

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11014

研究課題名(和文) 分泌型miRNAを介した骨転移癌細胞-骨代謝細胞間コミュニケーションと骨破壊制御

研究課題名(英文) Roles of bone metastatic mammary tumor cell-derived extracellular vesicles in osteoclast differentiation and function

研究代表者

上原 範久 (Uehara, Norihisa)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30368211

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)：癌細胞骨転移の成立・進展において、癌細胞由来分泌因子による破骨細胞の活性化とそれに伴う骨破壊が、癌細胞への栄養供給と増殖環境の提供に大きく寄与している。本研究において、マウス骨転移性乳癌細胞由来細胞外小胞(Extracellular vesicles: EVs)が、マウス骨髄マクロファージへの伝播を介してRANKL誘導破骨細胞形成と骨吸収の亢進ならびに破骨細胞アポトーシスを抑制することを明らかにした。さらに、骨転移性乳癌細胞由来EVsに内包される特異的miRNAの同定に成功し、新たな癌細胞骨転移メカニズムの解明に有用な知見を与えうるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The interplay between breast cancer cells and bone cells in bone marrow microenvironments play an important role in tumor progression through the secreting factors. Although extracellular vesicles (EVs) released from cancer cells have shown to regulate the many types of cancer progression, In this study, we explored the implications of bone metastatic breast cancer cell-derived EVs in the regulation of osteoclast differentiation, resorption and survival. Treatment of mouse bone marrow macrophages (BMMs) cells with mouse bone metastatic (4T1 and 4T1.2) mammary tumor cell-derived EVs (BM-EVs) promoted osteoclast differentiation. Treatment of mature osteoclasts with BM-EVs markedly increased bone resorption. Interestingly, BM-EVs attenuated apoptosis of osteoclasts through negative regulation of Bim and Caspase-3 activation. Taken together, our results demonstrate the implication of BM-EVs-mediated osteoclast formation, bone resorption and cell survival.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：癌骨転移 乳癌 細胞外小胞 破骨細胞 miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

癌の骨転移の成立・進展において、癌細胞と骨環境中の細胞との相互作用は非常に重要であり、これまでに様々な分泌因子の関与が明らかとなっている。特に癌細胞由来の分泌因子を介した破骨細胞の活性化とそれに伴う病的骨破壊が、癌細胞への栄養供給と増殖環境の提供に大きな役割を果たしていることから、破骨細胞の分化・活性を制御することは、骨転移の成立・進展抑制戦略における重要な課題の一つである。

microRNA (miRNA)は、翻訳レベルでのタンパク発現を調節する 19~25 塩基程度の小分子 non-coding RNA である。様々な細胞機能制御に重要な役割を有することに加え、癌の悪性化においてもその発現異常が報告されている。近年、興味深いことに、体液中のエクソソームという膜小胞に miRNA が含まれ、細胞間コミュニケーション分子として機能することが明らかとなった。

エクソソームは、miRNA や mRNA、タンパク質を含む直径 30~100 nm のエンドソーム由来の小胞である。近年の研究により、エクソソームが分泌した細胞の周辺細胞のみならず、遠隔細胞に対してもエンドクライン的に作用することで様々な疾患の病態プロセスに関与していることが明らかになりつつある (Kosaka et al., Front. Genet.2012)。エクソソームに含まれる miRNA (分泌型 miRNA) は送り手の細胞 (Donor cell) より分泌され、受け手の細胞 (Recipient cell) に取り込まれ、受け手の細胞の表現型を変化させることが報告されている。

最近の報告では、癌細胞由来エクソソームが癌の悪性化 (増殖、浸潤、転移、血管新生) に寄与することが明らかとなった (Ell et al., Cancer Cell. 2012)。即ち、癌細胞は自ら分泌したエクソソームを介して、受け手の細胞の表現型を変化させ、癌細胞の生存に有利な環境へと変化させるのである。しかしながら、骨転移における分泌型 miRNA を介した癌細胞と周辺細胞 (破骨細胞・骨芽細胞) との細胞間相互作用の実態は未だ解明されていない。

申請者はこれまでに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による骨転移性乳癌細胞増殖抑制機序において、癌抑制 miRNA (miR-148a) を同定し、miR-148a が骨転移に重要な分泌因子である TGF- $\beta$  2 の発現を抑制することを明らかにした (論文投稿準備中: 若手研究(B)22791263; 研究代表)。

