

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501319

研究課題名(和文)骨微小環境での腫瘍間質相互作用を制御するmicroRNAの同定とその機能解析

研究課題名(英文)Analysis of microRNA regulating malignant potential of mammary tumor in the bone microenvironment.

研究代表者

二口 充(Futakuchi, Mitsuru)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60275120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はmicroRNA-205(miR205)の発現低下を見いだした。miR205の過剰発現株を作成し、miR205過剰発現株では薬剤感受性を増大させることが判明した。  
in vivo解析では、miR205過剰発現株は骨微小環境で増殖する像は見られなかった。miR205が制御する因子としてCathepsin Dが同定され、この発現は乳癌のStage, TNM分類のTと良い相関が見られた。  
以上より、miR205は骨微小環境での生存および薬剤耐性に関与し、その発現を低下させることで腫瘍間質相互作用を誘導する腫瘍細胞にCathepsin Dの発現を上昇させることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We set the hypothesis that cancer cells arrived at the bone microenvironment (bone ME), would survive with phenotype similar to cancer stem cells. We found that miR205 was down-regulated in the bone ME. miR205 overexpressing tumor cell lines (miR205+cells) were established and involvement of EMT was found. We also found that the drug sensitivity of inhibitors of ER, AR and HER2 were enhanced in miR205+cells. IHC study of SOX2, one of the cancer stem cell marker, revealed that SOX2+ cells were observed in the bone ME and that the number of SOX2+ cells was significantly lower than that of control after trasplant of miR205+ cells. Cathepsin D was regulated by miR205 in the tumor cells and whose high expression were correlated with clinical stage and T grade of TNM classification. Taken together, miR205 may be involved in the survival, induction of EMT, and drug resistance of the tumor cells in the bone ME, all of which are malignant phenotypes of clinically defined bone metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨微小環境 microRNA がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

欧米の女性に罹患率の高い乳癌は、末期に骨転移巣が全身に拡大するため、その死亡率は上昇している。このため骨転移形成メカニズムの解明と治療標的分子の同定は急務である。骨転移巣の先進部では腫瘍細胞は間質細胞である破骨細胞や骨芽細胞と相互作用している。腫瘍細胞は、破骨細胞を活性化して硬い骨基質を溶解させて、腫瘍が増殖するための空間を形成させる。さらに骨基質中に大量に含まれる TGF $\beta$  などの増殖因子が放出されることにより、腫瘍細胞がさらに刺激され、骨芽・破骨細胞を活性化し、骨溶解がますます促進される。このように先進部(微小環境)における腫瘍間質相互作用が、骨転移の進展に重要な役割を果たしている。

我々は、骨微小環境における前立腺癌や乳癌の増殖を解析できる動物モデルを開発した。このモデルの Tumor bone interface (TB-interface)では、ヒト前立腺癌や乳癌の骨転移巣の浸潤先進部と同じ病理組織像を呈していた(Lynch and Futakuchi, Cancer cell, 2005, Wilson and Futakuchi, Cancer Research, 2008)。この TB-interface を腫瘍細胞が骨微小環境で腫瘍細胞が腫瘍間質相互作用を伴い増殖する領域と定義し、腫瘍細胞のみが増殖する領域(Tumor alone area)と比較した。その結果、Receptor activator of NF-kB ligand (RANKL)は破骨細胞を誘導し溶骨性変化を拡大すること、TGF $\beta$  receptor1 は骨基質由来の TGF $\beta$  のシグナルを腫瘍細胞に伝達し増殖促進作用を示すことが判明した(Sato and Futakuchi, 2008, Futakuchi et al., 2009)。これらの骨転移関連因子はヒト骨転移巣でもその発現が上昇しており、ヒト骨転移巣の進展に関与することが示唆された(Anguraji and Futakuchi, 2011)。

RANKL や TGF $\beta$ R1 などの既知の骨転移関連因子の発現量は環境により異なり、

培養状態や皮下に移植した場合は低く骨微小環境では高いことから、腫瘍細胞は骨微小環境で転移関連因子の発現制御を行っていると考えられる。原発巣から骨微小環境へ移動した腫瘍細胞は、この発現制御メカニズムにより微小環境に適応し、増殖を続けた結果、大きな骨転移巣が形成される。このように微小環境での遺伝子発現制御メカニズムは、転移巣の進展に重要な役割を果たしていると考えられる。

