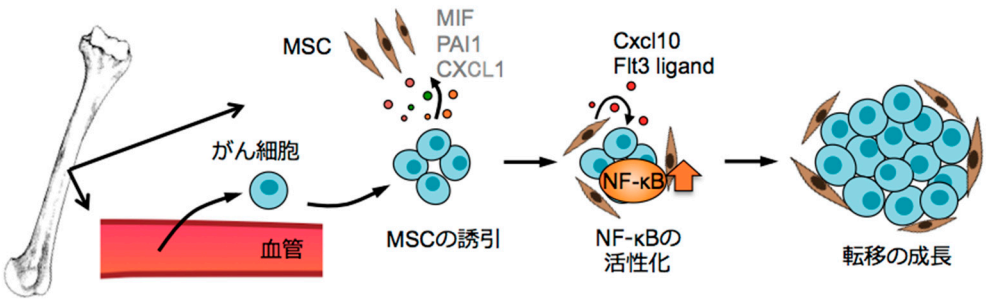
| 145　骨髄ニッチによる骨転移発症制御機構の解明 | 口丸　高弘 |
|---|---|

**【目的】**骨転移は前立腺がん、乳がんなどで頻発し、患者の生活の質を著しく悪化させる。多くの場合、原発巣が見つかった段階で骨転移のリスクが高いにも関わらず、有効な予防法や治療法は開発されていない。診断で検出される以前の転移早期過程における、がん細胞の生存や微小コロニーの形成・成長に関わる分子機構がほとんど解明されていないことが、 治療法開発を困難にしている。現在、数少ない報告から、骨転移早期過程を制御する分子機構解明の手掛かりとして、造血幹細胞の機能を制御する骨髄由来細胞群が形成する特徴的な骨髄微小環境（骨髄ニッチ）とがん細胞の相互作用が注目されている。そこで、我々は、骨転移微小コロニーの効率的な組織学的解析を可能にする血行性骨転移マウスの構築手法とマウス骨髄に播種されたがん細胞の増殖や転写因子活性を非侵襲的かつ高感度・定量的にモニタリングできる生物発光イメージングシステムを組み合わせた新規モデルマウスを確立した。このモデルマウスを解析した結果、がん細胞の増殖に重要な役割を果たす転写因子 nuclear factor-kappa B（NF-κB）が前立腺がんの骨転移微小コロニーの成長に先立って活性化すること、骨転移微小コロニー周辺には、間葉系幹細胞（MSC）が蓄積していること、MSC が分泌する因子によってがん細胞の NF-κB が活性化されることなどが明らかになった。本研究では、MSC が形成する骨髄ニッチと前立腺がん細胞の相互作用を分子レベルで明らかにし、治療標的分子を見出すことで、骨転移の発症・進行を阻止する新たな治療戦略の開発を目指した。

**【方法】**ヒト前立腺がん細胞がマウス骨髄内での MSC を誘引し、骨髄ニッチが形成される可能性について検討した。マウス骨髄から単離した MSC を蛍光色素標識し、トランスウェルを用いた誘引アッセイを実施した。また、MSC を誘引する PC-3 由来の分泌因子を明らかにするために、PC-3 の培養上清をサイトカインアレイによって解析した。サイトカインアレイ解析によって明らかになった候補分子の精製タンパク質を用いて MSC の誘引効果を解析した。また、PC-3 の NF-κB を活性する MSC の分泌因子を同定するために、MSC の培養上清をサイトカインアレイによって解析した。サイトカインアレイ解析によって絞り込まれた候補分子の精製タンパク質を NF-κB 応答性発光レポーターを導入した PC-3 細胞に添加し、NF-κB の活性化レベルを解析した。

**【結果】**MSC を誘引するがん細胞由来の分泌因子として、macrophage migration inhibitory factor（MIF）、plasminogen activator inhibitor-1（PAI-1）、C-X-C motif ligand 1（CXCL1）などを候補分子として選出した。しかし、これらの精製タンパク質を使って、MSC への誘引効果を調べたところ、個々の因子の誘引効果は非常に限定的であったことから、複数の因子が協調して MSC に作用している可能性が示唆された。PC-3 の NF-κB を活性化する MSC 由来の因子に関しては、C-X-C motif ligand 10（Cxcl10）、C-C motif chemokine 5（Ccl5）、Fms-related tyrosine kinase 3 ligand（Flt3 ligand）などを候補分子として選出して、がん細胞の NF-κB を活性化するか調べた。そして、候補分子の中で、CXCL10 と Flt3 ligand が NF-κB を活性化することが明らかになった。これらの結果より、骨髄に転移した前立腺がん細胞は、複数の分泌因子によって MSC を誘引し、MSC ニッチの形成を促す。そして、MSC から分泌される Cxcl10 と Flt3 ligand によってがん細胞の NF-κB が活性化され、骨髄で増殖、骨転移の発症に至る可能性が示唆された（図）。

