Y, Ripsch MS, White FA, Roodman. Acidic extracellular microenvironment in myeloma-colonized bone contributes to bone pain. Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2014/12/9 San Francisco, USA

米田俊之. 骨痛誘発における骨転移の酸性環境の貢献. 岡山骨生物学セミナー, 2014/11/9 岡山大学

Yoneda T. Acidic microenvironment contributes to the pathophysiology of bone pain associated with cancer colonization. 7th International Conference on Osteoporosis and Bone Research/ International Bone and Mineral Society joint symposium, 2014/10/17 Xiamen, China

Hiasa M, Nagata Y, Delgado-Calle J, Allette Y, Ripsch MS, Bellido T, Roodman GD, White FA, Yoneda T. Osteocytes directly communicate with sensory neuronal cells in bone via cell-cell networks that are modulated under an acidic microenvironment. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2017/9/13 Houston, TX,

Nagata Y, Tanaka S, Hata K, Hiasa M, Nishimura R, Yoneda T. Ubiquitin-specific peptidase 45 (USP45), a family member of de-ubiquitinating enzyme, controls epithelial mesenchymal transition of breast cancer in bone. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2014/9/14 Houston, TX,

米田俊之. Bone metastasis: Integrated achievements by characteristic players. がんと骨シンポジウム, 第32回日本骨代謝学会総会、2014/7/24 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

米田 俊之 (YONEDA, Toshiyuki)

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号: 80142313

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

波多 賢二 (HATA, Kenji)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：80444496