

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10440

研究課題名(和文)肉腫のエクソソームは本当に前転移ニッチを“教育”するのか？

研究課題名(英文) Identification and characterization of the exosomal miRNA which promote the progression and metastases of sarcomas

研究代表者

松峯 昭彦 (Matsumine, Akihiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：00335118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫の肺転移に関わるエクソソームの同定とその機能解析を骨肉腫細胞株：Dunnとその高肺転移株LM8を用いて行った。LM8はDunnの約1.7倍量のエクソソームを培養液中に放出し、LM8由来エクソソームはDunn細胞の増殖能と移動能を促進した。LM8で高発現していたmiR-AとmiR-Bは、担癌マウスの血清中エクソソームでも約1.5倍高発現していた。そして、miR-AはDunnの増殖を促進し、miR-BはDunnの移動能を促進した。我々が同定したエクソソームmiRNAは、autocrineの機序を介して、細胞増殖能、移動能を亢進させることで、肺転移能が亢進していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Lung metastasis is the major risk factor of osteosarcoma patients. Recently, exosomes have emerged as an important mediator of cell-to-cell signaling through the transfer of molecules such as miRNAs and proteins. Here, we examined the exosomal miRNAs which promote lung metastases of osteosarcoma(OS).

We used the Dunn OS cell line (Dunn) and LM8 OS cell line (LM8) which has highly metastatic potential. More than two times amount of exosome was contained in culture medium of LM8 compared to that of Dunn. LM8 exosomes significantly promoted cell proliferation and migration of Dunn cells. The miRNA array showed the different expression pattern of exosomal miRNA between LM8 and Dunn. The miR-A and miR-B were more included in exosome from LM8 than those of Dunn. The miR-A promoted the proliferation of Dunn, and miR-B promoted the migration of Dunn. The exosomal miR-A and miR-B may play an important role in the formation of lung metastases.

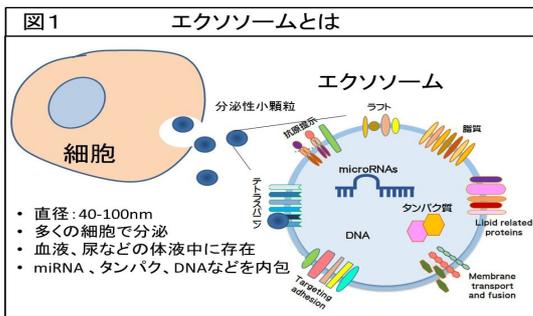
研究分野：整形外科

キーワード：肉腫 骨肉腫 肺転移 エクソソーム マイクロRNA(miRNA)

1. 研究開始当初の背景

高悪性度肉腫の累積5年生存率は依然60%程度であり、約半数の症例は肺転移をはじめとする遠隔転移をきたし予後不良の経過をとる。

近年、癌患者の末梢血中には、癌細胞から分泌されたエクソソームと呼ばれる40~100nmの直径の細胞外小胞が存在することが明らかとなっている (Kosaka et al: Future Oncol. 10:671-81, 2014)。エクソソームの膜構造にはセラミドなどの特徴的な脂質成分が含まれており、その内部には核酸 (DNA, mRNA, miRNA)、タンパクが内包されている (図1)。



核酸情報を含むエクソソームは生物学的活性を有しており、癌細胞由来のエクソソームは、周辺の細胞や遠隔の臓器へと移行することで、自分が住みやすい微小環境を整え (前転移ニッチの教育)、その結果、さらなる増殖、抗がん剤への耐性、転移へとつながることが示唆されている。大腸癌、肺がん、乳がんなど発生頻度の高い癌では、エクソソームを介した癌進展メカニズムの解析やバイオマーカーとしての有用性に関する報告が散見されるが、肉腫におけるエクソソームに関する報告はない。そこで我々は、肉腫におけるエクソソームの解析を着想するに至った。

