

令和元年6月26日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11443

研究課題名(和文)骨miRNAを標的とした癌の骨転移抑制の試み

研究課題名(英文)A trial of miRNAs derived from bone matrix as an inhibitor for bone metastasis

研究代表者

南崎 朋子 (Minamizaki, Tomoko)

広島大学・医歯薬保健学研究科・助教

研究者番号：30452593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：基質小胞およびそれに包含されるmiRNA-125b(miR-125b)が骨転移性がん細胞(MC-7、PC3およびPY8119細胞)の増殖能・遊走能・浸潤能を抑制することをin vitroにて確認した。また、成熟骨芽細胞にのみmiR-125bを過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスの脛骨あるいは尾動脈注射によるPY8119細胞あるいはPY8119-Luc細胞の骨転移モデルにおいて、Tgマウスでは野生型マウスと比較し、骨吸収およびがん細胞増殖が有意に抑制されていることを μ CT、in vivoイメージングおよび組織学的解析より明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨転移は乳がん、前立腺がん、肺がんに多くみられ、わが国の患者数は15-30万人と推定される。現在では、長期生存するがん患者も多く、骨転移に伴う疼痛、骨折、麻痺などのQOLの低下が問題となっている。現在、少数の治療薬が存在するものの、副作用の問題など選択肢は少ない。微小胞やmiRNAはそれぞれDDSやがんの診断に臨床応用されつつあるが、本件の成果は、生体に本来備わっている骨特異的微小胞と抗腫瘍性miRNAを用いた全く新しい発想に基づく治療のための基礎研究であり、既存のがん患者の骨転移の治療の問題を改善し、より高い効果が期待できる治療法の開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：We clarified that matrix vesicles and miRNA-125b (miR-125b) inhibit the proliferation, migration and/or invasion of MCF-7 (human breast cancer), PC-3 (human prostate cancer), and PY8119 (mammary adenocarcinoma) cells in vitro. By using bone metastasis models with intratibial or caudal artery injection to transgenic (Tg) mice overexpressing miR-125b under the control of the human osteocalcin promoter, we analyzed whether miR-125b inhibits bone resorption and/or cancer growth in bones. In both wild-type (WT) and Tg mice, bone resorption and cancer growth were observed within 7 days and 10 days respectively. Based on in vivo imaging and microCT analyses, cancer growth was much higher and bone resorption was much severer in WT mice than in Tg mice, respectively. Histological analysis indicates that the number of TRAP-positive multinucleated cells was higher in WT mice than Tg mice.

研究分野：組織学

キーワード：骨転移 miRNA 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本件申請者らはこれまでに、マウス骨芽細胞株を用いた検討において、骨芽細胞・象牙芽細胞・軟骨細胞のみが有する分泌機構によって出芽的に放出される微小胞(基質小胞)の中に数百種類の miRNA が含まれていることをマイクロアレイおよび qPCR によって確認し、その多くがヒトと相同していることを明らかにした。それらの miRNA が標的とする遺伝子群の中には、骨代謝において重要な役割を担うものもあり、微小胞中の miRNA-125b (miR-125b) が骨微小環境下でマクロファージの破骨細胞への分化を抑制することを明らかにした(特許申請済)。miR-125b は骨芽細胞質内よりも有意に高濃度で微小胞内に輸送された。また、微小胞をマクロファージに直接添加したところ、マクロファージによる取り込みが確認され、miR-125b 投与時と同様に破骨細胞への分化抑制が認められた。

一方、miR-125b の標的とされる遺伝子群の中には、がん細胞の増殖や骨転移への関わりが報告されている遺伝子が数多く含まれていた。骨は乳がんや前立腺がん、肺がんなどが転移しやすい組織であり、骨溶解や骨吸収によって転移巣が拡大することから、骨基質に埋入している小胞中の miR-125b が骨溶解や骨吸収によって露出し、がん細胞の転移能や浸潤性に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて大きいと考えられた。

2. 研究の目的

本件では、in vitro で微小胞中の miR-125b が骨へ高転移性を示すがん細胞の増殖・分化・浸潤性等にどのような影響を及ぼすのかを明らかにし、in vivo (骨転移モデルマウス) で miR-125b のがんの骨転移への作用を解析することで、miR-125b を標的とした骨転移治療への応用を模索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vitro

