

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：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861539

研究課題名(和文) 癌骨転移環境下での癌細胞と骨細胞間ネットワーク機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of network between cancer cells and osteocyte under circumstance of bone metastasis

研究代表者

山田 珠希 (YAMADA, TAMAKI)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：80580943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌の骨転移環境下での骨細胞の挙動に着目した。特に、骨細胞と癌細胞との間のネットワークについて解析をすすめた。骨細胞が産生する因子の中で特に骨代謝に関与するFGF23に着目した。癌が転移した周囲の骨細胞でのFGF23の発現は認められなかった。一方、骨に転移した乳癌細胞はFGF23を過剰に産生することがわかった。以上より、骨細胞と癌細胞にはネットワークがあり、FGF23が関与していることがわかった。癌細胞が骨に転移することでFGF23を発現し、骨に指向性をもつようになるのかの詳細な検討は今後の課題と思われる。

研究成果の概要(英文)：I focused attention on behavior of osteocytes in bone metastasis foci of cancer cells. Especially, I analyzed on network between osteocytes and cancer cells. I focused attention on FGF23, which is produced by osteocytes and involved in bone metabolism. FGF23 did not express in osteocytes, to which cancer cells metastasized. By contrast, FGF23 expressed abundantly in bone metastasis foci. From these results, I inferred the existence of network between osteocytes and cancer cells. These results showed that FGF23 expression had a lot of involvement in bone metastasis of cancer cells. I research if cancer cells express FGF23 by metastasizing to bone and have directivity to bone.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨代謝 骨細胞 FGF23

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、骨は臓器として知られている。また、骨は臓器の表面積の大部分を占めているためその機能を無視することはできず、注目が集まっている。骨をマイクロ単位で見ると複雑なネットワークがある。すなわち、骨を作る骨芽細胞、骨を破壊する破骨細胞、そして未だ不明な点が多くある骨細胞の3種の細胞である。これらの連携により骨代謝が行われている。骨細胞は骨芽細胞の一種で骨内に埋め込まれた細胞である。未だ不明な点が多くあるが、骨細胞同士は突起を伸ばし、まるで神経のネットワークのような連携をみることができる。このような構造から何らかの重要な機能を保持していることは容易に推定できる。

(2) 骨指向性の癌である乳癌や前立腺癌などはPTHを過剰に産生し、前骨芽細胞系ネットワークを活性化し、骨転移巣での骨代謝に関与していることが知られている。骨指向性を持つ癌細胞は何故骨に転移するのかが不明な点が多くある。近年では、骨の転移や浸潤により引き起こされた骨関連事象(痛み、病的骨折など)が問題視されており、これに対して種々の治療薬法の開発がなされている。何故骨に転移するのかの疑問が少しでも解明することができれば、骨の有害事象を軽減でき、患者のQOLを保持することが可能である。こうした背景から、癌がどのようにして前骨芽細胞系ネットワークに働きかけ、骨転移や浸潤を引き起こすのかを理解することは重要な課題と考える。

(3) 骨細胞は種々の因子を産生することが知られている。中でも FGF23 に着目した。FGF23 は主に骨細胞で産生され、循環系を解して腎臓に作用する。腎臓でのリンの再吸収と $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 産生を抑制する。つまり、FGF23 が過剰に産生されると血中のリンが不足し、正常な骨代謝が行われなくなる。癌が骨に転移もしくは浸潤する際の FGF23 の働き

を検索することは重要である。

2. 研究の目的

骨を臓器として考え、その骨を構成し、大部分を占める骨細胞に関して分子生物学的さらには組織化学的に解明し、少しでも臨床に貢献することを目的とする。臨床的に問題となるのは癌が骨に転移巣を作り、骨破壊を行い、有害事象を引き起こすことである。癌が骨に転移する際にどのような機構があるのかを解明し、癌が骨へ転移することを防止することを目指す。また、骨転移巣における骨代謝を理解することは癌の骨への転移や浸潤により引き起こされる骨関連事象の改善だけでなく、骨粗しょう症や骨関連疾患等の病態を把握することが可能であり、それら疾患治療に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