本申請課題において、これまで申請者が明らかにした内在性の癌抑制分子としての miRNA の機能に加え、分泌型 miRNA を介した癌-骨代謝細胞間コミュニケーションの意義の解明は、癌骨転移に伴う骨破壊の分子基盤ならびに新たな診断・治療法の開発に極めて有用な知見を提供しうると考え、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨転移性癌細胞由来分泌型 miRNA のプロファイリングにより、新たな癌-骨代謝細胞間コミュニケーション分子の同定と機序解明を行い、効果的骨破壊制御法開発への応用を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 3-1.細胞株

マウス乳癌細胞株 67NR および 4T07 は Karmanos Cancer Institute より、4T1 および 4T1.2 は Peter MacCallum Cancer Center よりそれぞれ入手した。マウス破骨前駆細胞株 RAW264.7 は ATCC より購入した。

### 3-2.細胞外小胞の単離

それぞれの癌細胞は 10% Exosome-depleted FBS (Thermo)を含む DMEM で~48 時間培養を行い、その培養上清より、ExoQuick-TC (System Bioscience)を用いて細胞外小胞を回収した。単離した細胞外小胞は Micro Protein Assay および NanoSight によりタンパク濃度と粒子数・粒子径の確認を行った。

### 3-3.TRAP 染色

破骨細胞形成は、4 週齢の ddY 雄マウスの大腿骨、脛骨より骨髄細胞を調製し、20 ng/ml M-CSF (PeproTech)存在下で 72h 培養した後、20 ng/ml M-CSF、50 ng/ml RANKL (Oriental Yeast) 存在下で 4 日間培養 (-MEM, 10% FBS)した。RAW264.7 細胞は 50 ng/ml RANKL 添加後 3 日間培養し、破骨細胞の形成を行った。細胞を固定した後、Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit (Sigma)を用いて染色し、3 核以上の TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞として計数した。

### 3-4. real time PCR

total RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen)を用いて調製した後、SuperScript III first-strand cDNA synthesis kit (Thermo)を用いて cDNA 合成を行い、PCR 反応のテンプレートとした。PCR 反応は、目的遺伝子の特異的プライマーおよび KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems, Boston, MA)を用いて、40 サイクル(95 °C 5 秒、60 °C 20 秒)を行った。mRNA 発現は、比較 Ct 法により定量化した。

### 3-5. Pit assay

マウス骨髄細胞への 20 ng/ml M-CSF、50 ng/ml RANKL 刺激により形成された破骨細胞は、象牙質切片 (和光純薬) 上へ播種し、7 日間培養を行った後、吸収窩を HRP-conjugated WGA レクチン抗体により染色を行い、観察した。

## 5. Western blot 法

タンパクの抽出は、lysis buffer (Cell Signaling)を用いて行った。抽出したタンパ

クは SDS-PAGE に供し、PVDF メンブレンに転写した後、目的の特異的抗体を用いて検出を行った (Uehara et al. Lab Invest 2017)。

### 3-6. miRNA アレイ解析

total RNA は細胞外小胞より TRIzol Reagent (Thermo) および RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて調製した後、精製純度を Experion System (Bio-Rad) により確認した。100 ng の total RNA は、FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit を用いてラベルした後、Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Array を用いて miRNA のハイブリダイゼーションを行った。アレイは Affymetrix scanner によりスキャンし、網羅的発現比較は Affymetrix Expression Console™ Affymetrix® ならびに Transcriptome Analysis Console Software を用いて行った。

## 4. 研究成果

### 4-1 骨転移性癌細胞由来細胞外小胞のキャラクタリゼーション

非骨転移性乳癌細胞 (67NR、4T07) および骨転移性乳癌細胞 (4T1、4T1.2) の培養上清より単離した細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) の粒子数・粒子径の確認および形態の確認は、Nanoparticle Tracking Analysis および透過電顕を用いて行った。その結果、67NR 由来細胞外小胞 (67NR-EVs) および 4T1 由来細胞外小胞 (4T1-EVs) のいずれも粒子径に有意な差はなく、それぞれ  $125 \pm 70 \text{ nm}$  と  $134.3 \pm 85.6 \text{ nm}$  であった (Fig. 1A)。またエクソソームマーカーである Alix、CD63、CD9 のタンパクレベルをウェスタンブロットにより検討した結果、いずれの EVs にもその発現が確認された (Fig. 1B)。よって、単離した細胞外小胞にはエクソソームを多く含むことが示唆された。

