

## がん骨転移の分子メカニズムと転移抑制

## 《研究の概要》

現代のがん治療においてがん転移の克服は重要な課題である。特に、最近患者数が増えている乳がんや前立腺がんは、骨に高頻度で転移し、それは激しい痛みや運動障害を引き起こすことから、骨転移の分子メカニズムを解析し、転移の予防と治療法の開発をすることが急務になっている。

transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )ファミリーは、強力な細胞増殖抑制因子であり、TGF- $\beta$ ファミリーの作用からの逸脱はがん細胞の悪性化と密接に関わっている。一方、TGF- $\beta$ ファミリーには細胞外マトリックスの産生促進、血管新生や epithelial-mesenchymal transition (EMT) 促進などの作用があり、微小環境に作用してがん細胞の増殖や浸潤・転移を促す一面もあり、がんの骨転移において TGF- $\beta$  シグナルが、いつどのように作用するかを明らかにすることは極めて重要である。

そこで、本研究において申請者らは、革新的インビボイメージングシステムを駆使し、乳がん骨転移における TGF- $\beta$  ファミリーシグナル伝達の時空間的制御機構を解明し、新たな治療法開発のための基礎的知見を得ることを目的に研究を進めた。

まず、病理的手法を用いてヒト乳がん組織における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの解析をおこなった。具体的には、ヒト乳がん細胞株 MDA-231-D 細胞の骨転移モデルの骨転移巣における TGF- $\beta$  のシグナル伝達分子 Smad2/3 および BMP のシグナル伝達分子 Smad1/5/8 のリン酸化を調べ、骨転移巣でこれらのリン酸化が亢進していることを明らかにした。さらに、乳がんの腫瘍切除術を受けた患者の原発巣組織、骨転移組織、リンパ節転移組織を用いて、Smad 蛋白の発現とそのリン酸化の免疫組織染色をおこない、特に骨転移巣のがん細胞でこれらのリン酸化が亢進していることを明らかにした。

次に、革新的光イメージング技術を駆使し、新たな乳がん転移モデルとインビボイメージング法の開発をおこなった。具体的には、細胞周期をインビボでイメージング出来るシステムを開発し、生きているマウスの中でがん細胞の細胞周期をイメージングすることに成功した。さらに、発光イメージングを使ってマウスに移植したがん細胞の中の TGF- $\beta$  と BMP シグナルの可視化に成功し、がん細胞内の TGF- $\beta$  と BMP のシグナルは、乳がん細胞の骨転移の早期から活性化されていることを明らかにした。

また、新しい骨芽細胞分化マーカーの探索と機能解析をおこなった。具体的には、骨芽細胞分化に重要な遺伝子を同定し、機能解析をおこなった。その結果、C/EBP  $\beta$ 、Osterix、Arkadia などの役割を明らかにした。

## 研究者氏名及び所属機関

<u>氏名</u>	<u>所属機関名</u>	<u>分担研究テーマ</u>
今村 健志	財団法人癌研究会 癌研究所生化学部部長	研究の総括、インビボイメージング法の開発
前田 真吾	財団法人癌研究会 癌研究所生化学部研究員	新しい骨芽細胞分化マーカー探索と機能解析
鯉沼 代造	財団法人癌研究会 癌研究所生化学部研究員	新たな乳がん転移モデルの開発
井上 靖道	財団法人癌研究会 癌研究所生化学部研究員	インビボイメージング法の開発
疋田 温彦	財団法人癌研究会 癌研究所生化学部研究員	新しい骨芽細胞分化マーカー探索と機能解析
神田 浩明	財団法人癌研究会 癌研究所病理部研究員	ヒト乳がん組織の検討

## 研究報告

### I 研究目的

乳がんや前立腺がんなどにおいては、がんが骨に高頻度で転移し、それは激しい痛みや運動障害を引き起こすことから、患者の生活の質 (quality of life; QOL) を著しく低下させる。よって、骨転移の分子メカニズムを解析し、転移の予防と治療法の開発をすることが急務になっている。近年、網羅的遺伝子発現解析等によるがんの遺伝子異常・タンパク質発現異常の検索により、新規の薬剤標的が精力的にスクリーニングされているが、中でも transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ファミリーシグナルは、がんの転移進展において重要な役割を果たしていることが示唆され、治療薬創出の有力な候補となっている。