免疫不全モデルマウスに骨指向性をもつヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 を投与し、モデルマウスの下肢骨に転移巣及び骨破壊像を樹立した。その後分子生物学的手法や組織化学的手法を用いて、癌と骨細胞との関係を検索した。また、動物実験に使用したヒト乳癌細胞を培養し、培養状態と転移巣(生体)での発現因子の相違を分子生物学的手法や組織化学的手法を用いて検索した。

(1) 材料

8週齢の BALB/cAJ1-nu/nu マウス

MDA-MB-231: ヒト乳癌細胞

研究計画を遂行するにあたり、上記材料を用いて、マウスにヒト乳癌細胞骨転移モデルを作製した。FGF23 過剰発現細胞株を作成するにあたり、ORIGENE 社 FGF23 (NM020638) Human cDNA ORF Clone のプラスミドを用いた。分子生物学的手法や組織化学的手法をも用いるために必要な抗体や機器を準備した。使用した主な抗体は FGF23、SOST、DMP-1 である。

(2) 方法

①方法としては、マウスの左心室に 26G のシ

リングを用いて、 10^5 個/ $100\mu\text{l}$ (PBS内) に調整した細胞浮遊液を注射した。注射後はマウスを麻酔し、鎮静状態が得られたのち、4~6週後に軟エックス線を撮影し、骨の転移及び破壊像を確認した。破壊像が確認されたのち、4%パラホルムアルデヒドを用いて、灌流固定及び浸漬固定し、通法に従い、脱灰後パラフィン包埋し、薄切片を作製した。その後TRAP染色、また、ALP、FGF23、SOSTおよびDMP-1抗体を用いて組織染色を行なった。また、分子生物学的解析をする目的で癌が骨転移した下肢骨のサンプルを凍結させ、RNAを抽出し、遺伝子解析を行った。検索因子として、TRAP/ALP、FGF23、SOST、DMP-1を標的因子とした。これらの因子により、骨代謝関連細胞群である骨芽細胞、破骨細胞および骨細胞について組織化学的に解析した。骨代謝に関与する細胞だけでなく、癌細胞についても使用した抗体による染色性を検索した。

②ヒト乳癌細胞MDA-MB-231を培養し、培養条件下でFGF23を過剰に発現する細胞株の作成を試みた。培養条件下でFGF23を過剰に発現した乳癌細胞を樹立した後、ヌードマウスに投与し、骨転移モデルを作成する。FGF23過剰発現による骨転移や骨破壊に対する影響を検索する予定である。

(3) 期間

マウスに癌細胞を注射し、骨の転移巣が樹立するまでの期間：4~6週

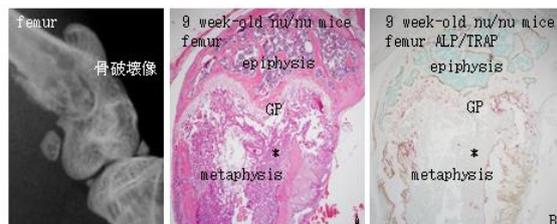
骨転移したサンプルはマウスの下肢骨を使用し、脱灰までの期間：4~6週

ヒト乳癌細胞と骨転移巣における骨細胞との局在や相互関係を検索するには、骨転移巣を樹立し、それからさらに脱灰操作を必要とするため、ある一定の期間を要する。骨転移巣を樹立し、系を確立している間にFGF23の安定過剰発現細胞株を作成するまでの期間を要した。

4. 研究成果

(1) 癌骨転移巣の樹立

ヒト乳癌細胞を免疫不全モデルマウスに注射し、4から6週後にマウスの上腕及び下肢骨に骨転移巣が樹立された。このことにより乳癌細胞は骨指向性があると考えられた。骨の転移巣の樹立は軟エックス線上での明らかな骨透過性の変化により確認した。