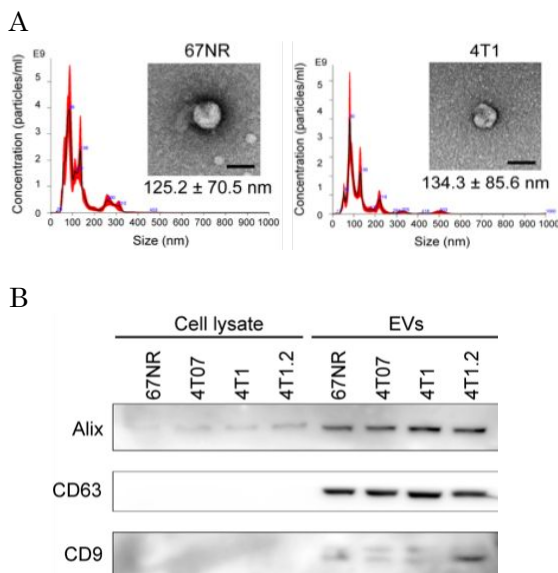


Fig.1 細胞外小胞のキャラクタリゼーション

### 4-2 骨転移性癌細胞由来 EVs の破骨細胞形成に及ぼす影響

マウス骨髄細胞を用いた RANKL 刺激 *in vitro* 破骨細胞分化誘導実験の結果、非転移性乳癌細胞 (67NR) 由来 EVs (67NR-EVs) 処理による TRAP 陽性破骨細胞形成は、EVs 未処理と同等であったが、4T1-EVs 処理により TRAP 陽性破骨細胞数の顕著な増加が観察され (Fig. 2A)、破骨細胞分化関連遺伝子 (*TRAP*、*Cathepsin K*、*MMP-9*、*Calcitonin receptor*) の発現上昇が認められた (data not shown)。また RANKL 刺激後の *NFATc1* および *c-Fos* 遺伝子の発現は、67NR-EVs 処理と比較して、4T1-EVs 処理により RANKL 刺激 4 日後においてもその発現上昇が維持されていた (Fig. 2B)。

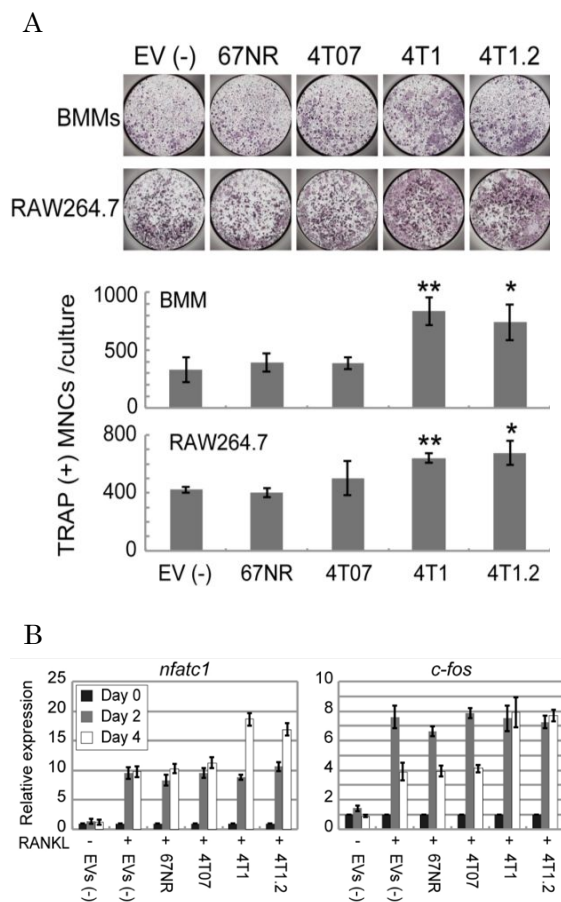


Fig. 2 細胞外小胞の破骨細胞形成に及ぼす影響

### 4-3 骨転移性癌細胞由来 EVs の骨吸収に及ぼす影響

各乳癌細胞由来 EVs の骨吸収能に対する影響は、象牙切片上にて破骨細胞の培養を行い、吸収面積の計測により検討した。その結果、67NR-EVs と比較して 4T07-EVs、4T1-EVs および 4T1.2-EVs 添加により象牙切片上の吸収面積の顕著な増大が確認された。以上の結果から、骨転移性乳癌細胞由来の EV には成熟破骨細胞における骨吸収を促進する効果があることが明らかとなった (Fig. 3)。