骨転移早期過程における MSC ニッチとがん細胞の分子的相互作用



# 145. 骨髄ニッチによる骨転移発症制御機構の解明

口丸　高弘

*東京工業大学 生命理工学院

Key words：骨転移，骨髄ニッチ，骨転移モデルマウス，間葉系幹細胞

## 緒　言

骨転移は前立腺がん、乳がんなどで頻発し、患者の生活の質を著しく悪化させる。現在、臨床認可されている骨転移の治療法は、自覚症状やX線診断などにより検出される、亢進期の骨転移に適用されるビスフォスフォネート系製剤や抗 receptor activator of nf-κB ligand（RANKL）抗体のみであり、疾患の根治は望めない［1］。多くの場合、原発巣が見つかった段階で骨転移のリスクが高いことから、予防的な治療アプローチが望ましいが、原発巣の治療に採用されている補助治療も骨転移の発症リスクを大きく低減できないことが報告されている［2］。骨髄に潜むがん細胞は何らかの機構によって補助療法を回避しているようである。つまり、転移早期過程における、がん細胞の生存や微小コロニーの形成・成長に関わる分子機構が殆ど解明されていないことが、骨転移の治療法開発を困難にしている。

現在、数少ない報告から、骨転移早期過程を制御する分子機構解明の手掛かりとして、マウス骨髄内において、造血幹細胞　（HSC）の機能を制御する骨髄由来細胞群が形成する特徴的な微小環境（骨髄ニッチ）とがん細胞の相互作用が注目されている［3］。しかし、骨髄内に稀にしか形成されない骨転移コロニーと骨髄ニッチの相互作用の解析は従来のモデルマウスでは困難であり、詳細な分子機構の解明には十分に論拠が蓄積されていない状況であった。そこで、我々は、骨転移微小コロニーの効率的な組織学的解析を可能にする血行性骨転移マウスの構築手法［4］とマウス骨髄に播種されたがん細胞の増殖や転写因子活性を非侵襲的かつ高感度・定量的にモニタリングできる生物発光イメージングシステムを組み合わせた新規モデルマウスを確立した。3種類の異なるルシフェラーゼを用いて、細胞増殖に加え、骨転移の形成に重要な役割を示すことが示唆されていた転写因子 NF-κB と低酸素誘導因子（HIF）の活性を可視化するマルチレポーターシステム（MRS）を前立腺がん細胞に導入し、マウス尾動脈から移植した。発光イメージングによる骨転移病巣の経時観察の結果、NF-κB が前立腺がんの骨転移微小コロニーの成長に先立って活性化することが明らかになった。さらに、骨切片の免疫化学染色解析から、骨転移微小コロニー周辺には、間葉系幹細胞（MSC）が蓄積していた。そこで、我々は、MSC が形成する骨髄ニッチが骨転移コロニーの成長を促していると考え、マウス骨髄から単離した MSC を用いて *in vitro* における MSC とがん細胞の相互作用を解析したところ、MSC が分泌する因子によってがん細胞の NF-κB が活性化されることが明らかになった。これらの事実を元に、本研究では、MSC ニッチの形成機構と、MSC 骨髄ニッチが骨髄でのがん細胞の増殖を促す分子機構の同定を試みた。

## 方　法

### 1.　遺伝子組換え実験と動物実験倫理

本研究で実施した組換え DNA 実験は、自治医科大学遺伝子組換え実験等安全管理委員会の承認を得て、遺伝子組換え実験等安全管理規制を順守して実施した。動物実験については、自治医科大学の動物実験委員会の審査を受けた後、学長の承認を得て実施した。実験は、自治医科大学動物実験等管理規則を順守し、また「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」「研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針」等の関連法令を厳守し、可能な限り倫理面に配慮し、実験動物の尊厳を重視した実験を実施した。

*現在の所属：自治医科大学 分子病態治療研究センター 分子病態研究部

**2. MSC の単離**

マウス MSC は、8～10 週齢の C57BL/6 マウスを頸椎脱臼後、大腿骨、脛骨、腸間骨を摘出・破砕し、CD45 と CD31 陰性集団から Stem cell atigen-1（Sca-1）と platelet-derived growth factor receptor-alpha（PDGFR-α）陽性分画を蛍光セルソーターによって分取した。

