

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791567

研究課題名(和文) 分泌型マイクロRNAによる癌骨転移の分子機構の解明

研究課題名(英文) MicroRNAs regulate cancer bone metastasis via exosomes.

研究代表者

砂村 聡子 (Sunamura, Satoko)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20570386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌は造骨型の骨転移を生じやすいことが知られている。我々は前立腺癌細胞が分泌するマイクロRNA(miRNA)が骨芽細胞の分化や増殖を制御している可能性を考えた。

前立腺癌細胞の分泌するエクソソーム中のRNAを用いてmiRNAマイクロアレイを行い、前立腺癌が分泌するmiRNAを同定した。それらのmiRNAの一部は、骨芽細胞内で高発現させると骨形成マーカーであるALP活性を上昇させることがわかった。これらのmiRNAの標的遺伝子の探索および骨転移モデルマウスを用いた個体レベルでの生理作用の解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：A microRNA is a small non coding RNA molecule which functions in transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. Exosomes are small vesicles that can function as intercellular transmitters to convey their contents, in particular, miRNAs.

In this study, we focused on human prostate cancer. Prostate cancer is known to induce osteoblastic responses when it harbors at the bone marrow space. We identified microRNAs that secreted by human prostate cancer cells. Overexpression of some of these miRNAs in osteoblastic cells led to increase alkaline phosphatase activity. We try to reveal the target gene of these miRNAs and the mechanism of bone metastasis regulated by miRNAs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：癌 骨転移 マイクロRNA 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国における死因のトップは悪性腫瘍(癌)である。骨は肺や肝臓に次いで癌の転移をきたしやすい臓器であり、また、骨転移は疼痛や病的骨折、脊髄圧迫などを惹起し、患者のQOLを著しく低下させる。そのため、骨転移による症状の発現や進行をいかに防止し、患者のQOLを維持するかが重要な課題となっている。したがって、癌の転移に関する分子機構を解明することは、転移の抑制ならびに新規の治療法を確立することに繋がり、癌患者のQOLおよび生存率の向上に貢献するものと考えられる。近年の分子医学の発展により、腫瘍細胞の分泌するPTHrPなどのサイトカインが骨転移巣の確立と進展に重要な作用を有することが明らかとなった。しかしながら、癌腫により骨形成性あるいは骨吸収性の転移をきたす差異の原因など、癌の骨転移の分子機構には未だ不明な点が多い。

約22塩基の小分子RNAであるmicroRNA(miRNA)は、標的遺伝子mRNAに結合し、その分解促進や翻訳抑制を行うことで、発生・分化・増殖など様々な生命現象に強く関連している。すでに、各種癌細胞におけるmiRNA発現プロファイルの解析を通じて、miRNAが癌の悪性度に関与していることが示されており、また、miRNAを用いた癌の早期発見や診断、さらには予後予測も試みられている(LuらNature 2005、RosenfeldらNat Biotechnol 2008)。既に我々は、miRNAによる骨芽細胞分化の調節機構に注目して研究を進め、骨代謝におけるmiRNAのin vivoでの生理的意義を世界で初めて明らかにしている(猪瀬らProc. Natl. Acad. Sci. 2009)。

従来、miRNAは細胞内でのみ機能すると考えられてきた。しかし、近年、細胞外へ放出される小さな膜結合小胞であるエクソソームの中にmiRNAが存在することが明らかとなった(ValadiらNature Cell Biol 2007)。また、Zhangらは、ヒト単球系細胞株のエクソソーム中のmiR-150が、血管内皮細胞に取り込まれ、血管内皮細胞内のc-Mybの発現を減少させ、血管内皮細胞の遊走能を上昇させることを明らかにしている(Moll Cell 2010)。

我々は、癌の中でも高頻度で骨転移を生ずる前立腺癌に着目した。乳癌などの他の癌腫と比べ、前立腺癌の骨転移は造骨型を示すことが多いことが知られている。そこで、我々は、前立腺癌細胞がエクソソームを用いてmiRNAを分泌し、骨を形成する細胞群の機能を調節する可能性を考えた。すでに我々は、予備的な検討において、前立腺癌培養細胞がエクソソームを通じてmiRNAを分泌し、そのmiRNAが骨芽細胞に取り込まれることを見出している。

また、我々は、培養上清中に分泌されたエクソソーム分画からのmiRNAの抽出法を確立し、さらに、マイクロアレイを用いて、細胞外に分泌されるmiRNAの発現プロファイルの解析を行っている。

本研究では、新たな細胞間情報伝達因子miRNAに注目し、癌細胞による分泌miRNAを介した骨代謝調節の分子機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

