

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16670

研究課題名（和文）骨肉腫由来エクソソームによる骨微小環境への影響に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Osteosarcoma derived extracellular vesicles suppress osteoclastogenesis and enhance lung metastasis.

研究代表者

相羽 久輝 (Hisaki, Aiba)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：70793834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,300,000 円

研究成果の概要（和文）：骨肉腫制御において局所の進展・転移のメカニズムを解明することが臨床的に求められています。私たちは骨肉腫の進展機構において、小型膜小胞として分泌されるエクソソームに着目し、これまで研究をおこなってきました。その結果、1) 骨肉腫由来エクソソームにて破骨細胞の分化が阻害され、2) 骨肉腫周囲の破骨細胞が少ない方がより遠隔転移能を有していることを見出しました。また、エクソソームの分泌に重要なタンパクであるTSG101ノックアウト骨肉腫細胞株を作成し、骨肉腫由来エクソソーム減弱モデルを作成することで、エクソソームが腫瘍の転移や破骨細胞の分化に影響を及ぼしているかを調査しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫は小児から成人にかけて発生する骨の悪性腫瘍として最も頻度が高いと言われています。歴史的には患肢切断による治療が一般的でしたが、切断後も高率で肺転移が出現するため、治療が難しい病気でした。術前術後の化学療法が確立すると共に、人工関節による手術治療が発展することで、患肢温存とともに長期生存が可能となってきています。しかし、多くの場合に初診時から微小転移が肺などに潜んでおり、転移進展機構の解明や、新たな治療戦略を開発することが急務であると考えられます。我々は今回、骨肉腫から分泌されるエクソソームに着目し研究を行い、エクソソームにより、微小環境や遠隔転移に影響している可能性を見出しました。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of the mechanism of local progression and metastasis in osteosarcoma control is essential. We have conducted a research of the exosomes secreted from osteosarcoma during the disease progression. As a result, we found that 1) osteoclast-derived exosomes inhibited osteoclast differentiation, and 2) less osteoclasts around osteosarcoma related to greater distant metastatic potential of osteosarcoma. In addition, by creating a TSG101 knockout osteosarcoma cell line, which is an important protein for exosome secretion (exosome attenuation model), we revealed how osteosarcoma-derived exosomes acted for the metastasis or osteoclast differentiation.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫の局所進展・転移のメカニズムを解明することは、骨肉腫制御の新たな戦略となる可能性がある。私たちは骨肉腫細胞株より小型膜小胞として分泌されるエクソソームに着目し、これまで研究をおこなってきた。その結果、1) 骨肉腫由来エクソソームにて破骨細胞の分化が阻害され、2) 骨肉腫周囲の破骨細胞が少ない方がより高い遠隔転移能を有していることを見出した。

また、エクソソームの分泌に重要なタンパクである TSG101 をノックアウトした骨肉腫細胞株を作成し、骨肉腫由来エクソソーム減弱モデルを作成することで、エクソソームの多寡が腫瘍の転移や破骨細胞の分化にどのような影響を及ぼしているかの調査を計画していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) 骨肉腫由来エクソソーム減弱モデルの *in vivo* におけるより詳細な解析を行う事、2) 破骨細胞の分化に及ぼすエクソソーム中の因子を調査することを行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### TSG ノックアウトマウスの作成

マウス骨肉腫細胞株 (LM8) に対して、CrisprCas9 法による TSG101 のノックアウトを行った。

### 骨肉腫モデルの作成

LM8 より TSG101 をノックアウトした細胞株 LM8 TSG101-KO 細胞とコントロール細胞株を、8 週齢のオス C3H / He マウスの遠位大腿骨に移植を行った。移植された腫瘍が 1,000 mm<sup>3</sup> に達したとき、または移植後 4 週間で、肺と大腿骨を採取し、遠隔転移巣および原発巣モデルを作成した。

### 組織評価

組織をパラフィン包埋切片に加工し、HE 染色を行った。免疫組織染色は、脱パラフィン切片を、カテプシン K、Ki67、CD31、VEGF 抗体にて染色を行い、組織の観察を行った。

### エクソソームの分離

LM8 から分泌されたエクソソーム (LM8-EV) の収集として、1×10<sup>6</sup> の LM8 細胞を 2% エクソソーム枯濁 FBS と DMEM で 2 日間培養した。超遠心法によるエクソソームの収集法にてエクソソームを回収し、NanoSIGHT™ LM10 を使用したナノ粒子追跡分析で濃度を測定した。