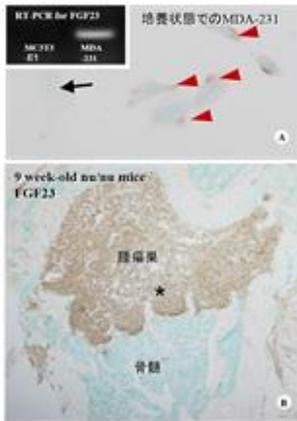
大腿骨の骨幹端及び骨幹には乳癌転移巣を認める(A, B*)。転移巣周囲の骨表面には多数のTRAP陽性破骨細胞(赤)及びALP陽性骨芽細胞(茶)を認め、骨吸収が活発であることを示す(B)。

癌が転移した下肢骨を用いて、組織学的解析と分子生物学的解析を行った。下肢の大腿骨への転移巣をサンプルとして解析したが、骨端、骨幹端及び骨幹にヒト乳癌細胞が浸潤し、骨破壊像を呈し、一部に骨増生している像も認められた。乳癌は臨床的にも骨に転移した先では破壊像を呈することが知られている。ヌードマウスのモデルでは骨の破壊と一部増生を示していたが、骨破壊の方が優位であったと考えられた。骨端部では癌細胞が浸潤している周囲の骨表面にTRAPとALPの陽性細胞が多数認められ、骨代謝が活発であることが確認された。さらに骨破壊が進行した骨幹端及び骨幹では骨破壊が著しく、骨梁が喪失し、その代わりにおそらくは代替として類骨様の組織の増生を一部に認めた。こうした骨破壊が進行した部位ではTRAPとALPの陽性細胞を認められなかった。TRAPとALPの組織染色像から、骨破壊の初期では破骨細胞と骨芽細胞の活性化を認めるが、骨破壊の後期、すなわち一通り骨破壊が終了した時期には両者の活性化を認められず、骨破壊から一転骨増生を認める結果が得られた。

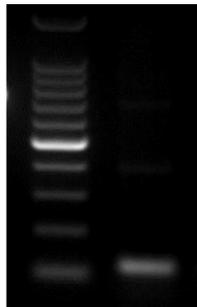
(2) 骨転移癌細胞のFGF23発現亢進

骨転移巣でのヒト乳癌細胞ではFGF23が強発現していることがわかった。培養状態ではFGF23の発現レベルは検出限界以下であった。

これらの結果から骨指向性がある乳癌細胞は転移先で FGF23 を発現し、骨の浸潤に関与している可能性が示唆された。



培養状態では乳癌細胞に FGF23 の局在を認める(A)。RT-PCR法で FGF23 の発現を確認している(A左上パネル)。骨に転移した乳癌細胞では、FGF23 の強陽性反応を認める(B)。培養状態での乳癌細胞では、FGF23 を産生していない細胞(A黒矢印)と産生している細胞(A赤矢印)が混在して認められるが、骨に転移した乳癌細胞ではすべての細胞において FGF23 の発現が認められる。



乳癌細胞株の PCR で FGF23 発現を示す。

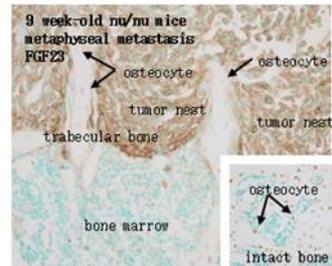
FGF23 は通常では主に骨細胞が産生するといわ

れている。FGF23 は腎臓に作用し、リンの再吸収を抑制すると言われている。乳癌細胞が転移巣で FGF23 を過剰に発現することで、低リン血症や骨軟化症を引き起こし、癌自身が骨を破壊しやすい環境、すなわち転移しやすい環境を樹立したと推察された。