ヒト前立腺癌由来細胞株の細胞内および細胞外へ分泌されるmiRNAの発現プロファイルを確認する。同時に他の細胞種(ヒト胎児腎細胞由来細胞株、ヒト乳癌由来細胞株など)における細胞内外miRNAの発現プロファイルも確認し、特に前立腺癌細胞において細胞外へ積極的に分泌されているmiRNA群を同定する。同定された前立腺癌細胞由来miRNA群を骨芽細胞内で過剰発現させ、骨芽細胞の骨形成に関わる遺伝子を制御しているmiRNAを確定し、癌の骨転移とmiRNAの関係性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌細胞内および細胞外へ分泌されるmiRNAの発現解析

ヒト前立腺癌由来細胞株を培養し、細胞および培養上清を回収する。細胞からはmiRNAを含む細胞内total RNAを抽出する。一方、培養上清を用いて、超遠心にて培養液中に分泌されたエクソソームを単離した後、エクソソーム内のRNAを抽出、それらを細胞外へ分泌されたRNA画分として用いる。得られたRNAをmiRNAマイクロアレイを用いてmiRNA発現の網羅的解析を行う。また、他の癌細胞種においても同様のmiRNA発現解析を行い、ヒト前立腺癌細胞において発現の高いmiRNA、特に細胞外での分泌発現の高いmiRNAを同定していく。

(2) 骨形成に関わる遺伝子を抑制する前立腺癌細胞由来分泌型miRNAのスクリーニング

miRNAマイクロアレイデータの解析により、ヒト前立腺癌細胞から特異的に分泌されているmiRNAを同定し、それらの候補miRNAが骨形成に関わる遺伝子を制御しているかどうかを分子生物学的実験によって確認する。まず、人工オリゴヌクレオチドやアデノウイルスベクターを用いて候補miRNAを骨芽細胞内に過剰発現させ、骨芽細胞分化への影響をアルカリフォスファターゼ法で検討する。ま

た、骨芽細胞における骨代謝関連因子への影響をリアルタイム PCR 法やウェスタンブロットティング法を用いて遺伝子レベル、タンパク質レベルで検討する。同時に、骨芽細胞の増殖への影響を BrdU の取り込み活性の定量にて検討する。さらに、siRNA を用いて候補 miRNA を骨芽細胞内でノックダウンした時の骨芽細胞分化への影響も検討する。過剰発現時およびノックダウン時の骨芽細胞の骨代謝関連因子への影響が相反するようであれば、その miRNA が骨代謝に関わる遺伝子を制御している可能性が高いと言える。一連の実験で、骨形成に関わる遺伝子を標的としている前立腺癌細胞由来の miRNA を絞り込んでいく。

(3) ヒト前立腺癌由来細胞特異的分泌型 miRNA の標的遺伝子の同定

マイクロアレイデータの解析により絞り込んだ骨形成に関わる遺伝子を標的としているであろう前立腺癌細胞由来の分泌型 miRNA について、さらなる解析を行っていく。これらの miRNA が標的としている遺伝子を同定するために、骨芽細胞において miRNA を過剰発現させた時、およびノックダウンした時の候補標的遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法を用いて mRNA レベルで確認し、さらにウェスタンブロットティング法を用いてタンパク質レベルで確認する。以上の実験により、本研究で新たに同定された miRNA のターゲットとなる標的遺伝子の同定も行う。

(4) エクソソームによる細胞間での miRNA の伝搬の証明

エクソソームのマーカーである CD63 に GFP を結合した融合タンパク質 (CD63-GFP) と、本研究で同定された miRNA を組み込んだ発現ベクターを構築し、前立腺癌細胞で発現させる。前立腺癌細胞より分泌されたエクソソームを骨芽細胞に取り込ませることで細胞間エクソソーム伝搬を可視化する。リアルタイム PCR 法を用いて、骨芽細胞内での前立腺癌由来 miRNA 発現の確認、および miRNA の標的遺伝子の発現レベルを確認する。

(5) 前立腺癌骨転移マウスモデルを用いた前立腺癌細胞分泌 miRNA の個体レベルでの生理作用の解析

同定された miRNA を過剰発現するヒト前立腺癌細胞をヌードマウスに移植し、造骨性骨転移を生ずることを確認する。この実験により、前立腺癌由来の miRNA が骨芽細胞に作用し、骨転移を生じさせることを証明する。

4. 研究成果

(1) 前立腺癌細胞から分泌される miRNA の発現解析

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、C4、C4-2、C4-2B、PC-3M の培養上清中からエクソソームを単離し、エクソソーム中の RNA を用いて miRNA マイクロアレイを行った。その結果、細胞種間で発現量の大きく異なる分泌型 miRNA は同定されず、今回検討した前立腺癌細胞株すべてで分泌されている miRNA を、発現量の高いものから順に 50 種抽出した。