TGF- $\beta$  ファミリーは、強力な細胞増殖抑制因子であり、TGF- $\beta$  ファミリーの作用からの逸脱はがん細胞の悪性化と密接に関わっている。一方、TGF- $\beta$  ファミリーには細胞外マトリックスの産生促進、血管新生や epithelial-mesenchymal transition (EMT) 促進などの作用があり、微小環境に作用してがん細胞の増殖や浸潤・転移を促す一面もある。すなわち TGF- $\beta$  ファミリーシグナルは、がん細胞に対して、発がんの初期においては抑制に働くが、後期には促進に働くと考えられる。微小環境にがん細胞の増殖や浸潤・転移を促す。このような観点からがんの骨転移において TGF- $\beta$  シグナルが、いつどのように作用するかを明らかにすることは極めて重要である。

申請者らは、これまでに TGF- $\beta$  や bone morphogenetic protein (BMP) を含む TGF- $\beta$  ファミリーレセプターと細胞内シグナル伝達因子 Smad のクローニングと機能解析、TGF- $\beta$  ファミリーシグナル調節機構の解明などの研究を精力的におこなってきた。さらに最近では、TGF- $\beta$  シグナル阻害剤を用いた研究成果を発表し、治療法開発を目指した応用分野にも力を入れている。そこで、本研究において申請者らは、TGF- $\beta$  ファミリーシグナルに

関する研究実績を踏まえ、乳がん骨転移における TGF- $\beta$  ファミリーシグナル伝達の時空間的制御機構を解明し、新たな治療法開発のための基礎的知見を得ることを目的にし、(1)ヒト乳がん組織における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの解析、(2)新たな乳がん転移モデルとインビボイメージング法の開発、(3)新しい骨芽細胞分化マーカーの探索と機能解析の具体的な3点に焦点を絞って研究を進めた。

## II 研究計画及び材料と方法

### (1)ヒト乳がん組織における TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの解析

TGF- $\beta$  ファミリーシグナルに重要な Smad タンパク質の発現とそのリン酸化の免疫組織染色の基礎実験として、TGF- $\beta$  およびファミリー分子の BMP を添加した培養細胞のウエスタンブロッティングとセルブロックの免疫染色で、TGF- $\beta$  のシグナル伝達分子 Smad2/3 および BMP のシグナル伝達分子 Smad1/5/8 のタンパク質の発現とリン酸化を検出する抗体を検定した。具体的には、抗 Smad2/3 抗体、抗 Smad1/5/8 抗体、抗リン酸化 Smad2 抗体、抗リン酸化 Smad3 抗体、抗リン酸化 Smad1/5/8 抗体の特異性を確認し、免疫染色の条件を設定した。

次に、上記の結果を踏まえ、我々が作製したヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞の亜株で高率に骨に転移する乳がん細胞株 MDA-231-D 細胞の骨転移モデルの骨転移巣における Smad2/3 および Smad1/5/8 のリン酸化を調べた。

さらに、有明癌研病院で乳がんの腫瘍切除術を受けた患者 100 例の腫瘍組織、非腫瘍組織および転移組織を用いて、Smad タンパク質の発現とそのリン酸化の免疫組織染色をおこなった。特に、原発巣と骨転移、リンパ節転移と肺転移における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの相違について詳細に解析した。

### (2)新たな乳がん転移モデルとインビボイメージング法の開発

移植したマウスが生きている状態で、生物発光と蛍光の技術を駆使し、がん細胞の振る舞いをリアルタイムで観察できるインビボイメージング法を開発・改良した。特に、ルシフェラーゼ遺伝子と green fluorescent protein (GFP) 関連タンパク質を融合した遺伝子をスクリーニングし、高感度で生物発光と蛍光検出できるプローブの開発をおこなった。開発したプローブの遺伝子は、ウイルスを使ってがん細胞に導入して安定発現株を作製し、生きたマウスのがん細胞の振る舞いの観察を試みた。