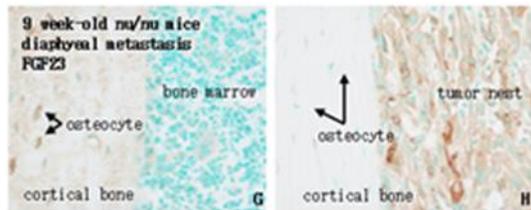
(3) FGF23 過剰発現細胞株の樹立

乳癌細胞が FGF23 を産生する意義とその影響を検索するため、FGF23 過剰発現細胞株の樹立を目指した。ORIGENE 社の FGF23 Human cDNA ORF Clone を用いて、FuGENE 社のトランスフェクション用の薬剤を用いて試みた。本研究計画期間中での樹立は難しく、現在も施行中である。トランスフェクションの薬剤を変更するか、薬剤によるトランスフェクション法以外での方法を考慮する必要がある。また、使用するプラスミドの変更も考慮する必要がある。FGF23 過剰発現細胞株が樹立されれば、細胞内でのシグナル経路の検索が可能となる。通常の乳癌細胞と FGF23 過剰発現細胞を各々ヌードマウスに投与し、骨転移や浸潤形態の相違と周囲の骨細胞との関係を解明することを目指したい。今回の研究では不明な点が多くある骨細胞に着目して解析を行

なった。近年、骨細胞に関する骨代謝調節や骨基質ミネラル調節における多数の成果が報告されており、骨代謝の主役の一つとして骨細胞があげられる。乳癌細胞が転移した周囲の骨細胞におい



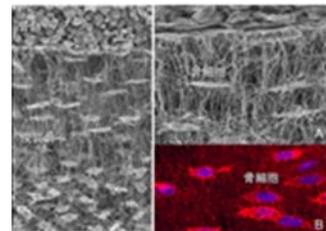
腫瘍巣に囲まれた骨梁における FGF23 の免疫染色化学。白枠内は、正常な骨梁における FGF23 の局在を示す。



腫瘍に隣接した皮質骨における FGF23 の免疫染色化学。左パネルは、正常な皮質骨における FGF23 の局在を示す。

ては、骨細胞産生因子として知られている FGF23 の発現が低下していた。骨折モデルなどにおいても骨折した部位の周囲の骨細胞での FGF23 の発現が検出限界以下であった。

転移した先で乳癌細胞が過剰に FGF23 を産生することが影響しているのか、



骨細胞からの無数の細胞突起がでてネットワークを形成している。

もしくは何らかの刺激が伝わることにより骨細胞のネットワークに影響が及ぶのかは検討の余地がある。いずれにしても、癌と骨細胞の間にはネットワークがあり、骨代謝に影響を及ぼしていることが示唆された。今後は乳癌細胞が何故、どのようなメカニズムで FGF23 を産生し、骨転移や浸潤に関与するのかを詳細に検索する必要がある。FGF23 の産生を抑制することで乳癌の骨転移を防止することが可能であれば骨関連事象の発生を予防することができるため、臨床的には大いに貢献できる。

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)

- ① 山田 珠希、栗林 和代、大廣 洋一、
篠原 早紀、松田 光平、鈴木 豊典、
北村 哲也、進藤正信、鄭 漢忠：下顎
骨骨髓から発生した悪性リンパ腫の1例、
北海道歯学会雑誌、第36巻 第2号、
92-99、2016、査読有り
- ② Yamada T., Tsuda M., Wagatsuma T.,
Fujioka Y., Fujioka M., Satoh A.O.,
Horiuchi K., Nishide S., Nanbo A.,
Totsuka Y., Haga H., Tanaka S., Shindoh
M. and Ohba Y.: Receptor activator of
NF- κ B ligand induces cell adhesion and
integrin alpha 2 expression via NF- κ B
in head and neck cancers. *Sci Rep.*
6:23545:1-16, 2016, 査読有り

[学会発表] (計2件)

- ① 山田 珠希：エナメル上皮腫における歯
牙に対する治療法の検討－反復処置法に
よる歯牙温存の可否について－、第60回
日本口腔外科学会総会、2015年10月16
日～10月18日、名古屋国際会議場（愛
知県）
- ② 山田 珠希：当科におけるエナメル上皮
腫に対する反復処置法の臨床的検討、第
59回日本口腔外科学会総会、2014年10
月17日～10月19日、幕張メッセ（千葉
県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 珠希 (YAMADA, Tamaki)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：80580943

(2) 研究分担者

なし