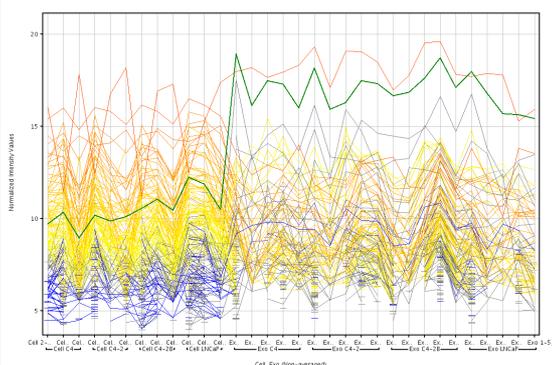


図 1. ヒト前立腺癌細胞株の細胞内およびエクソソーム中の miRNA の発現プロファイル

(2) 前立腺癌細胞が分泌する miRNA の骨代謝への影響

ヒト前立腺癌細胞から分泌されている miRNA 30 種を、合成オリゴヌクレオチド (miRNA mimics) を用いてヒト臍帯血由来間葉系幹細胞 (hMSC) で発現させ、骨芽細胞分化への影響をアルカリフォスファターゼ (ALP) 法で検討した。hMSC 内で miRNA が高発現することにより ALP 活性が上昇することが期待されたが、ALP 活性を上昇させたものは数種類であった。その内の hsa-miR-1268a、572、1225-5p、483-5p、939、1915、1207-5p、21、720 について発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターをヒト前立腺癌細胞株 PC-3M へ導入後、細胞内の total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて特定の miRNA の発現が上昇することを確認した。

(3) エクソソームによる細胞間での miRNA の伝搬の証明

エクソソームのバイオマーカーである膜タンパク CD63 と GFP の融合タンパクを発現するベクターを構築し、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3M へ導入した。CD63-GFP を発現する PC-3M から得られたエクソソームは GFP 標識される。この細胞から放出されるエクソソームが他の細胞により取り込まれることを可視化するため、図 2 のように transwell 培養を行った。

エクソソームが受け手の細胞に取り込まれ、受け手細胞が GFP 蛍光を発することを確認した (図 3)。

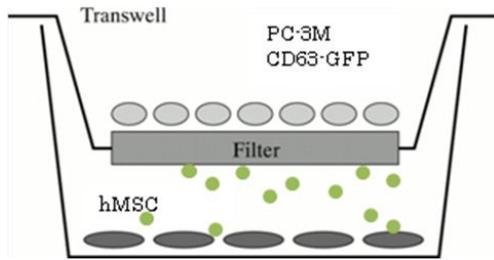


図 2. Transwell 培養モデル

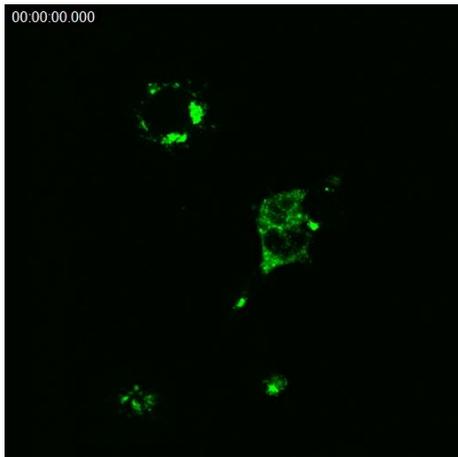


図 3. エクソソームを取り込んだ細胞

(4) 癌骨転移モデルマウス

ヒト間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させた際に、ALP 活性の上昇が認められた hsa-miR-1268a、572、1225-5p、483-5p、939、1915、1207-5p、21、720 を過剰発現するヒト前立腺癌細胞株 (PC-3M-Luc) を構築した。この細胞をヌードマウスの左心室に注射 (心注) し、in vivo imaging system を用いて癌細胞が転移する様子を 4 週に渡り経時的に観察した。癌細胞を心注したマウスの一部に癌の転移が確認された。この転移が造骨型骨転移であるかどうかを現在解析中である。

現段階では骨転移に関わる miRNA の同定には至っていないが、今後さらなる検討を重ねて骨転移に関与する miRNA の同定を目指す。

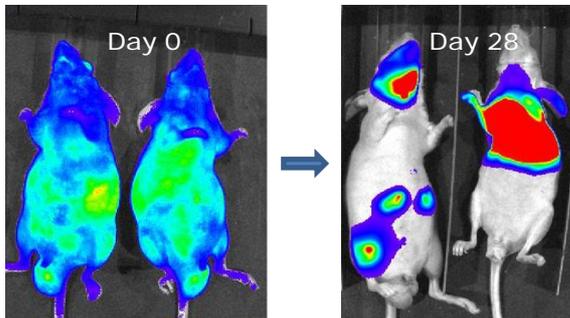


図 4. 癌転移の in vivo imaging

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂村 聡子 (SUNAMURA, Satoko)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：20570386

(2) 研究協力者

竹田 秀 (TAKEDA, Shu)
東京医科歯科大学・大学院・教授
研究者番号：30376727

福田 亨 (FUKUDA, Toru)
東京医科歯科大学・大学院・助教
研究者番号：20301492

越智 広樹 (OCHI, Hiroki)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
研究者番号：30582283