**3. 細胞培養**

ヒト前立腺がん細胞である PC-3 に、NF-kB 応答性ホタルルシフェラーゼ（κB-Fluc）、HIF 応答性レニラルシフェラーゼ（HRE-Rluc）、恒常的発現細胞膜結合型ウミホタルルシフェラーゼ（CMV-ClucGPI）によって構成される MRS を安定導入し、PC-3/MRS を樹立した。PC-3/MRS は RPMI に 10%の fetal bovine serum （FBS）、ペニシリン―ストレプトマイシンを添加した培地を用いて培養した。マウス初代培養 MSC は、α-MEM に 20%の FBS、basic fibroblast growth factor（5 ng/mL）、ペニシリン―ストレプトマイシンを添加した培地を用いて培養した。PC-3/MRS の単独培養もしくは PC-3/MRS と MSC を共培養した時の培養上清は、10 cm 培養ディッシュに細胞（$5\times10^5$ cells）を播種し 48 時間後に培養液を回収し、0.22μm のフィルタを通すことで調整した。

**4. 遊走アッセイ**

トランスウェルチャンバーのボトムウェルに PC-3/MRS の培養上清もしくは RPMI 培地を添加し、アッパーウェルに CellTrackerGreen で蛍光標識した MSC（$2\times10^4$ cells）を播種した。24 時間後にボトムウェルに遊走してきた MSC の数を蛍光顕微鏡観察下でカウントした。精製タンパク質を用いた遊走アッセイでは、任意の濃度の精製タンパク質をボトムウェルの RPMI 培地に添加した。

**5. NF-κB アッセイ**

96 well EZSPHERE に PC-3/MRS（$1\times10^4$ cells）播種し、細胞塊を形成させた。そこに PC-3/MRS と MSC の共培養上清もしくは精製タンパク質を任意の濃度で添加した RPMI 培地を加え、16 時間後に PC-3/MRS 細胞塊を回収、破砕した。そして細胞破砕溶液のκB-Fluc と CMV-GlucGPI 発光活性をそれぞれ測定し、κB-Fluc 発光活性／CMV-GlucGPI 発光活性の値を NF-κB 活性と定義した。

**6. サイトカインアレイ**

Human proteome profiler A のプロトコルに従って実施した。PC-3 の培養上清の解析では、RPMI＋10%FBS を比較対象に用いた。また、PC-3/MRS と MSC の共培養上清の解析は、Murine proteome profiler A のプロトコルに従って実施し、MSC の単独培養上清を比較対象に用いた。

**7. 統計解析**

全てのデータは mean±SEM によって表し、独立した 2 群間の検定にはステューデントの t 検定（両側検定）を使用した。$p < 0.05$ の時、統計的有意差があると判断した。

## 結　果

骨髄に漂着したがん細胞による MSC の誘引が骨髄ニッチ形成の足がかりになり、MSC 骨髄ニッチががん細胞の NF-κB の活性化を介して骨転移の成長を促す可能性について検討した。トランスチャンバーを用いた遊走アッセイにおいて、PC-3/MRS の培養上清は、血清含有培地に比べて有意に MSC を誘引した（図 1a）。そこで、培養上清に含まれる分泌因子をサイトカインアレイによって解析し（図 1b）、過去に細胞遊走を促すことが報告されている因子を複数同定した。これらの中から、MIF、PAI-1、CXCL1 の精製タンパク質を用いて MSC の遊走能への影響を解析したところ、これらの因子単独では、MSC の遊走能を向上させる傾向にはあったものの、培養上清とは異なり有意な向上は認められなかった（図 1c）。

次に、PC-3/MRS の NF-κB を活性化する因子を解析した。様々な条件から調整した培養上清を使って PC-3/MRS を培養し、NF-κB の活性化レベルを調べたところ、PC-3 と MSC の共培養上清だけが NF-kB を活性化した（図 2a）。そこで、MSC 単独と PC-3 と MSC の共培養上清に含まれる分泌因子をサイトカインアレイ解析によって比較し、MSC 由来の NF-κB 活性化因子として候補因子として、Cxcl10、Ccl5、Flt3 ligand を選出した（図 2b）。そして、これら

の精製タンパク質を PC-3/MRS に添加し、ルシフェラーゼアッセイによって NF-kB を活性するか調べた。その結果、Ccl5 と Flt3 ligand が有意に NF-κB を活性化した（図 2c）。