### 破骨細胞形成

8 週齢の C57BL/6 マウスの大腿骨および脛骨から骨髓を採取し、RANKL とともに培養を行い、破骨細胞の形成を行った。

## 4. 研究成果

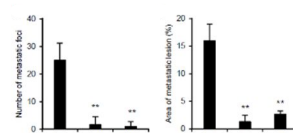
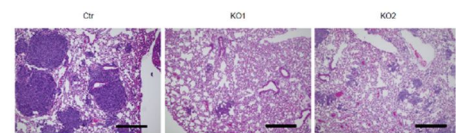
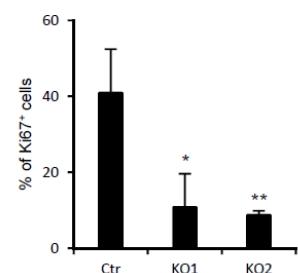
### エクソソーム低下骨肉腫同所移植モデル

骨肉腫におけるの効果を分析するために、TSG101 をノックアウトすることにより、エクソソームの分泌能が低下したマウス骨肉腫 LM8 細胞株 (LM8 TSG101-KO 細胞) の生成を行った。LM8 TSG101-KO 細胞は、EV の分泌が約 40% まで低下していたが、*in vitro* で細胞増殖に違いは認められなかった。

LM8 TSG101-KO 細胞の *in vivo* での進展機構を明らかにするために、マウスの大腿骨遠位骨内に移植を行ったところ、*in vitro* とは異なり LM8 TSG101-KO 細胞の増殖は、発育の遅延を認めた。原発病変の Ki67 染色を行ったところ、LM8 TSG101-KO 細胞では Ki67 の発現が 4 分の 1 に抑制されたことが示された (左図)。骨肉腫由来のエクソソームは隣接する細胞と相互作用することにより、腫瘍の増殖に有利な微小環境を作る可能性が示唆された。また、TSG101-KO 細胞では腫瘍内において、CD31 陽性細胞の 75% の減少、VEGF 陽性領域の約 75% の減少が認められ、血管新生がエクソソームの低下により強く抑制されたことが示された。

エクソソーム分泌と遠隔転移との関連に関して、肺病変を評価したところ、TSG101-KO 細胞をでは、コントロールと比べ、転移巣の数が 15 倍以上少なく、転移病変の面積が 6 分の 1 小さいことを示した (左図)。

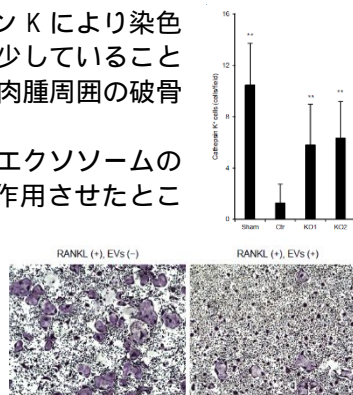
以上を踏まえ、骨肉腫由来のエクソソームが腫瘍の局所進展や遠隔転移に有利となる腫瘍微小環境を変化させることが示唆された。



## エクソソームと破骨細胞との関係

同様に LM8 TSG101-KO 細胞周囲の破骨細胞をカタプシン K により染色したところ、コントロールでは腫瘍周囲の破骨細胞が減少していることが確認された(左図)。この結果より、エクソソームが骨肉腫周囲の破骨細胞形成を阻害していることが示唆された。

また、*in vitro* 破骨細胞形成モデルにて、骨肉腫由来エクソソームの作用を調査した。エクソソームを破骨細胞前駆細胞に作用させたところ、10 個以上の核を含む大きな OC ( $> 10,000 \mu\text{m}^2$ ) の数が減少し、約 3-9 の核を含む小さな OC ( $1,000-10,000 \mu\text{m}^2$ ) の数が増加しました(左図)。さらに、LM8-EV は Trap mRNA の発現を成熟 OC と比較して約 70%抑制しました。この結果から、骨肉腫由来エクソソームが破骨細胞の成熟を阻害し、破骨細胞の融合阻害が生じていることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 相羽 久輝, 吉田 孟史, 山本 憲男, 林 克洋, 荒木 麗博, 土屋 弘行, 華山 力成	4. 巻 53
2. 論文標題 最新基礎科学 知っておきたい 骨とエクソソーム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床整形外科	6. 最初と最後の頁 1122-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1408201242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相羽 久輝, 吉田 孟史, 山本 憲男, 林 克洋, 武内 章彦, 三輪 真嗣, 阿部 健作, 谷口 裕太, 荒木 麗博, 大塚 隆信, 土屋 弘行, 高橋 智, 華山 力也
2. 発表標題 骨微小環境と遠隔転移能に対する骨肉腫由来エクソソームの機能解析
3. 学会等名 日本整形外科骨軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nguyen Duc Tuan, 相羽 久輝, 吉田 孟史, 荒木 麗博, 華山 力也
2. 発表標題 Extracellular vesicles released from osteosarcoma alter bone microenvironment
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----