ヒト乳がん細胞(MCF-7細胞)、ヒト前立腺がん細胞(PC-3細胞)およびマウス乳がん細胞(PY8119細胞)に miR-125b mimic をトランスフェクションし、がん細胞の増殖・遊走・浸潤能への影響を解析した。また、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞より超遠心法により微小胞を回収し、各種がん細胞に添加して同様の解析を行った。

in vivo イメージングで用いるため、PY8119 細胞にルシフェラーゼを発現させた PY8119-Luc 細胞を作製した。

(2) in vivo

ヒトオステオカルシンプロモーター制御下で miR-125b を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。このマウスの骨基質をコラゲナーゼおよび EDTA で消化・脱灰して骨片と細胞を遠沈後、回収した上清中に含まれる miRNA を miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN) を用いて精製し、骨基質中の miR-125b の量を野生型(WT)マウスと Tg マウスで比較した。

がん骨転移モデルとして、5週齢の WT および Tg 雌マウス膝関節より脛骨骨髓腔に PY8119 細胞 ($1 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ PBS) を 30G のハミルトンシリンジにて注入し、 μCT 解析(10・14日後)を行った。脛骨を回収(14日後)して脱灰パラフィン標本作製し、TRAP 染色(対比染色はメチルグリーン)により組織学的な解析を行った。

また、PY8119-Luc 細胞 ($1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ PBS) を 6週齢の WT および Tg 雌マウス尾動脈から逆行性に注入し(Nat Commun. 2018, 30, 9, 2981 参照) μCT 解析(1・2週間後)および in vivo イメージング解析(17・25日後)を行った。大腿骨を回収(25日後)して脱灰パラフィン標本作製し、TRAP 染色により組織学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) in vitro

回収した微小胞の性状はアルカリフォスファターゼ活性およびウェスタンブロッティングにて都度確認した。その上で各種がん細胞への投与を行ったところ、MCF-7 細胞の増殖・遊走・浸潤を抑制、PC-3 細胞の増殖および遊走を抑制、さらに PY8119 細胞の増殖を抑制した。

同様に、miR-125b mimic または negative control miRNA を MCF-7 細胞および PY8119 細胞にトランスフェクションしたところ、miR-125b mimic は PY8119 細胞の増殖を抑制した。

(2) in vitro

WT および Tg マウス頭頂骨をコラゲナーゼおよび EDTA で消化・脱灰して骨片と細胞を遠沈後、回収した上清中の miR-125b を TaqMan PCR にて定量したところ、Tg マウス由来の上清からは WT

マウス由来に比較して miR-125b が有意に多く検出されたことから、Tg マウス頭頂骨の骨基質には miR-125b が多量に蓄積していることが明らかとなった。

脛骨への PY8119 細胞注入によるがん骨転移モデルでは、注入 7 日後には μ CT で PY8119 細胞注入群で骨吸収がみられた。14 日後に摘出した脛骨の μ CT 解析をしたところ、WT マウスでは PY8119 細胞注入により海綿骨量/組織量、海綿骨数および海綿骨厚さが有意に減少していた一方、Tg マウスでは変化は認められなかった (図 1・図 2)。しかし、膝関節から注射針を脛骨骨髓腔内にてがん細胞を注入する方法は、脛骨海綿骨が機械的に破壊されることから (図 3)、正確な海綿骨量およびがん転移巣の定量には不向きであると判断した。

図 1 脛骨 μ CT 像



WT PBS WT PY Tg PBS Tg PY

図 3 脛骨近位端 TRAP 染色像

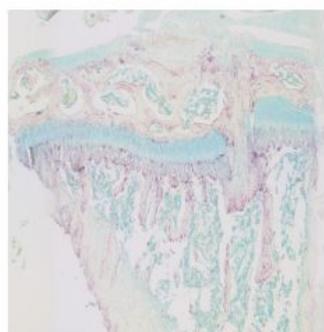
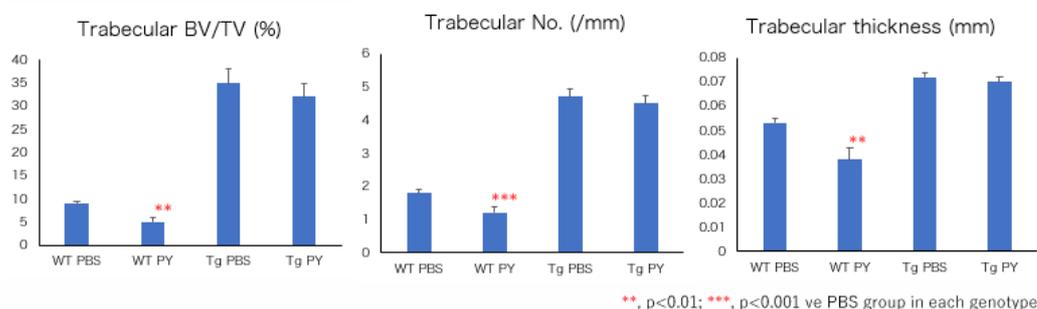
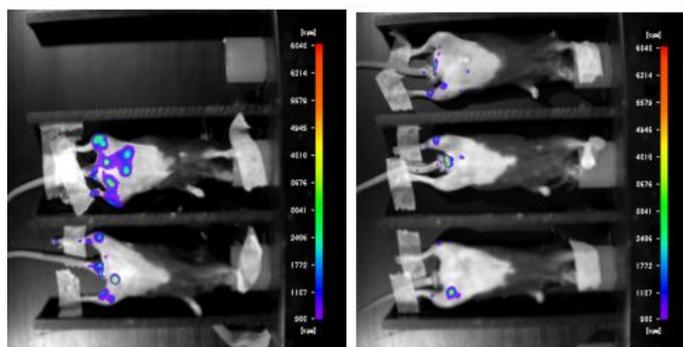