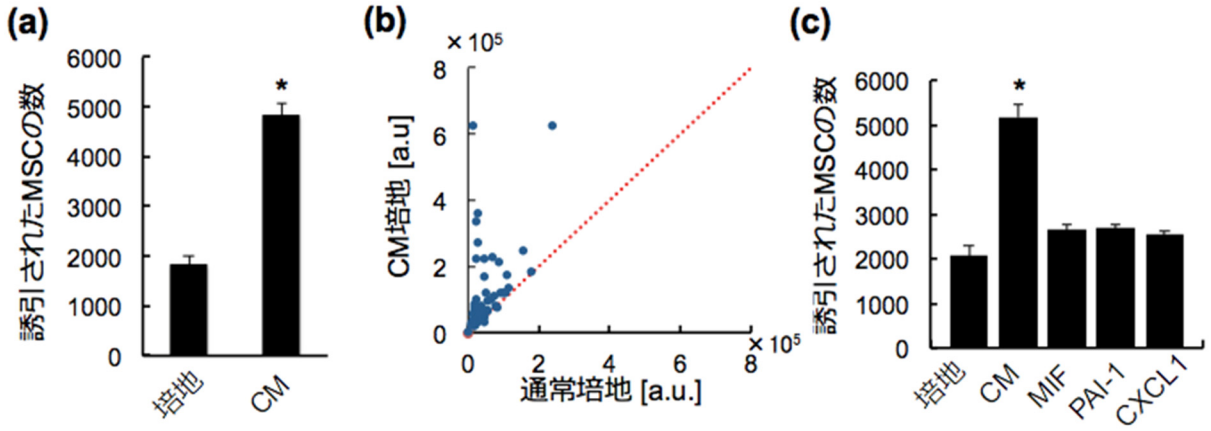



図 1. MSC の遊走を促す因子の解析

a) PC-3/MRS の培養上清（CM）を用いた MSC の遊走能の解析（*p < 0.05 vs 培地）。

b) サイトカインアレイによる PC-3/MRS 培養上清（CM）と通常培地（Control 培地）に含まれるタンパク質量の解析。サイトカインアレイ解析で得られた発光シグナルを定量化した。a.u.は任意単位を示す。

c) 精製タンパク質を添加した培地を用いた MSC の遊走能の解析（*p < 0.05 vs 培地）。

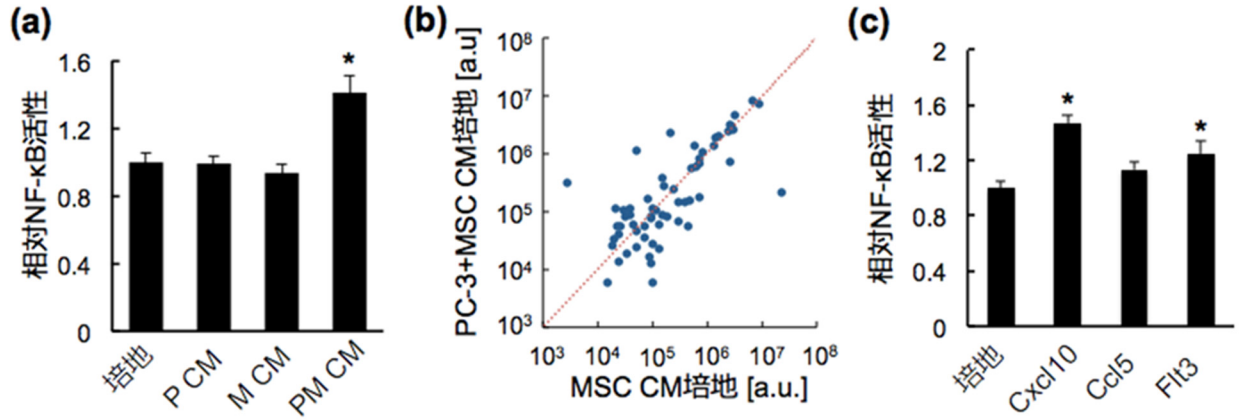



図 2. がん細胞の NF-κB を活性化する因子の解析

a) PC-3/MRS（P CM）、MSC（M CM）もしくは PC-3/MRS と MSC の共培養（PM CM）の培養上清による PC-3/MRS の NF-κB の活性化レベルの解析（*p < 0.05 vs 培地）。

