

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791395

研究課題名(和文) マイクロRNAによるヒト骨肉腫肺転移抑制効果

：モデル動物を用いた検討

研究課題名(英文) Inhibition of lung metastasis of osteosarcoma by microRNA

：Trial in mice model

研究代表者

尾崎 充彦 (OSAKI MITSUHIKO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40325006

研究成果の概要(和文)：

ヒト骨肉腫細胞株を用い、細胞増殖に影響せず、浸潤能を抑制する miR-143 を同定した。miR-143 を骨肉腫自然肺転移モデルマウスへ全身投与することにより、肺転移を抑制することを明らかにした。アレイ解析によるヒト骨肉腫細胞株における miR-143 標的遺伝子群探索の結果、6 遺伝子が候補としてあげられ、中でもマトリックスメタロプロテアーゼ 13(MMP13)が最も蛋白レベルでの発現が抑制された。ヒト骨肉腫切除標本における miR-143 発現を real-time PCR にて検索した結果、術後肺転移陰性群の 1.23 にたいし、陽性群では 0.61 と低値を示した。さらに、術後転移陰性の miR-143 高発現例では、腫瘍細胞における MMP13 発現が極めて乏しかった。以上より、ヒト骨肉腫細胞における miR-143 発現低下による MMP13 発現増加を介した浸潤能の促進が、骨肉腫の肺転移に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

miR-143 was identified as an miRNA which suppressed invasiveness, but not cell proliferation, in a human osteosarcoma cell line, 143B. Systemic injection of miR-143 significantly suppressed lung metastasis of 143B cells in mice model. Microarray analysis identified 6 genes as candidates of miR-143-target genes. Moreover, matrix metalloprotease13 (MMP13) was mostly protein downregulated by miR-143. Real-time PCR analyses using clinical samples revealed that expression of miR-143 was 1.23 in osteosarcoma patients without lung metastasis and 0.61 in those with lung metastasis, being lower in later than former. Moreover, little expression of MMP13 was observed in osteosarcoma cases showing high miR-143 expression. Taken together, these data indicated that the downregulation of miR-143 correlated with lung metastasis of human osteosarcoma cells by promoting cellular invasion via MMP13 upregulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨・軟部腫瘍

1. 研究開始当初の背景

ヒト骨肉腫は、悪性腫瘍の 0.1%程度を占める比較的稀な骨原発のがんであるが、その 75%は 10代で発症し、小児に発生する特徴を持っている。原発巣に対する治療は、外科的切除と化学療法との組み合わせによりおこなわれるが、その 5年生存率は 60-70%であり、30-40%は、術後 2-3年以内に肺転移を生じ、予後不良を示す。したがって、骨肉腫の術後の肺転移を抑制することが、患者（特に小児患者）の予後の改善につながり、転移予防法の確立が望まれている。

本研究申請者は、これまでに 2種のヒト骨肉腫細胞株(HOS, 143B)について検索し、*in vitro* において著しい増殖能の差を示さないにもかかわらず、動物に接種した場合前者は肺転移を生じないが、後者は高頻度に肺転移を生じることを見い出してきた。143B細胞は HOS細胞を *v-Ki-ras*によりトランスフォームした細胞株であり、遺伝的背景が極めて類似しているにも関わらず、転移能に関しては明らかに異なる。両細胞株の性状を規定する遺伝子制御を明らかにするため、マイクロRNA(miRNA, miR)に着目し、両細胞株の miRNA発現を miRNA microarrayにて検索し、143B(高転移株)にて発現が増加している miRNA 19種および低下している miRNA 9種を同定した。

2. 研究の目的

ヒト骨肉腫肺転移を制御する miRNA を同定し、その標的遺伝子群を明らかにするために、以下の 3点について検討した。

(1)前述した高転移株にて発現異常がみられる miRNA について発現量を補正することで肺転移抑制効果を示す miRNA を明らかにする。

(2)肺転移関連が示された miRNA の標的遺伝子群を探索する。

(3) 肺転移関連が示された miRNA およびその標的遺伝子発現をヒト臨床材料を用いて検索する。

3. 研究の方法

1)ヒト骨肉腫細胞の浸潤能を抑制し、増殖能には影響しない miRNA の同定

miRNA microarray 解析により、143B(肺高転移株)で発現が増加していた miRNA の anti-miRNA を用い 143B Fluc ヘトランスフェクションした。一方、発現が低下していた miRNA については、合成した miRNA を同様に 143B Fluc ヘトランスフェクションした。対照コントロールとして、negative control anti-miRNA(anti-miR NC)あるいは negative control miRNA(miR-NC)を用いた。トランスフェクション 48時間後の細胞を用い、浸潤能および細胞増殖能について検索した。