機能性 RNA である microRNA(miRNA)は、mRNA の 3'末端非翻訳領域に配列相補的に結合することにより、遺伝子発現を精巧に調節することが知られている。miR-146 は NF-kB を制御しその発現低下と肺転移形成との関連する報告がある。また miR-205 はその発現抑制により、TGF $\beta$  による EMT が促進され腫瘍の進展に関与することが報告されている。

## 2. 研究の目的

腫瘍細胞は骨微小環境において、miRNA により遺伝子発現を調節し、腫瘍間質相互作用が誘導され溶骨性変化が促進されると仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証することを目的とする。

1) 骨微小環境における腫瘍細胞の増殖および破骨細胞の誘導に関与する miRNA の同定。

2) 同定された miRNA が制御する因子の検索

3) miRNA により制御された因子が、骨微小環境における腫瘍細胞の増殖および破骨細胞の誘導を促進することの確認

## 3. 研究の方法

Ex.1 骨微小環境で機能する miR-205 の機能解析

予備検討で明らかとなった microRNA のうち miR-205 に着目し、微小環境で発現低下していた miR205 を過剰発現させた細胞株と親株を比較し、我々の乳癌のマウスモデルを用いて miRNA の発現上昇

が骨微小環境における腫瘍細胞の増殖や破骨細胞の誘導および溶骨性変化に対する影響を検索した。

Ex.1-1 細胞株の樹立：miR-205 の発現ベクターを作成し(Takara Bio)、マウス乳がん細胞株 CL66-M2 にトランスフェクションした(Lipofectamine- Plus, Invitrogen) ゲニチシン(100ug/ml)により導入した miRNA を安定した発現株を選択し継代し、*in vitro* において miR-205 の発現量を確認し、細胞増殖率を検索した。さらに、抗がん剤スクリーニングキット(文部科学省がん支援、化学療法班より提供)を用いて抗がん剤に対する感受性を検索した。

Ex.1-2 骨微小環境における miR-205 の機能解析：Ex.1 で樹立した CL66-M2 に miRNA を強制発現させた株および Mock 株を、BalbC 雌マウスの頭蓋骨直上に 1 匹あたり  $1.0 \times 10^6$  個をそれぞれ移植した。移植後 28 日めに屠殺剖検し、頭蓋骨と腫瘍を含めた組織を半割し、半分は 4%パラホルム固定をして、病理組織学的な検討をおこなった。もう一方の組織から腫瘍細胞が骨破壊を誘導している TB interface およびその対照部である Tumor alone area を切り出しそれぞれ採取するし凍結保存した。

Ex.1-3 骨微小環境における腫瘍細胞の増殖率：細胞増殖マーカーである PCNA 抗体を用いて免疫組織染色を行い(Bondmax 自動染色機, Leica)、TB-interface および TA-area における腫瘍細胞の細胞増殖率を検索した。

Ex.1-4 破骨細胞の誘導と溶骨性変化の検索：骨破壊の程度は、H.E.染色標本を画像解析装置を用いて定量解析した。また TRAP 染色を行い陽性となった破骨細胞の数を計測した。

Ex.2 骨微小環境で機能する miRNA が制御する遺伝子の同定：

MicroArray により、Mock 株移植群に比べ miR-205 過剰発現株移植群の TB-interface で発現が低下する遺伝子プ

ロファイルを検索し、骨微小環境で miRNA の発現が上昇することにより、その発現が低下する遺伝子を同定した。

Ex.2-1 miR-205 が制御する因子の microArray による検索：Ex.1-2 で採取した TB-interface(骨微小環境)の部位を樹立した細胞株および Mock 株のそれぞれから切り出し、microarray 解析(東レ)を行った。発現プロファイルを基に Mock 株移植群に比べ miRNA 過剰発現株移植群の TB-interface で発現が低下する候補因子のプロファイルを得た。

Ex.2-2 Ex.2-1 と同様の方法で、Ex.1-1 で樹立した miR205 過剰発現株と Mock 株を用いて、microarray 解析(東レ)による発現プロファイルを検索した。

Ex.2-3 Ex.2-1 および Ex.2-2 の発現プロファイルをもとに、Ex.2-1 のみで発現が変動した遺伝子を *in vivo* に特異的に発現する遺伝子、Ex.2-2 のみおよび、Ex.2-1 と Ex.2-2 で共通して発現変動する遺伝子を、腫瘍細胞に特異的に変動した遺伝子として同定した。

Ex.3 miRNA が制御する遺伝子の骨微小環境における機能

Ex.2 で同定された遺伝子の抗体を購入し乳癌組織の Tissue microarray (US Biomax, INC 社)を用いてその発現量と乳癌の悪性化との関連を検索した。検索前に名古屋市立大学倫理委員会の承認を得た(承認番号 1049)。