b) サイトカインアレイによる MSC 単独培養上清（MSC CM 培地）と PC-3 と MSC の共培養培地（PC-3+MSC CM 培地）に含まれるタンパク質量の解析。サイトカインアレイ解析で得られた発光シグナルを定量化した。a.u.は任意単位を示す。

c) 精製タンパク質を添加した培地を用いた MSC の遊走能の解析（*p < 0.05 vs 培地）。

## 考　察

本研究では、早期骨転移病巣の治療戦略の確立を目指し、MSC 骨髄ニッチの形成機構とがん細胞の成長促進機構に関わる分子の同定を試みた。PC-3 と MSC は分泌因子を介して細胞間相互作用が示唆されたことから、サイトカインアレイを用いた主要因子の決定 PC-3/MRS から分泌される MIF、PAI-1、CXCL1 は MSC の誘引を促進する傾向にあったものの、PC-3/MRS の培養上清に比べると、その誘引効果は限定的であった。そのため、これら複数の因子が強調して MSC を強く誘引する可能性や、エクソソームと共に分泌される、マイクロ RNA のような非タンパク質性因子が MSC の誘引に果たす役割を明らかにする必要がある。MSC から分泌されるエクソソームによって、がん細胞の機能が制御される報告は多数あるものの［5，6］、がん細胞由来のエクソソームの MSC への作用については知見が限られていることから、新たな治療標的戦略の策定につながる可能性がある。

また、がん細胞の NF-κB 活性化因子として同定した Ccl5 は、PC-3/MRS と相互作用することで MSC での発現レベルが大きく上昇しており、骨髄ニッチにおける MSC の特異な表現系であると言える。このことから、Ccl5 を標的にした治療は正常な MSC への影響を極力回避しつつ、がん細胞の NF-kB の活性化を阻害することで、初期骨転移コロニーの成長を抑制できるかもしれない。さらに、乳がん細胞を用いた骨転移モデルの解析から、NF-κB の活性化は骨髄で休眠状態にあるがん細胞の増殖の再活性化に必要であることが報告されているが、どのような要因よって NF-κB が活性化されるかは明らかにされていなかった［7］。本研究で得られた知見より、MSC とがん細胞の相互作用が休眠期を経て発症する骨転移の分子機構に関わっている可能性も考えられる。今後、がん細胞-MSC の細胞間相互作用で鍵となる因子の操作が骨転移成長に与える影響を明らかにすると共に、前立腺がん以外のがん腫についても知見を広げてゆくことを考えている。

## 謝　辞

マウス MSC の譲渡及びに単離方法を指導頂いた、東京医科歯科大学大学院保険衛生学研究科の馬渕洋博士に御礼申し上げる。

## 文　献

1） Suva LJ, Washam C, Nicholas RW, Griffin RJ. Bone metastasis: mechanism and therapeutic opportunities. Nat Rev Endocrinol. 2011 Apr; 7(4）: 208-18. Epub 2011 Jan 4. PMID: 21200394 DOI: 10.1038/nrendo.2010.227

2） Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. J Clin Oncol. 2000 Jan; 18(1）: 80-6. PMID: 10623696 DOI: 10.1200/JCO.2000.18.1.80

3） Croucher PI, McDonald MM, Martin TJ. Bone metastasis: the important for the neighbourhood. Nat Rev Cancer. 2016 May 25; 16(6）: 373-86. PMID: 27220481 DOI: 10.1038/nrc.2016.44

4） Kuchimaru T, Kataoka N, Nakagawa K, Isozaki T, Miyabara H, Minegishi H, Kadonosono T, Kizaka-Kondoh S. A reliable murine model of bone metastasis by injecting cancer cells through caudal arteries. Nat Commun. 2018 Jul 30; 9(1）: 2981. PMID 3006195 DOI: 10.1038/s41467-018-05366-3

5） Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, Yoshida M, Tsuda H, Tamura K, Ochiya T. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. Sci Signal. 2014 July 1; 7(332）: ra63 PMID 24985346 DOI: 10.1126/scisignal.2005231

6） Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, Xu X, Wang M, Qian H, Xu W. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. Cancer Lett. 2012 Feb 1; 315(1）: 28-37. Epub 2011 Oct 14 PMID: 22055459 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.10.002

7） Lu X, Mu E, Wei Y, Reithdorf S, Yang Q, Yuan M, Yan J, Hua Y, Tiede BJ, Lu X, Haffty BG, Pantel J, Massague J, Kang Y. Cancer Cell. 2011 Dec 13; 20(6）: 701-14. Epub 2011 Dec 1. PMID: 22137794 DOI: 10.1-16/j.ccr.2011.11.002