2)骨肉腫細胞自然肺転移モデルにおける肺転移抑制効果の評価

1)で同定した miRNA(miR-143)をアテロコラーゲンを用い、骨肉腫細胞自然肺転移モデルマウス尾静脈へ投与した。143B Fluc細胞をマウス膝関節内へ接種した翌日から 3日毎に 50 μ g ずつ投与し、1週間ごとに IVIS 装置にて肺転移の有無を経時的に観察した。4週間をエンドポイントとし、犠牲死させた後、原発巣および肺を摘出し、組織学的検索をおこなった。対照コントロールとして、negative control anti-miRNA(anti-miR NC)あるいは negative control miRNA(miR-NC)を投与したマウスを用いた。

3)ヒト骨肉腫組織標本における転移関連 miRNA 発現と臨床病理学的因子との関連性の検索

2)の検討から、骨肉腫細胞自然肺転移モデ

ルにおいて肺転移を抑制した
miRNA(miR-143)について、ヒト骨肉腫切除標本
における発現を Real-time PCR にて検索した。

4) *in vivo*にて転移抑制効果を示した

miRNA(miR-143)の標的 mRNA の検索

2)の検討から、骨肉腫細胞自然肺転移モデル
において肺転移を抑制した

miRNA(miR-143)についてそれらの標的 mRNA
を検索した。miRNAは、RNA-induced silencing
complex (RISC) に取り込まれた後、相補的
な配列を3' 非翻訳領域にもつ複数種の標
的 mRNA に結合する。したがって転移を抑制
する miR-143 を 143B へトランスフェクショ
ンし RISC を免疫沈降法で分離精製後、RNA を
抽出 (Ago2 IP 法) した。対照コントロール
である miR-NC トランスフェクションと比較
し、RISC 内への取り込みが増加した mRNA が
標的であることが強く示唆される。同時に、
ジゴキシゲニン標識した miR-143 を 143B へ
トランスフェクションし、抗ジゴキシゲニン
抗体にて免疫沈降 (LAMP 法) した。以上の異
なる 2 種の方法にて回収された RNA をアレイ
解析にて検索し、共通する遺伝子の中から、
データベース上 miR-143 標的遺伝子と考えら
れているものあるいは細胞の遊走や浸潤に
関わる 6 遺伝子を絞り込んだ。絞り込まれた
遺伝子産物を蛋白レベルで検索し、miR-143
トランスフェクションにより 143B における
発現の減少を確認した。さらに骨肉腫切除標
本 (原発巣) における発現を併せて検索した。

4. 研究成果

in vitro の解析より、ヒト骨肉腫細胞株
143B にたいし、細胞増殖に影響せず、浸潤能
を抑制する効果を示す miRNA として miR-143
を同定した。さらにヒト骨肉腫細胞自然肺転
移モデルマウスを用いた解析より、miR-143
が肺転移抑制効果をもつことも見い出され
た。143B 細胞における miR-143 標的遺伝子群

探索のため、2 種の異なる miRNA 標的 RNA 回
収法 (Ago2 IP 法&LAMP 法) にて回収された
RNA をアレイ解析した結果、共通する 78 遺
伝子を検出した。さらにデータベース上
miR-143 標的遺伝子と考えられているものあ
るいは細胞の遊走や浸潤に関わる 6 遺伝子
を絞り込み、miR-143 導入により蛋白発現レ
ベルが最も低下した遺伝子としてマトリッ
クスメタロプロテアーゼ 13 (MMP13) を同定し
た。ヒト骨肉腫切除標本 22 例を用いて原発
巣における miR-143 および MMP13 発現を解析
した結果、術後肺転移陰性群 (n=15) におけ
る miR-143 発現量が 1.23 であるのに対し、術
後肺転移陽性群 (n=7) は 0.61 と低値を示して
いた。さらに MMP13 は骨肉腫原発巣腫瘍先進部
の腫瘍細胞に高率に発現していたが、
miR-143 高発現例では腫瘍細胞における
MMP13 発現率が極めて乏しかった。