生物発光と蛍光の検出系を開発・改良するとともに、細胞周期をインビボでイメージング出来るシステムを開発し、生きているマウスの中でがん細胞の細胞周期をイメージングすることを試みた。さらに、生物発光イメージングを使ってマウスに移植したがん細胞の中の TGF- $\beta$  と BMP シグナルをマウスが生きている状態で経時的に観察することを試みた。

### (3)新しい骨芽細胞分化マーカーの探索と機能解析

骨と骨髄の中には、間葉系細胞から免疫細胞に至まで様々な細胞が存在するが、中でも骨芽細胞はがん幹細胞を支える骨髄ニッチにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。ところが、骨芽細胞の分化マーカーに関する知見は少なく、どのような分化段階

にある骨芽細胞ががん幹細胞を支えているかは未だ不明である。そこで、本研究課題では、マイクロアレイの手法を用いて骨芽細胞分化マーカーのスクリーニングをおこない、その生理的な役割を、培養細胞を用いた *in vitro* 実験と遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 実験で明らかにした。具体的には、マウス骨髄間葉系幹細胞、マウス初代培養骨芽細胞、マウス筋芽細胞 C2C12 細胞に BMP を添加し、骨芽細胞分化する過程で上昇する遺伝子を同定し、機能解析をおこなった。

### III 研究成果

#### (1) ヒト乳がん組織における TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの解析

TGF- $\beta$  ファミリーシグナルに重要な Smad 蛋白の発現とそのリン酸化の免疫組織染色の基礎実験として、TGF- $\beta$  およびファミリー分子の BMP を添加した培養細胞のウェスタンブロッティングとセルブロックの免疫染色で、抗 Smad2/3 抗体、抗 Smad1/5/8 抗体、抗リン酸化 Smad2 抗体、抗リン酸化 Smad3 抗体、抗リン酸化 Smad1/5/8 抗体の特異性を確認し、免疫染色の条件を設定した。

上記の件を踏まえ、まず動物モデルを用いて乳がん組織における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの解析をおこなった。具体的には、我々が作製した高骨転移ヒト乳がん細胞株 MDA-231-D 細胞の骨転移モデルの骨転移巣における Smad2/3 および Smad1/5/8 のリン酸化を調べ、骨転移巣でこれらのリン酸化が亢進していることを明らかにした (Katsuno et al., *Oncogene*, 2008)。但し、リンパ節転移と肺転移においては Smad のリン酸化の程度は比較的低いことがわかった。

さらに、ヒト検体を用いて乳がん組織における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの解析をおこなった。具体的には、有明癌研病院で乳がんの腫瘍切除術を受けた患者の原発巣組織、骨転移組織、リンパ節転移組織を用いて、Smad 蛋白の発現とそのリン酸化の免疫組織染色をおこない、がん細胞でこれらのリン酸化が亢進していることを明らかにした (Katsuno et al., *Oncogene*, 2008)。

#### (2) 新たな乳がん転移モデルとインビボイメージング法の開発

移植したマウスが生きている状態で、生物発光と蛍光の技術を駆使し、がん細胞の振る舞いをリアルタイムで観察できるインビボイメージング法を開発・改良した。具体的には、数種類の変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作製し、その機能解析を進め、蛍光タンパク質との融合タンパクにおいて一部活性が高いクローンを得ることができた。得られたルシフェラーゼ遺伝子と GFP 関連タンパク質である Venus を融合した遺伝子を、我々が樹立した高骨転移ヒト乳がん細胞株 MDA-231-D 細胞にウイルスを使って導入して安定発現株を作製した。それらの細胞をマウスに移植し、移植後のがん細胞の振る舞いを、超高感度 CCD カメラを使ったインビボ発光検出機器とインビボ蛍光検出機器を用いて、観察した。ルシフェラーゼの発光については初期骨転移および早期肺転移を検出できるぐらい感度が良いことがわかったが、蛍光イメージングについては、ある程度大きくなった骨転移の検出は可能だが、深部に存在する細胞のイメージングは難しいことがわかった。

新たに骨転移モデル作製については、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いた高骨転移モデルを

試み、数クローンを得たが、MCF-7 細胞は骨での増殖が遅く、今回のモデルには不向きと結論付け、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞の新たな亜株をスクリーニングし、新たなクローンを得た。

