

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893068

研究課題名(和文)がん細胞由来分泌型マイクロRNAによる骨転移部の微小環境制御機構の解明

研究課題名(英文)Identifying the physiological role of cancer-secreted microRNAs in bone metastasis microenvironment

研究代表者

佐藤 信吾(Sato, Shingo)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：40462220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、マイクロRNA(miRNA)はエクソソームを介して細胞間を伝搬することが明らかとなり、骨に転移したがん細胞が分泌するmiRNAが周囲の骨組織に作用し、溶骨型や造骨型の骨転移を惹起する可能性が示唆される。

本研究では、まず、miRNAの網羅的発現解析を行い、各がん細胞株からの分泌が亢進している複数のmiRNAを同定した。次に、これらのmiRNAの骨代謝への作用などを検討し、前立腺がん細胞株が分泌するmiR-Xが、2つの標的遺伝子を介して骨形成を著明に促進することを見出した。さらにmiR-Xを過剰発現させた溶骨型骨転移誘導乳がん細胞株をマウスに移植したところ、造骨型の骨転移が誘導された。

研究成果の概要(英文)：A microRNA (miRNA) is a small non-coding RNA molecule that regulates gene expression. It has been recently revealed that miRNAs are delivered via exosomes from cells to cells as an intercellular communication tool. This finding suggests that, in bone metastasis microenvironment, miRNAs secreted from cancer cells act on the surrounding osteoblasts or osteoclasts, resulting in the formation of osteoblastic or osteolytic bone lesions.

In this study, based on miRNA expression analysis we identified several miRNAs that are significantly secreted from various cancer cell lines with the ability to metastasize to bone. In addition, we found that miR-X, which is markedly secreted from prostate cancer cells that cause osteoblastic lesions, remarkably promoted osteoblast differentiation via targeting two genes. Furthermore, breast cancer cells that cause osteolytic lesions were transfected with miR-X and implanted into immune-deficient mice. Interestingly, osteoblastic bone lesions were induced.

研究分野：整形外科

キーワード：骨転移 マイクロRNA がん微小環境 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

骨は肺、肝臓に次いでがん細胞が転移しやすい臓器であり、骨への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阻止し、患者の QOL を維持するかが重要な課題となっている。近年の分子生物学の発展により、がんが骨に転移する分子メカニズムが少しずつ明らかとなってきている。しかしながら、何故、前立腺がんは造骨型の骨転移をきたし、腎がんや骨髄腫などは溶骨型の骨転移をきたすのかなど、がんの骨転移の分子機構は未だ十分解明されていない。

マイクロ RNA (以下 miRNA) ががんの発生や増殖に関与していることが明らかとなってきたが、miRNA による骨転移の制御機構は未だ不明である。近年、エクソソームを介して細胞間を伝搬する分泌型 miRNA の存在が報告され、がん細胞が分泌する miRNA を周囲の細胞が取り込むことで、がん特有の微小環境が形成される可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、がん細胞由来分泌型 miRNA とそれを取り込む骨芽細胞・破骨細胞とのクロストークに焦点を当て、骨転移微小環境を構築するがん細胞由来分泌型 miRNA の同定およびこれらの miRNA による微小環境制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) がん細胞由来分泌型 miRNA の発現プロファイル解析

がん細胞株が細胞外に分泌するエクソソームから miRNA を抽出する。マイクロアレイを用いて miRNA 発現の網羅的解析を行い、がん細胞が積極的に分泌する miRNA 群を同定する。

(2) 骨代謝を制御するがん細胞由来分泌型 miRNA の同定

(1) で同定した miRNA を骨芽細胞もしくは破骨細胞に過剰発現させ、細胞増殖や分化への影響をアルカリフォスファターゼ法や TRAP 染色法にて検討する。また、骨代謝関連遺伝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、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで検討する。