2. 研究の目的

肉腫の進展や遠隔転移に関わるエクソソーム内miRNAを同定し、同定したmiRNAによる腫瘍進展のメカニズムの解析を行うことを計画した。

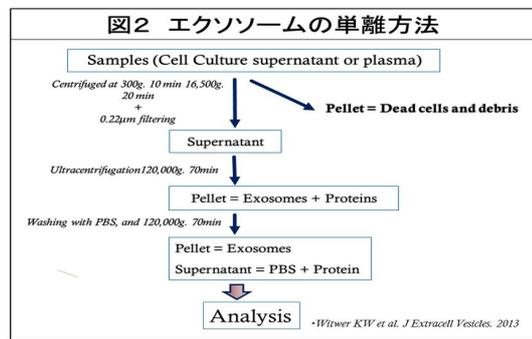
3. 研究の方法

培養細胞：マウス骨肉腫細胞株：Dunnと、その高肺転移株：LM8を用いた。細胞は、10% FBS添加 DMEM を用いて 37℃、5% CO2 下で培養した。

Immunoblotting：抗マウス CD81 家兎ポリクローナル抗体 (H-121) (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

動物：オス C3H/He マウスを用いた。腫瘍細胞を背部皮下に  $1 \times 10^7$  細胞移植し、腫瘍のサイズを計測した。

エクソソームの単離：エクソソームの単離は図2の手順で行った。



エクソソームの定量：エクソソームのタンパク定量は Bradford assay で行った。

細胞増殖の定量：培養細胞にエクソソームを添加し、経時的に回収し、生細胞数を MTS アッセイで評価した。

Migration assay：Boyden Chamber を用いて Migration assay を行った。

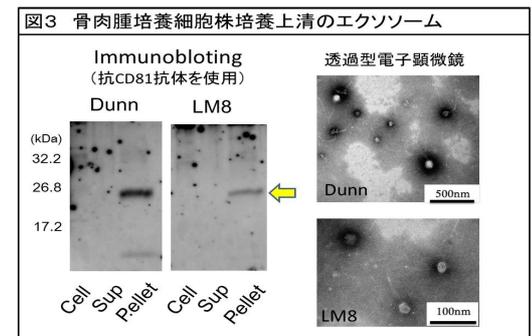
miRNA array：miRNA Oligo chip (TORAY) を用い、エクソソームに含まれる miRNA 発現解析を行った。

miRNA の定量：TaqMan gene expression assay primer-probe pair を用いて定量した

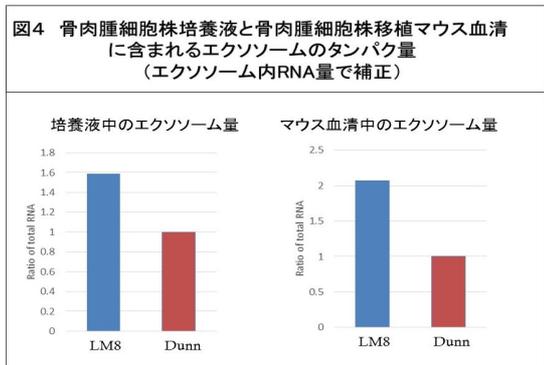
miRNA transfection：miRNA をリポフェクタミンで導入し、細胞移動能と増殖能を解析した。

4. 研究成果

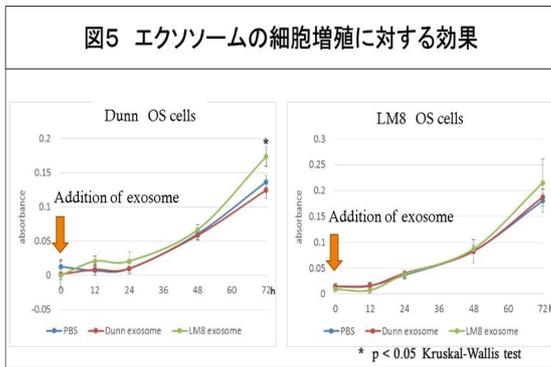
(1) 我々の採用した方法で、細胞株培養上清からエクソソームを回収できることを、抗 CD81 抗体を用いた immunoblotting 法と透過型電子顕微鏡で確認した。(図3)