一方、理化学研究所との共同研究で Fucci という細胞周期をインビボでイメージング出来るシステムを開発し、生きているマウスの中でがん細胞の細胞周期をイメージングすることに成功した ((Sakaue-Sawano et al., Cell, 2008)。具体的には、細胞周期の特定の時期に存在する 2 種類のタンパク質をそれぞれ赤と緑の 2 色の蛍光蛋白質でラベルし、細胞周期の進行における休止期 (G1 期) を緑、DNA 複製の時期を赤に区別してがん細胞の中で蛍光させ、それを生きたマウスに移植したがん細胞の中で観察することができた。さらに、発光イメージングを使ってマウスに移植したがん細胞の中の TGF- $\beta$  と BMP シグナルの可視化に成功し、がん細胞内の TGF- $\beta$  と BMP のシグナルは、乳がん細胞の骨転移の早期から活性化されていることを明らかにした (Katsuno et al., Oncogene, 2008)。

### (3) 新しい骨芽細胞分化マーカーの探索と機能解析

マイクロアレイの手法を用いて骨芽細胞分化マーカーのスクリーニングをおこない、具体的には、マウス骨髄間葉系幹細胞、マウス初代培養骨芽細胞、マウス筋芽細胞 C2C12 細胞に BMP を添加し、骨芽細胞分化する過程で上昇する遺伝子を同定し、機能解析をおこなった。その結果、C/EBP $\beta$  など重要な因子の存在を明らかにし、その生理的な役割を遺伝子改変マウスで明らかにした (Tominaga et al., MBC, 2008)。さらに、骨芽細胞分化における Osterix の役割を明らかにし (Tominaga et al., JBMM, 2009)、TGF- $\beta$  /BMP シグナルを制御する E3 ユビキチンリガーゼ Arkadia が、骨芽細胞と同じオリジンを持つ筋芽細胞分化を制御していることを明らかにした (Yuzawa et al., BONE, 2009)。さらに、Hesr1/3 のダブルノックアウトマウスの解析を進め、Hesr1/3 が骨芽細胞における破骨細胞制御に重要な働きを担っていることを明らかにした。また、TGF- $\beta$  ファミリー分子のシグナルを制御する E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1/2 のノックアウトマウス・トランスジェニックマウスの作製と解析を進め、Smurf1/2 が骨代謝において重要な働きを担っている知見を得た。

## IV 考察

動物が活着している状態で生体そのものを丸ごと解析し、がん細胞の動態や機能をイメージングする *in vivo* (インビボ) イメージングは、がん細胞の振る舞いのみならず、その機能やがん微小環境を解析し、がんの病態の解明、医薬品開発、医薬品の作用機序の解明や薬効評価などに有用な情報を与える新しいテクノロジーである。特に、生物発光や蛍光技術を駆使したインビボ光イメージングは、まだ医療現場ではあまり使われていないが、動物実験においては、安価で簡便、さらに多元的な解析が可能なことから、その有用性が最近注目されている。本研究課題では、インビボ生物発光イメージングとインビボ蛍光イメージングを用いて、乳がん骨転移を経時的にモニタリングし、さらにその細胞内 TGF- $\beta$  ファミリーシグナルをイメージングし、がん骨転移における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの時空間的制御機構を明らかにした。この結果を、病理学的所見と乳がん患者の検体組織に

おける結果と比較検討したところ、3者は相関し、このモデルが有用であることが確認された。

インビボ光イメージングを用いると、同一個体を経時的に長期間観察できるので、個体差に左右されない精度の高い実験データを得ることができる。また、経時的観察の度に動物を屠殺する必要がなく、実験に用いる動物の数を激減させることができ、動物福祉の面からも有用である。また、本研究課題でおこなったように標的遺伝子の発現を測定するプロモーターレポーターシステムを用いると生きているマウスの中でがん細胞のシグナル伝達を経時的に観察することができる。このようなシグナル伝達イメージングは分子標的治療研究に有用である。さらに、インビボ発光イメージングはマイクロドーズ試験にも有用で、トランスレーショナルリサーチを効率的に進めるツールとして非常に重要な役割を果たすと考えられる。一方、蛍光イメージングについては、工夫によってさまざまな蛍光プローブの作成が可能で、細胞周期から各種ストレスまでイメージングすることができる。実際に我々は、共同研究で、生体で細胞周期をリアルタイムで可視化する蛍光イメージング技術を開発し、生きたマウスの中でがん細胞の細胞周期をモニタリングすることに成功した。このようなインビボ蛍光イメージングは、発光イメージングとは異なりルシフェリンなどの基質を必要としないため、簡便性や経済性に優れている。研究対象に応じた分子蛍光プローブと検出機器さえあれば、インビボ発光イメージングと同様な手法で研究に応用できる。