図 2 脛骨 μ CT 解析



そこで、2018 年に報告された尻動脈からがん細胞を注入するがん骨転移モデル (従来の左心室移植法に比べ、がん細胞を高効率かつ特異的に骨髓に送達でき、他の臓器へのがん転移頻度を抑えることが可能) に変更した。このモデルでも、注入 7 日後には μ CT で PY8119-Luc 細胞注入群で骨吸収がみられた。14 日後に摘出した脛骨の μ CT 解析をしたところ、両ジェノタイプとも PY8119 細胞注入により有意に海綿骨量、海綿骨数、海綿骨厚さ、および皮質骨量が減少していた。in vivo イメージングによる PY8119-Luc 細胞の定量を行ったところ、WT マウスに比べて Tg マウスではがん細胞の増殖が抑えられていた (図 4・5)。

図 4 in vivo イメージング像



WT PY

Tg PY

図 5 in vivo イメージング定量

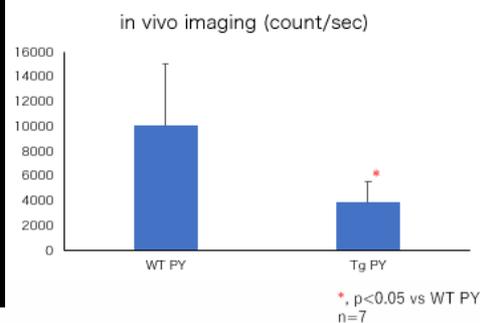
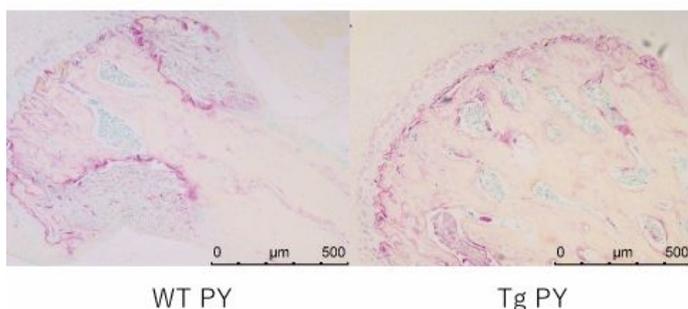


図6 大腿骨TRAP染色像



大腿骨組織標本を TRAP 染色したところ(図6)、骨表面あたりの TRAP 陽性多核細胞(破骨細胞)数の増加率(vs PBS 群)は WT マウスに比べて Tg マウスで有意に低値であったことから、Tg マウスでは骨吸収が抑制されている可能性が示唆されたが、いずれのジェノタイプにおいても PY8119-Luc 注入群において骨吸収が深刻であることから、細胞数を減らすか、サンプリング日数を短縮する必要があると考えられる。

以上の結果より、骨基質に多量に miR-125b が蓄積している Tg マウスにおいては、がん骨転移による骨吸収が抑制されるだけでなく、がん細胞増殖も抑制されることが明らかとなった。

今後は、WT マウスに PY8119 細胞を尾動脈より逆行性に注入し、かつ miR-125b mimic または negative control miRNA を同様に注入して、がん骨転移および骨吸収への影響を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

Tomoko Minamizaki, Yuji Yoshiko; MiR-125b stored in bone matrix plays a role in osteoblast-osteoclast communication. The 10th Annual Meeting of the Japanese Association for RNAi (JARI) & the 5th Annual Meeting of Japanese Society of Extracellular Vesicles (JSEV).2018.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉子 裕二

ローマ字氏名：Yuji Yoshiko

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院医歯薬保健学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 20263709

(2)研究協力者

研究協力者氏名：二村 学, 香西 克之, Faisal Ahmed, Nushrat Sarmin, Mentari Zaurasari

ローマ字氏名：Manabu Futamura, Katsuyuki Kozai, Faisal Ahmed, Nushrat Sarmin, Mentari Zaurasari

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。