以上より、miR-143 の全身投与によりヒト
骨肉腫細胞の動物モデルにおける肺転移抑
制効果を示すと共に、ヒト骨肉腫細胞にお
ける miR-143 発現低下が MMP13 発現抑制機構
の破綻を生じ、結果として骨肉腫細胞の浸潤能
の促進が肺転移と繋がる機構が示唆された。

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 3 件)

- ① Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y,
Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y,
Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T,
Ito H, Oshimura M, Ochiya T:
MicroRNA-143 regulates human
osteosarcoma metastasis by regulating
matrix metalloprotease-13 expression.
Mol Ther (in press) (査読有)
- ② Takeshita F, Patrawala L, Osaki M,
Takahashi R, Yamamoto Y, Kosaka N,

Kawamata M, Kelnar K, Bader AG, Brown D, Ochiya T: Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. Mol Ther 18(1): 181-187, 2010 (査読有)

- ③ 尾崎充彦: microRNA によるがん転移の診断・治療. メディカルバイオ 6巻 31-34, 2009 (査読なし)

[学会発表] (計8件)

- ① Takeshita F, Osaki M, Sugimoto Y, Kosaka N, Yoshioka Y, Oshimura M, Ochiya T: MicroRNA Therapy for Inhibition of Lung Metastasis of Osteosarcoma Keystone Symposia, MicroRNA and Non-coding RNA and Cancer, Fairmont Banff Spring (Alberta, Canada) 2011. 2. 11-16
- ② Sugimoto Y, Osaki M, Takeshita F, Kosaka N, Oshimura M, Ochiya T: Detection of lung metastasis inhibitory miR-143 target genes in human osteosarcoma cells 第33回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (神戸)、2010. 12. 7-10
- ③ 尾崎充彦、杉本結衣、竹下文隆、小坂展慶、井藤久雄、押村光雄、落谷孝広: ヒト骨肉腫細胞の肺転移抑制効果を示す miR-143 標的遺伝子の検索 第69回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場 (大阪)、2010. 9. 22-24
- ④ 尾崎充彦、杉本結衣、竹下文隆、小坂展慶、押村光雄、落谷孝広: ヒト骨肉腫肺転移抑制を示す miR-143 の同定とその標的遺伝子の探索 第2回日本 RNAi 研究会、グランドプリンスホテル広島 (広島)、2010. 8. 27-28
- ⑤ 竹下文隆、尾崎充彦、高橋陵宇、小坂展

慶、川又理樹、落谷孝広: Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits prostate tumor metastasis via downregulation of multiple cell cycle genes 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜)、2009. 12. 9-12

- ⑥ 尾崎充彦、杉本結衣、竹下文隆、小坂展慶、押村光雄、落谷孝広: ヒト骨肉腫肺転移抑制効果を示すマイクロ RNA の同定とその標的シグナル経路の検索 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜)、2009. 12. 9-12
- ⑦ 尾崎充彦、竹下文隆、小坂展慶、小林英介、山田哲司、井藤久雄、押村光雄、落谷孝広: ヒト骨肉腫細胞の肺転移抑制効果を示すマイクロ RNA の同定 第68回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (横浜)、2009. 10. 1-3
- ⑧ 尾崎充彦、竹下文隆、小坂展慶、井藤久雄、押村光雄、落谷孝広: マイクロ RNA によるヒト骨肉腫肺転移抑制効果の検討 第19回日本サイトメトリー学会学術集会、松江テルサ (松江)、2009. 6. 20-21

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 腫瘍転移抑制剤
発明者: 尾崎充彦 他
権利者: 鳥取大学 他
種類: PCTJP2009
番号: JP2009/066992
出願年月日: 2009年9月29日
国内外の別: 外国

名称: 腫瘍の転移抑制剤
発明者: 尾崎充彦 他
権利者: 鳥取大学 他
種類: 特願
番号: 2008-276181
出願年月日: 2009年10月27日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.tottori-u.ac.jp/dd.aspx?itemid=6751#moduleid1019>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 充彦 (OSAKI MITSUHIKO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40325006