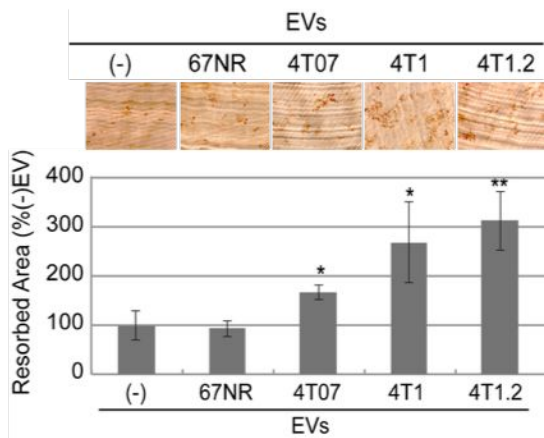


Fig. 3 骨転移性乳癌細胞由来 EVs の骨吸収に及ぼす影響

#### 4-4 骨転移性乳癌細胞由来 EVs の破骨細胞生存シグナルへの影響

各乳癌細胞由来 EVs の破骨細胞生存シグナルへの影響を検討した結果、4T07-EVs、4T1-EVs および 4T1.2-EVs 添加により、破骨細胞のアポトーシス数の顕著な抑制が観察された。4T1-EVs による破骨細胞アポトーシス抑制において、アポトーシス抑制タンパクである Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> の発現に変化はみられなかったが、アポトーシス促進タンパクである Bim および活性型 Caspase-3 の顕著な発現低下が確認された(Fig. 4)。

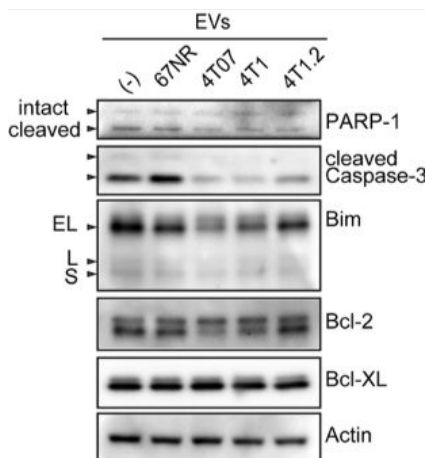
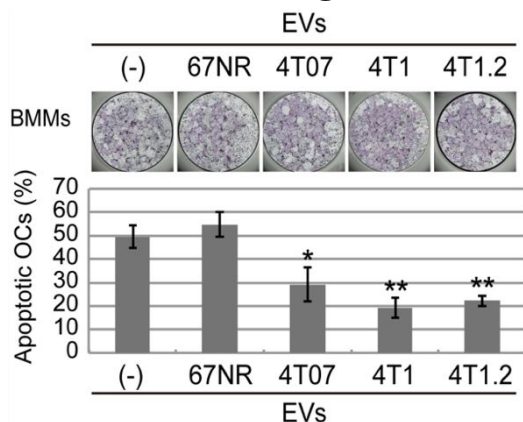


Fig. 4 骨転移性乳癌細胞由来 EVs の破骨細胞アポトーシスに及ぼす影響

#### 4-6 骨転移性乳癌細胞由来 EVs に内包される特異的 miRNA の同定

近年、癌細胞より分泌される EV に内包される miRNA が周辺細胞への伝播を介して、癌細胞の生存、浸潤、血管新生、転移ニッチ形成に関与することが報告されている。骨転移性乳癌細胞由来 EVs の添加により、骨髄細胞の破骨細胞分化促進、破骨細胞のアポトーシス抑制がみられたことから、内包される miRNA の関与が考えられた。そこで、EVs に内包される miRNA のアレイ解析を行い、特異的 miRNA の同定を試みた。その結果、骨転移性乳癌細胞由来 EVs 中において、特異的発現上昇をみる miRNA10 種の同定に成功した(Fig. 5)。