これまでのがん研究は、培養細胞を用いた *in vitro* 実験と組織を固定する病理学的実験が中心であった。これらは、必ずしも、がんの生体での振る舞いを正確に反映していないことが問題だった。特に、がん転移の複雑なカスケードの分子メカニズムを明らかにするには、がん細胞の機能とがん微小環境を多元的にしかも時空間的に解析する必要があるため、動物を生きたままの状態での解析するテクノロジーが必須である。さらに、インビボ光イメージングは、その迅速性、簡便性、汎用性から、がん研究のみならず様々な研究分野にわたる動物実験のデザインそのものを急速に変化させ、ライフサイエンス全般の発展に寄与することが期待される。

## V 研究成果の発表

- 1: Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A: Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*. 132: 487-98, 2008
- 2: Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, Ishikawa Y, Akiyama F, Iwase T, Ogata E, Ehata S, Miyazono K, Imamura T: Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene*. 27: 6322-33, 2008.
- 3: Tominaga H, Maeda S, Hayashi M, Takeda S, Akira S, Komiya S, Nakamura T,

- Akiyama H, Imamura T: CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$  Promotes Osteoblast Differentiation by Enhancing Runx2 Activity with ATF4. *Mol Biol Cell*. 19: 5373-86, 2008
- 4: Fukunaga E, Inoue Y, Komiya S, Horiguchi K, Goto K, Saitoh M, Miyazawa K, Koinuma D, Hanyu A, Imamura T: Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. *J Biol Chem*. 283: 35660-7, 2008
- 5: Yuzawa H, Koinuma D, Maeda S, Yamamoto K, Miyazawa K, Imamura T: Arkadia represses the expression of myoblast differentiation markers through degradation of Ski and the Ski-bound Smad complex in C2C12 myoblasts. *Bone*. 44: 53-60, 2009
- 6: Tominaga H, Maeda S, Miyoshi H, Miyazono K, Komiya S, Imamura T: Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Metab*. 27: 36-45. 2009
- 7: Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T: SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- $\beta$  signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem*. 284: 3334-44, 2009.
- 8: Nakano A, Koinuma D, Miyazawa K, Uchida T, Saitoh M, Kawabata M, Hanai JI, Akiyama H, Abe M, Miyazono K, Matsumoto T, Imamura T: Pin1 downregulates TGF- $\beta$  signaling by inducing degradation of Smad proteins. *J Biol Chem*. 284: 6109-15, 2009.
- 9: Hanyu A, Kojima K, Hatake K, Nomura K, Murayama H, Ishikawa Y, Miyata S, Ushijima M, Matsuura M, Ogata E, Miyazawa K, Imamura T: Functional in vivo optical imaging of tumor angiogenesis, growth, and metastasis prevented by administration of anti-human VEGF antibody in xenograft model of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Cancer Sci*. 100: 2085-92, 2009
- 10: Ito I, Hanyu A, Wayama M, Goto N, Katsuno Y, Kawasaki S, Nakajima Y, Kajiro M, Komatsu Y, Fujimura A, Hirota R, Murayama A, Kimura K, Imamura T, Yanagisawa J.: Estrogen inhibits transforming growth factor  $\beta$  signaling by promoting Smad2/3 degradation. *J Biol Chem*. 285: 14747-55, 2010.

11: Inoue Y, Iemura S, Natsume T, Miyazawa K, Imamura T. Suppression of p53 Activity through the Cooperative Action of Ski and Histone Deacetylase SIRT1. *J Biol Chem*. 286: 6311-20. 2011.