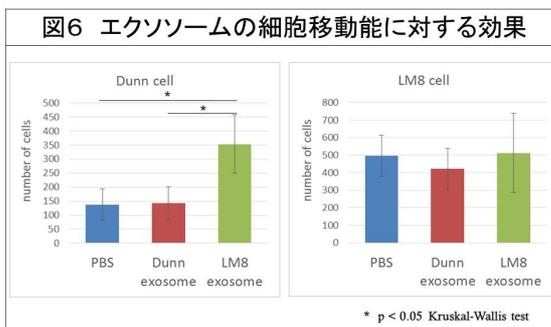
(2) 骨肉腫細胞株培養時の培地と骨肉腫細胞株移植マウスの血清に含まれるエクソソームのタンパク量を比較したところ、LM8 は Dunn の約 1.7 倍量の exosome を培養液中に放出していた。(図4)



(3) Dunn に LM8 由来のエクソソームを添加すると、細胞増殖能が亢進した。(図5)



(4) Dunn に LM8 由来エクソソームを添加すると、Dunn の細胞移動能が亢進した。(図6)



(5) Exosomal miRNA の発現解析で 1900 miRNAs をスクリーニングしたところ、LM8 は Dunn と比較して、8 種類の miRNA が 4 倍以上の発現量を示していた。(図7)

図7 LM8でDunnの4倍以上の発現量を示すmiRNA

miR	LM8	Dunn	Ratio
A	320.71	59.78	0.19
B	138.08	24.69	0.18
199b-5p	134.48	31.24	0.23
410-3p	155.21	13.00	0.08
677-3p	108.25	18.66	0.17
1224-5p	617.13	142.50	0.23
6239	383.55	91.96	0.24
8110	3359.45	778.06	0.23

(6) 骨肉腫細胞株培地内および担癌マウス血漿内のエクソソーム miR-A, miR-B 量を定量したところ、LM8 において高発現していた。(図8, 図9)

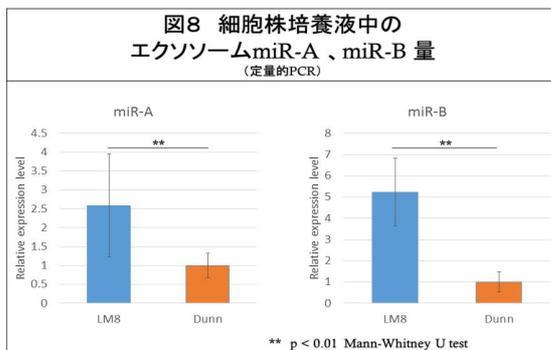
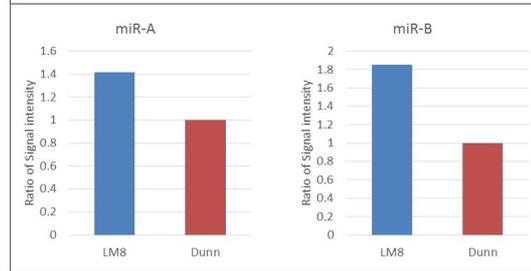


図9 担癌マウス血漿中のエクソソーム miR-AおよびmiR-B量 (定量的PCR)



(7) miRNA の機能解析において、miR-A は Dunn の増殖を促進し、miR-B は Dunn の移動能を促進した。(図10、11)

図10 Dunnの増殖能に対するmir-A, mir-Bの効果

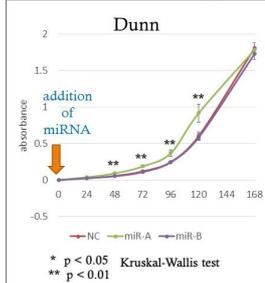
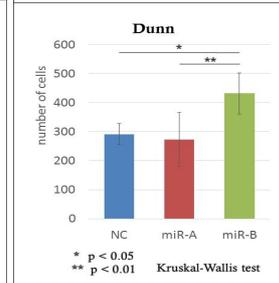


図11 Dunnの移動能に対するmir-A, mir-Bの効果



LM8 では、Dunn と比較して、より多量の exosome を放出すると共に、特定のエクソソーム miRNA の発現量が亢進していることが明らかとなった。我々が同定したエクソソーム miRNA は、autocrine の機序を介して、細胞増殖能、移動能を亢進させることで、肺転移能が亢進していると考えられた。