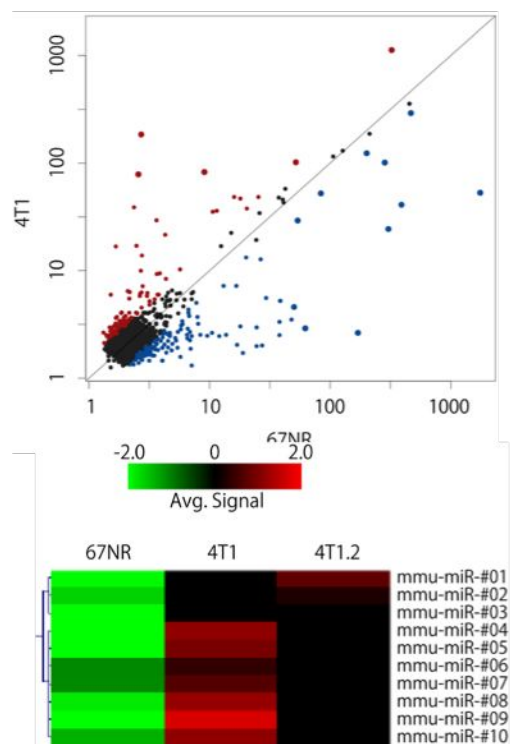
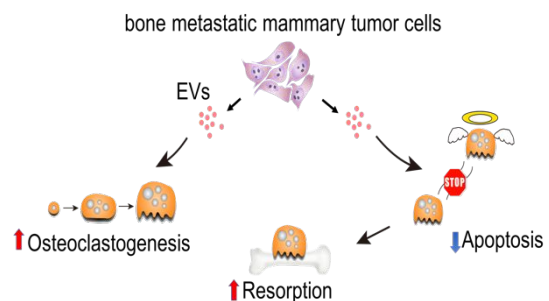


Fig. 5 骨転移性乳癌細胞由来 EVs に内包される miRNA の網羅的解析

以上の結果より、骨転移性乳癌細胞由来 EVs は破骨細胞の分化・骨吸収能および生存促進効果を有する新規細胞間コミュニケーションツールとして機能することが示唆された。



## 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 1件)

Norihisa Uehara, Akiko Kukita, Yukari Kyumoto, Takayoshi Yamaza, Hisataka Yasuda, Toshio Kukita,

Osteoblast-derived Laminin-332 is a novel negative regulator of osteoclastogenesis in bone microenvironments, *Laboratory Investigation*

(2017) **97**,1235-1244

〔学会発表〕(計 7件)

1. 上原 範久, 久本 由香里, 久木田 明子, 久木田 敏夫, 骨転移癌細胞-破骨細胞間コミュニケーションツールとしてのエクソソームの役割, 日本解剖学会, 2018.03.
2. 上原 範久, 久木田 明子, 久本 由香里, 保田 尚孝, 久木田 敏夫, ラミニン-332は骨芽細胞で発現し、破骨細胞形成を負に制御する, 歯科基礎医学会, 2017.09.
3. 上原 範久, 久本 由香里, 久木田 明子, 久木田 敏夫, Extracellular vesicles from bone metastatic mammary tumor cells facilitate osteoclast formation and bone resorption in vitro. 日本骨代謝学会, 2017.07
4. 上原 範久, 久木田 明子, 久本 由香里, 保田 尚孝, 久木田 敏夫, ラミニン-332の骨芽細胞での発現と破骨細胞分化制御, 日本解剖学会, 2017.03.
5. 上原 範久, 久本 由香里, 久木田 明子, 久木田 敏夫, 骨転移性乳癌細胞由来エクソソームを介した破骨細胞分化制御メカニズム, 日本分子生物学会, 2016.12.
6. 上原 範久, 久本 由香里, 久木田 明子, 久木田 敏夫, Metastatic mammary tumor-derived exosomes promote osteoclast differentiation, 日本骨代謝学会, 2016.07.
7. 上原 範久, 久本 由香里, 久木田 明子, 久木田 敏夫, 分泌型 miRNA を介した骨転移性癌細胞-破骨細胞間コミュニケーション, 日本解剖学会, 2016.03.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

上原 範久 (UEHARA NORIHISA)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 30368211

### (2)研究分担者

久本 由香里 (KYUMOTO YUKARI)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 40729026

### (3)研究分担者

久木田 明子 (KUKITA AKIKO)

佐賀大・医学部・准教授

研究者番号: 30153266

### (4)研究分担者

久木田 敏夫 (KUKITA TOSHIO)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号: 70150464