(3) がん細胞由来分泌型 miRNA の標的遺伝子の同定

上記で同定された分泌型 miRNA の標的遺伝子を web 上のデータベース (TargetScan など) を用いて探索し、標的遺伝子の候補を絞る。次に、ルシフェラーゼアッセイを行い、実際に miRNA が候補標的遺伝子に結合することを確認する。さらに、骨芽細胞もしくは破骨細胞において、miRNA を過剰発現した時の候補標的遺伝子の発現動向をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロットティング法にて確認する。

(4) がん細胞から骨組織の細胞へのエクソソームによる miRNA 伝搬機構の検証

がん細胞が分泌するエクソソームを蛍光標識することで、がん細胞から骨芽細胞・破骨細胞へのエクソソームの伝搬を可視化する。また、取り込まれた分泌型 miRNA が、骨芽細胞・破骨細胞内で機能することも検証する。

(5) 骨転移マウスモデルを用いたがん細胞由来分泌型 miRNA の生理作用の解析

上記で同定された分泌型 miRNA を過剰発現させたがん細胞株を骨転移モデルマウスに移植し、分泌型 miRNA が骨転移病変の形成に与える影響を個体レベルで検討する。

4. 研究成果

(1) がん細胞由来分泌型 miRNA の発現プロファイル解析

溶骨型骨転移および造骨型骨転移をきたすがん細胞株の培養上清を回収し、がん細胞から培養液中に分泌されたエクソソームを超遠心法にて単離した。続いて、単離したエクソソームから RNA を抽出し、miRNA 発現の網羅的解析を行った。その結果、溶骨型もしくは造骨型の骨転移をきたすがん細胞株が積極的に細胞外に分泌する計 12 種類の miRNA を同定した。

(2) 骨代謝を制御するがん細胞由来分泌型 miRNA の同定

(1) で同定した miRNA を骨芽細胞もしくは破骨細胞に過剰発現させ、これらの細胞の増殖・分化に与える影響を検討した結果、4 種類の miRNA が骨代謝の制御に関わっていることを見出した。さらに、これらの miRNA を過剰発現させた間葉系幹細胞株を樹立し、骨芽細胞分化に与える影響を検討した結果、4 種類のうちの 1 種類 (miR-X) が著明な骨形成促進作用を有することを見出した。また、miR-X は造骨型骨転移をきたす前立腺がん細胞株で分泌が亢進している miRNA であった。

(3) がん細胞由来分泌型 miRNA の標的遺伝子の同定

miR-X の標的遺伝子を web 上のデータベースで候補を絞り、さらに、この miRNA の過剰発現による候補標的遺伝子の発現動向をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロットング法にて検討した。その結果、候補標的遺伝子は 2 つに絞られた。また、ルシフェラーゼアッセイ法により、miRNA-X がこれらの候補標的遺伝子に結合することも確認した。

(4) がん細胞から骨組織の細胞へのエクソソームによる miRNA 伝搬機構の検証

エクソソームのマーカである CD63 に GFP を結合した融合タンパク質 (CD63-GFP) を発現させたがん細胞株を構築し、さらにこの細胞株に miR-X を過剰発現させた。このがん細胞株と間葉系幹細胞株を共培養したところ、間葉系幹細胞株ががん細胞株から分泌されたエクソソームを取り込んでいる像を確認できた。また、エクソソームを取り込んだ間葉系幹細胞株で、miR-X の発現が亢進していることも確認した。

(5) 骨転移マウスモデルを用いたがん細胞由来分泌型 miRNA の生理作用の解析

骨転移のマウスモデルとして、頭蓋骨上移植モデルを使用した。溶骨型の骨転移を誘導することで知られる乳がん細胞株に miR-X を過剰発現させ、免疫不全マウスの頭蓋骨上に移植したところ、造骨型の骨転移が誘導されることを見出した。また、移植した乳癌細胞が骨組織に分化しているのではなく、ホスト側の細胞の骨分化が誘導されることも明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Xu C, Ochi H, Fukuda T, Sato S, Sunamura S, Takarada T, Hinoi E, Okawa A, Takeda S. Circadian Clock Regulates Bone Resorption in Mice. *J Bone Miner Res.* 2016, In press, 査読有
doi: 10.1002/jbmr.2803