同定されたエクソソーム内包 miRNA は肉腫の存在、再発/遠隔転移を早期発見するための重要なバイオマーカーになるだけでなく、新規治療ターゲットとなる可能性があり、肉腫の治療成績の向上につながると期待できる。

## 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28件)

1. Akiyama T, Ogura, Matsumine A, et al. Analysis of the Infiltrative Features of Chordoma: The Relationship Between Micro-Skip Metastasis and Postoperative Outcomes. Ann Surg Oncol.25:912-919, 2018.
2. Hagi T, Nakamura T, Matsumine A et al. Thediagnostic and prognostic value of interleukin-6 in patients with soft tissue sarcomas. Sci Rep. 7:9640, 2017.
3. Nakamura T, Matsumine A, et al. Infiltrative tumor growth patterns on magnetic resonance imaging associated

- with systemic inflammation and oncological outcome in patients with high-grade soft-tissue sarcoma. *PLoS One*. 12:e0181787, 2017.
4. Matsumine A. Treatment Strategy for Soft Tissue Sarcomas. *Gan To Kagaku Ryoho*. 44:452-456, 2017.
  5. Nakamura T, Katagiri H, Matsumine A, et al. Analysis of Factors for Predicting Survival in Soft-tissue Sarcoma with Metastatic Disease at Initial Presentation. *Anticancer Res* 37:3137-3141, 2017.
  6. Takahashi M, Takahashi S, Matsumine A, et al. Efficacy of Trabectedin in Patients with Advanced Translocation-Related Sarcomas: Pooled Analysis of Two Phase II Studies. *Oncologist*.22:979-988, 2017.
  7. Nakamura T, Matsumine A, et al. Impact of tumor volume doubling time on post-metastatic survival in bone or soft-tissue sarcoma patients treated with metastasectomy and/or radiofrequency ablation of the lung. *Onco Targets Ther*.10:559-564, 2017.
  8. Nakamura T, Matsumine A, et al. Analysis of pulmonary nodules in patients with high-grade soft tissue sarcomas. *PLoS One*.12: e0172148, 2017.
  9. Kawai A, Araki N, Matsumine A, et al. Phase 2 study of eribulin in patients with previously treated advanced or metastatic soft tissue sarcoma. *Jpn J Clin Oncol*. 47:137-144, 2017.
  10. Yodoya N, Iwamoto S, Matsumine A, et al. Ewing Sarcoma of the Bone With EWS/FLI1 Translocation After Successful Treatment of Primary Osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 39:6-9, 2017.
  11. Nakamura T, Matsumine A, et al. Neoplastic fever in patients with bone and soft tissue sarcoma. *Mol Clin Oncol*. 5:631-634, 2016.
  12. Oi T, Asanuma K, Matsumine A, et al. STAT3 inhibitor, cucurbitacin I, is a novel therapeutic agent for osteosarcoma. *Int J Oncol*. 49: 2275-2284, 2016.
  13. Hagi T, Nakamura T, Matsumine A et al. Medullary metastasis of a malignant peripheral nerve sheath tumor: A case report. *Oncol Lett*. 12:1906-1908, 2016.
  14. Nakamura T, Matsumine A, et al. Oncological outcome after lung metastasis in patients presenting with localized chondrosarcoma atextremities: Tokai Musculoskeletal Oncology Consortium study. *Onco Targets Ther*. 9:4747-51, 2016.
  15. Matsumine A, et al. Minimally invasive surgery using intraoperative electron-beam radiotherapy for the treatment of soft tissue sarcoma of the extremities with tendon involvement. *World J Surg Oncol*.14:214, 2016.
  16. Takeuchi A, Tsuchiya H, Matsumine A, et al. Clinical outcome of recurrent giant cell tumor of the extremity in the era before molecular target therapy: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. *BMC Musculoskelet Disord*. 17:306, 2016.
  17. Morioka H, Takahashi S, Matsumine A et al. Results of sub-analysis of a phase 2 study on trabectedin treatment for extraskeletal myxoid chondrosarcoma and mesenchymal chondrosarcoma. *BMC Cancer*. 16:479, 2016.
  18. Nishimura A, Matsumine A, et al. Endoscopic Versus Open Surgery for Calcaneal Bone Cysts: A Preliminary Report. *J Foot Ankle Surg*. 55:782-7, 2016.
  19. Asanuma K, Matsumine A, et al. Impact of plasma fibrinogen levels in benign and malignant soft tissue tumors. *Cancer Biomark*.16:453-8, 2016.
  20. Nakamura T, Matsumine A, et al. The clinical outcome of pazopanib treatment in Japanese patients with relapsed soft tissue sarcoma: A Japanese Musculoskeletal Oncology Group (JMOG) study. *Cancer*.122:1408-16, 2016.
  21. Kawai A, Araki N, Matsumine A, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase III study of pazopanib in patients with soft tissue sarcoma: results from the Japanese subgroup. *Jpn J Clin Oncol*. 46:248-53, 2016.
  22. Araki N, Takahashi S, Matsumine A, et al. Retrospective inter- and intra-patient evaluation of trabectedin after best supportive care for patients with advanced translocation-related sarcoma after failure of standard chemotherapy. *Eur J Cancer*. 56:122-130, 2016.
  23. Nakamura T, Matsumine A, et al. The value of trabectedin in the treatment of soft tissue sarcoma. *Ther Clin Risk Manag*. 12:73-9, 2016.
  24. Imanishi J, Yazawa Y, Matsumine A, et al. Atypical and malignant granular

