

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16692

研究課題名(和文)エクソソームによる骨肉腫の転移メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of the metastatic mechanism of osteosarcoma by exosomes

研究代表者

古田 太輔(Taisuke, Furuta)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：30781645

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):骨肉腫の転移、増殖に関与すると推測されたmiRNA143,miRNA26a,miRNA26aを解析により選抜した。これらをMSCエクソソームにトランスフェクションして過剰発現させたエクソソームを骨肉腫モデルに単独投与するも有意差を出すことが出来なかった。今後は2種類または3種類投与することにより効果を発揮する可能性があるかを検討していく予定である。
またmiRNA26,miRNA23のノックアウトマウスを作成できたので、これらを用いて骨肉腫との関係について検討を続けていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫治療は未だに、化学療法の奏功不十分な症例、転移や再発症例の生存率が約20%未満である。そのため化学療法だけでなく、エクソソーム、miRNAを解析することによりさらなる治療、腫瘍マーカーの発見により生存率の向上に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文):We selected miRNA143, miRNA26a, miRNA 23a which may be associated with the metastasis and growth of osteosarcoma. After transfection each miRNA into MSC, we collected each MSC derived exosome which was extracted from MSC and administrated these exosomes into mice model of osteosarcoma.However, there was not the significant difference.We will administrate exosomes which mixed two kinds or more and investigate effects to the osteosarcoma mice model in future.On the other hand, we are going to continue examining the relations between osteosarcoma with miRNA26, miRNA23 using miRNA26 or miRNA23 knockout mice.

研究分野：整形外科 骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 エクソソーム miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍の転移を予測する腫瘍マーカーはまだほとんどない。近年、腫瘍から放出されるエクソソームが転移に関与していると報告され、注目が集まっている。エクソソームに注目して研究してきた。そこで我々は悪性骨軟部腫瘍から放出されるエクソソームを解析し新しい転移予測因子を発見することを計画した。さらに我々は Mesenchymal stem cell(以後 MSC)由来エクソソームには組織再生に関与していることを検証してきたが、体内環境の恒常性維持機能も有しているのではないかと推測した。そこで MSC 由来エクソソームが悪性骨軟部腫瘍の転移を予測、または抑制できるかを検討することを計画した。

2. 研究の目的

MSC 由来エクソソームが悪性骨軟部腫瘍、特に骨肉腫の転移のメカニズムに関与しているか解明すること

3. 研究の方法

まずは悪性腫瘍(骨肉腫細胞)から放出されるエクソソームを解析した。我々の研究では、タンパクレベルでは Hoshino らが報告している接着因子であるインテグリン(Hoshino A et al; Nature vol 527 329-335, 2015)や成長因子、さらに miRNA について骨肉腫細胞株 143B や HOS の細胞内とエクソソーム内と MSC、MSC 由来エクソソーム内の解析を行った。

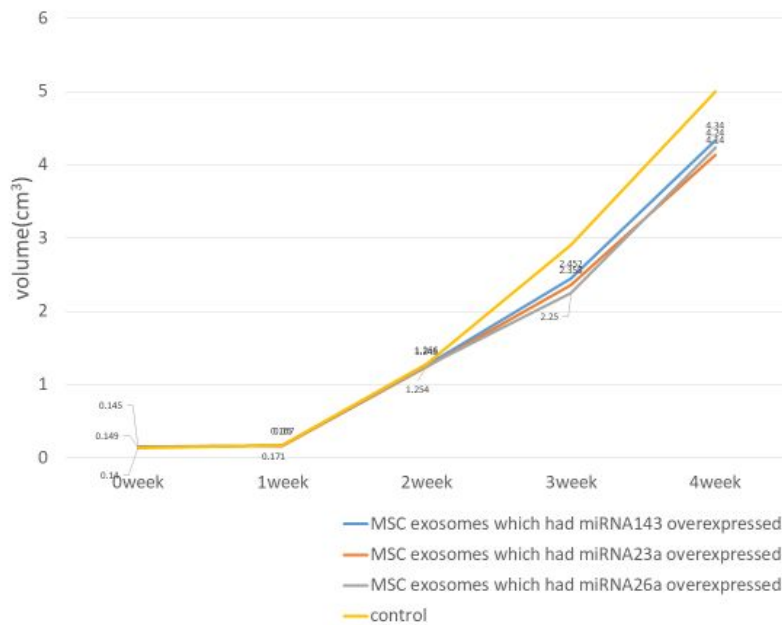
接着因子や成長因子の解析においてどれも差を見つけるとが我々のデータではなかった。一方で miRNA143(Shimbo K et al; Biochem Biophys Res Commun. 2014 Mar 7;445:381-7)がダウンレギュレーションされていたが、新たな因子としては miRNA23a, miRNA26a のダウンレギュレーションを確認し、これらの miRNA に焦点をあてて vivo の実験を行った。まず骨肉腫細胞株 143B; 1×10^4 個をヌードマウスの右背部に注射し、骨肉腫モデルを作成する。注射後 3 週目より腫瘤として確認できるようになるため、time:0week とした。MSC エクソソームの投与を開始する。MSC エクソソームは MSC を 1×10^5 個にそれぞれの miRNA143、miRNA23a、miRNA26a、siRNA をトランスフェクションして 48 時間無血清培地で培養し、その培養上清液を採取して超遠心(110000 g、70 分、4℃)を行い、沈殿したものをエクソソームとして回収する。さらにエクソソームマーカーを用いて採取が出来ているかを確認する。これらを time:0week から尾静注を週に 2 回投与開始して腫瘍のサイズ、転移率を調査した。

4. 研究成果

骨肉腫の転移、増殖に関与すると推測された miRNA143, miRNA23a, miRNA26a を解析により選抜した。表のごとく MSC 細胞または MSC エクソソーム内の miRNA 解析を行った。骨肉腫細胞株 143B、HOS は MSC 細胞またはエクソソーム内と比較するとこれらの 3 つがダウンレギュレーションされていた。

Gene Name	143B cell	143B exo	HOS cell	HOS exo	Adipo cell	Adipo exo	MSC cell	MSC exo
hsa-miR-143-3p	1.07	5.01	2686.85	692.52	7664.33	1455.73	3352.8	194.39
hsa-miR-26a-5p	1691.98	671.44	1918.91	659.86	2761.19	852.13	2686.55	1173.51
hsa-miR-23a-3p	5690.42	3191.83	3379.7	2930.16	9155.94	3981.69	10475.86	3506.14

これらを MSC エクソソームに各 miRNA をトランスフェクションして過剰発現させたエクソソームをそれぞれ骨肉腫モデルに静脈注射を Hoshino らの方法に準じて行った。



上図のように腫瘍の増大傾向はコントロールよりもいずれも少し抑制されているが、有意差を認めなかった。同様に肺転移率も変わらなかった。

全体的に単独投与それぞれ 4week での腫瘍サイズがコントロールに比べると小さいため、現在は 2 種類または 3 種類の組み合わせにより相乗効果があるのではないかと追跡調査を行っている。

また miRNA26, miRNA23 のノックアウトマウスを作成できたこともあり、これらを用いて骨肉腫との関係について検討を続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----