Sato S, Takeda S. The regulation of various organs by osteoblasts *Clin Calcium.* 26(5), 721-727, 2016, 査読無
doi: CliCa1605721727

Tang Y, Wei Q, Voisin V, Sato S, Hirata M, Whetstone H, Ailles L, Han I, Bader G, Wunder J, Alman BA. Identification of

CD146 as a marker enriched for tumor-propagating capacity reveals targetable pathways in primary human sarcoma. *Oncotarget.* 2015, 6(37), 40283-40294, 2015, 査読有
doi: 10.18632/oncotarget.5375.

Hirata M, Sasaki M, Cairns RA, Inoue S, Puviindran V, Li WY, Snow BE, Jones LD, Wei Q, Sato S, Tang YJ, Nadesan P, Rockel J, Whetstone H, Poon R, Weng A, Gross S, Straley K, Gliser C, Xu Y, Wunder J, Mak TW, Alman BA. Mutant IDH is sufficient to initiate enchondromatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112, 2829-34, 2015, 査読有
doi: 10.1073/pnas.1424400112

Sato S, Takeda S. Regulation of bone metastasis by microRNAs. *Clin Calcium.* 24(8), 1209-1215, 2014, 査読無
doi: CliCa140812091215

Sato S, Takeda S. Bidirectional relationship between lifestyle-related diseases and bone metabolism. *Clin Calcium.* 24(11), 1591-1598, 2014, 査読無
doi: CliCa141115911598

〔学会発表〕(計 8 件)

佐藤信吾、血管周皮細胞 (ペリサイト) の生物学的特性と肉腫起源細胞の可能性、第 13 回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会 2016 年 4 月 9 日、伊豆長岡

佐藤信吾、骨軟部腫瘍の起源とこれから、第 242 回関東骨軟部腫瘍研究会、2016 年 3 月 8 日、東京

佐藤信吾、骨密度のお話、内分泌療法に伴う骨密度の低下について、第 14 回 With You Tokyo ~あなたとプレストケアを考える会~、2015 年 10 月 25 日、東京

佐藤信吾、澤村千草、松本誠一、竹田秀、大川淳、医歯学融合集学的骨転移診療体制の確立と骨転移早期発見の取り組み、第 48 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2015 年 7 月 10 日、高松

Shingo Sato, Qingxia Wei, Makoto Hirata, Yuning Tang, Shu Takeda, Jay S. Wunder, Benjamin Alman, Microarray and RNA sequencing analysis of pericyte-derived sarcomas in a novel

sarcoma mouse model、Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2015、2015年3月28～31日、ラスベガス

Shingo Sato, Qingxia Wei, Makoto Hirata, Yuning Tang, Shu Takeda, Jay S. Wunder, Benjamin Alman、Microarray and RNA sequencing analysis of pericyte-derived sarcomas in a novel sarcoma mouse model、Connective Tissue Oncology Society Meeting 2014、2014年10月15～18日、ベルリン

佐藤信吾、Qingxia Wei、平田真、Jackie Tang、松本誠一、大川淳、竹田秀、Benjamin Alman、新たな肉腫マウスモデルにおける肉腫の網羅的遺伝子発現解析および血管周皮細胞(ペリサイト)が悪性転化するための因子同定の試み、第29回日本整形外科学会基礎学術集会、2014年10月9～10日、鹿児島

佐藤信吾、肉腫起源細胞としての血管周皮細胞(ペリサイト)、第226回関東骨軟部腫瘍研究会、2014年7月8日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 信吾 (SHINGO Sato)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：40462220

(2) 研究協力者

竹田 秀 (TAKEDA Shu)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30376727

砂村 聡子 (SUNAMURA Satoko)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号：20570386