- cell tumors in Japan: a Japanese Musculoskeletal Oncology Group (JMOG) study. *Int J Clin Oncol.* 21:808-816, 2016.
25. Nakamura T, Matsumine A, et al. Clinical characteristics of patients with large and deep soft tissue sarcomas. *Oncol Lett.* 10:841-844, 2015.
  26. Nakamura T, Matsumine A, et al. The value of the high-sensitivity modified Glasgow prognostic score in predicting the survival of patients with a soft-tissue sarcoma. *Bone Joint J.* 97-B(6):847-52, 2015.
  27. Akeda K, Kasai Y, Matsumine A, et al. Effect of denosumab on recurrent giant cell reparative granuloma of the lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976).* 40(10):E601-8, 2015.
  28. Nakamura T, Matsumine A, et al. The role of C-reactive protein in predicting post-metastatic survival of patients with metastatic bone and soft tissue sarcoma. *Tumour Biol.* 36:7515-20, 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kakimoto T, Matsumine A et al, Exosome derived from osteosarcoma cell line with highly pulmonary metastatic potential promote cell proliferation and movement of osteosarcoma cells. Annual meeting of connective tissue oncology society, 2016
2. 柿本拓也、松峯昭彦他、骨肉腫の肺転移に関わる Exosome の解析、日本整形外科学会基礎学術集会、2016

〔図書〕(計 4 件)

1. Matsumine A, Springer, *Osteosarcoma - A Multidisciplinary Approach to Treatment: Takafumi Ueda and Akira Kawai eds, Chapter 5: Endoprosthetic reconstruction for the extremity osteosarcoma*, 2016, 109-124.
2. 松峯昭彦、南山堂、*肉腫化学療法マスタークラス* (川井章監修)、*エリブリン*, 2015, 162-166.
3. 松峯昭彦、医学書院、*今日の小児治療指針 第16版* (水口雅、市橋光、崎山弘監修)、*骨肉腫*, 2015, 818-820.
4. 松峯昭彦、篠原出版新社、*入門腫瘍内科学 改訂第2版* (特定非営利活動法人日本臨床腫瘍学会編)、*骨軟部腫瘍*, 2015, 221-224.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松峯 昭彦 (MATSUMINE, Akihiko)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授  
研究者番号：00335118

(2) 研究分担者

柿本 拓也 (KAKIMOTO, Takuya)  
三重大学・医学系研究科・リサーチアソシ  
エイト  
研究者番号：50741162