#### 4. 研究成果

骨微小環境におけるがん細胞の増殖に関与する microRNA の同定を目的として、MicroRNA-Array 解析を行い、骨微小環境においては、microRNA-205 (miR205)の発現が低下することを見いだした。次にその機能を解析する目的で miR205 の過剰発現株を作成し、抗がん剤に対する感受性を *in vitro* で検索した。その結果、Mock 株では ER, AR, HER2, EGFR 阻害剤に対し耐性を示したが、miR205 過剰発現株ではこれらに対し感受性を示した。さらに

*in vivo* において、Mock 株では骨微小環境におけるがん細胞の増殖、破骨細胞の誘導および溶骨性変化の誘導が見られたが、miR205 過剰発現株は、骨微小環境にほとんど生着しなかった。これらの結果から骨微小環境におけるがん細胞の生着・治療抵抗性に、がん幹細胞の関与が示唆された。そこでがん幹細胞のマーカーのひとつである SOX2 の免疫染色を行った結果、SOX2 が陽性となる腫瘍細胞の数は、骨微小環境では皮下微小環境に比べて多く、TGF- $\beta$  シグナル阻害剤を投与された群では、骨微小環境における SOX2 陽性細胞率は皮下微小環境と同じレベルにまで低下することが判明した。さらに miR205 過剰発現株では Mock 株に比べ、骨微小環境における SOX2 陽性細胞率が有意に低下した。次に臨床における意義を Tissue Microarray により検索した結果、miR205 が制御する因子として同定された Cathepsin D の発現は乳癌の Stage, TNM 分類の T と良い相関が見られた。以上より、骨微小環境は、がん転移の幹細胞の niche であり TGF- $\beta$  の関与が示唆された。さらに miR205 は骨微小環境におけるがん細胞の生存および薬剤耐性に関与し、その発現を低下させることで腫瘍間質相互作用を誘導する腫瘍細胞に Cathepsin D の発現を上昇させることが判明した。

## 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 12 件 )

1. Xu, J., Alexander, D. B., Futakuchi, M., Numano, T., Fukamachi, K., Suzui, M., Omori, T., Kanno, J., Hirose, A., and Tsuda, H. (2014). Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis and mesothelial proliferation by multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci*, 105, 763-769. 査読あり, 10.1111/cas.12437
2. Sakai, Y., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Miyoshi, I., Tsuda, H., Suzui, M., and Hayashi, H. (2014). A Novel Transgenic Mouse Model Carrying Human Tribbles Related Protein 3 (TRB3) Gene and Its Site Specific Phenotype. *Biol Pharm Bull* 37, 1068-1074. 査読あり, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882419>
3. Arimoto, K.-i., Hishiki, T., Kiyonari, H., Abe, T., Cheng, C., Yan, M., Fan, J.-B., Futakuchi, M., Tsuda, H., Murakami, Y., et al. Murine Herc6 plays a critical role in protein ISGylation in vivo and has an ISGylation independent function in seminal vesicles. *Journal of Interferon & Cytokine Research* in press. 査読あり, 10.1089/jir.2014.0113
4. Fukamachi, K., Iigo, M., Hagiwara, Y., Shibata, K., Futakuchi, M., Alexander, D. B., Hino, O., Suzui, M., and Tsuda, H. Rat N-ERC/mesothelin as a marker for in vivo screening of drugs against pancreas cancer. *PLOS ONE* 9, e11481. 査読あり, 10.1371/journal.pone.0111481
5. Fukamachi, K., Tanaka, H., Sakai, Y., Alexander, D. B., Futakuchi, M., Tsuda, H., and Suzui, M. (2013). A novel reporter rat strain that expresses LacZ upon Cre-mediated recombination. *Genesis* 51, 268-274. 査読あり, 10.1002/dvg.22371
6. Futakuchi, M. (2013). Animal model of lung metastasis of hepatocellular carcinoma; A tool for the development of anti- metastatic therapeutics. *Journal of Cancer Therapy* 4 420-425. 査読あり, 10.4236/jct.2013.42A051
7. Futakuchi, M., and Singh, R. K. (2013). Animal model for mammary tumor growth in the bone microenvironment. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 20, 195-203. 査読あり, 10.1007/s12282-013-0439-5
8. Sakai, Y., Fukamachi, K., Futakuchi, M.,

- Hayashi, H., and Suzui, M. (2013). Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced by tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells. *Oncology reports* 30, 64-70. 査読あり, 10.3892/or.2013.2441
9. Vass, A., Suveges, G., Erces, D., Nogrady, M., Varga, G., Foldesi, I., Futakuchi, M., Imai, M., Okada, N., Okada, H., et al. (2013). Inflammatory Activation after Experimental Cardiac Tamponade. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* 51, 1-13. 査読あり, 10.1159/000352089
  10. Sagawa, Y., Futakuchi, M., Xu, J., Fukamachi, K., Sakai, Y., Ikarashi, Y., Nishimura, T., Suzui, M., Tsuda, H., and Morita, A. (2012). Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice. *The Journal of toxicological sciences* 37, 317-327. 査読あり, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22467022>
  11. Takagi, A., Hirose, A., Futakuchi, M., Tsuda, H., and Kanno, J. (2012). Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci* 103, 1440-1444. 査読あり, 10.1111/j.1349-7006.2012.02318.x
  12. Xu, J., Futakuchi, M., Shimizu, H., Alexander, D. B., Yanagihara, K., Fukamachi, K., Suzui, M., Kanno, J., Hirose, A., Ogata, A., et al. (2012). Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Sci* 103, 2045-2050. 査読あり, 10.1111/cas.12005
- 〔学会発表〕(計7件)
1. 二口 充, 骨微小環境における前立腺 二口 充, 深町勝己, 酒々井眞澄 骨微小環境における乳がん細胞の増殖に關与する microRNA の同定とその機能解析. 第 23 回日本がん転移学会学術総会, 2014 年 7 月 10 日-11 日. シンポジウム, 金沢市文化ホール (石川県金沢市),
  2. 二口 充 骨微小環境におけるがん細胞の増殖メカニズム. 第 87 回日本内分泌学会学術総会 福岡, 2014 年 4 月 24 日-26 日. シンポジウム, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
  3. Futakuchi, M. Growth of malignant tumor in the bone microenvironment. 2014 Seoul National University Cancer Research Institute, Cancer Symposium, April 16-19, 2014. Symposium, Mokpo, Korea
  4. 二口 充 骨微小環境における腫瘍細胞増殖メカニズム: 動物モデルを用いた解析. 平成 25 年度「個体レベルでのがん支援活動」ワークショップ, 2014 年 2 月 17 日-18 日 基調講演, 琵琶湖ホテル (滋賀県, 大津市)
  5. Futakuchi, M. Mechanism of bone metastasis of malignant tumor; search for the therapeutic targets 18th Korea Japan Cancer Workshop, Gifu, Japan. (Invited, Nov. 30, 2013, 岐阜都ホテル, 岐阜県, 岐阜市)
  6. Futakuchi, M., Fukamachi, K., and Suzui, M. (2013), Growth of Malignant tumor in the bone microenvironment; mechanism of bone metastasis and its therapeutic targets, 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan. (Symposium, Oct. 3rd, 2013), パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)
  7. 二口 充, 骨微小環境における前立腺癌および乳癌の増殖メカニズムに着目した骨転移の治療薬の開発と展開,

第 24 回新薬創製懇話会. 招待講演,  
2013 年 9 月 25 日, ニューウェルサン  
ピア沼津 (静岡県沼津市)

(3)連携研究者 なし

〔図書〕(計 6 件)

1. 二口 充 (2014).新臨床腫瘍学(改訂第 4 版) 1-8 浸潤と転移, 印刷中
2. 二口 充 (2014).特集, 悪性腫瘍と骨・カルシウム, 癌骨転移のメカニズム. 24, 13-19 (医薬ジャーナル社)
3. 二口 充 (2014).特集: 癌と微小環境. がん細胞と転移標的臓器の微小環境について, Surgery Frontier, 21, 41-45 (メディカルレビュー社).
4. 二口 充, ロビンス基礎病理学 第 9 版 日本語翻訳 Chapter 8 Environmental and nutritional diseases, 2013 年 11 月エルゼビア・ジャパンから刊行
5. 二口 充, モデル動物利用マニュアル(中村卓郎 編) 第 2 章 がん、第 4 項 転移浸潤モデル、(3) 骨浸潤転移モデル, p79-87, 2012 年 10 月, エル・アイ・シーから刊行
6. 二口 充, 動物モデルを用いた骨転移の分子メカニズム解明と創薬応用研究、最新疾患モデルと創薬応用の最前線、2012, 遺伝子医学 MOOK22 号、249-254

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

二口 充 (Futakuchi, Mitsuru)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科  
准教授  
研究者番号: 60275120

(2)研究分担者 なし