

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09522

研究課題名(和文) 骨細胞を基軸とした骨吸収トリガーエクソソームの探索と骨破壊制御への展開

研究課題名(英文) Bone metastatic breast cancer cell-derived extracellular vesicles block osteoblast mineralization through MAPK signaling

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：すべて細胞から分泌される約100nm前後の小胞(細胞外小胞：EV)は、周辺細胞や遠隔細胞へ伝搬することで細胞機能の調節や様々な病態プロセスに関与する。本研究では、骨転移性乳癌細胞由来EVが、骨形成を担う骨・骨芽細胞への伝搬を介して、それらの分化および石灰化を著しく抑制することを明らかにした。また、その分子機序として、細胞内シグナル伝達に重要なタンパクであるMAPキナーゼの活性化抑制を介することを示唆する結果を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨転移性乳癌細胞由来細胞外小胞(EV)が、骨芽細胞の石灰化を著しく抑制することを見出し、その分子機序としてMAPキナーゼ活性化抑制を介していることを明らかにした。この発見は、骨転移に伴う骨破壊の制御メカニズムにおける、骨転移性乳癌細胞由来EVの機能の新たな発見に加え、EVをターゲットとした骨破壊のマーカー探索への応用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 osteoblast differentiation and mineralization. Treatment of MC3T3-E1 and ST2 osteoblastic cells with mouse bone metastatic (4T1) mammary tumor cell-derived EVs (4T1-EV) inhibited mineralization, which associated with the decreased in the expression of ATF4. 4T1-EV treatment attenuated the activation of ERK, JNK and p38MAPK phosphorylation in ST2 cells. Our results demonstrate the implication of 4T1-EV-mediated osteoblast maturation and mineralization through MAPK pathways.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞外小胞 骨細胞 骨芽細胞 破骨細胞 骨転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより保たれている。過剰な破骨細胞の形成や機能亢進ならびに骨形成低下によるバランスの破綻が骨粗鬆症や炎症性骨破壊などの骨疾患の要因となっていることから、これら破骨細胞・骨芽細胞の分化・活性を制御することは、骨疾患の成立・進展抑制戦略における重要な課題の一つである。

細胞外小胞 (extracellular vesicle : EV) は、エクソソームやマイクロベジクルなどの細胞から分泌される様々な大きさの小胞である。内包される microRNA (miRNA) やタンパク質などの情報伝達物質が、周辺細胞や遠隔細胞へ伝搬することで細胞機能の調節や様々な病態プロセスに関与する。最近の研究で、破骨細胞や骨芽細胞から分泌されるエクソソームに、RANKL、エフリン A2、セマフォリン 4D、miR-214 等の骨代謝を制御する重要な分子群が内包されていることが報告され (Holliday et al., *Orthod Craniofac Res.* 2017)、骨代謝疾患における診断、治療のターゲットとして注目されている。申請者は、骨転移性乳癌細胞由来エクソソームと内包される miRNA が、破骨細胞のアポトーシスを抑制することで骨吸収を亢進させることを明らかにした (基盤(C) 15K11014)。しかしながら、骨転移性癌細胞由来 EV の骨代謝細胞間相互作用の実態については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、骨転移性乳癌細胞由来 EV の骨細胞および骨芽細胞の分化・機能への影響を検討し、さらにそれら細胞の感受・応答として分泌される細胞外小胞に着目し、網羅的解析によるバイオマーカーの創出を行い、破骨細胞とのコミュニケーションツールとしての役割と新たな骨吸収制御法開発に向けた分子基盤解明を目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 細胞株

マウス非転移性乳癌細胞株 67NR およびマウス骨転移性乳癌細胞株 4T1 はそれぞれ Karmanos Cancer Institute、Peter MacCallum Cancer Center より入手した。マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (MC3T3-E1) 及びマウス骨髄間質細胞 (ST2) は理研 BRC より入手した。

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. 細胞増殖の解析

E1 および ST2 細胞増殖に対する細胞外小胞の影響は、CCK-8 assay kit (Dojin) を用いて行った。96-well プレートへ 3×10^3 個の細胞を播種し、細胞外小胞 (100 ng/ml) を添加後、CCK-8 を用いて細胞増殖アッセイを行った。

3-4. real time PCR

total RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて調製した後、SuperScript VIL0 (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) 行った。mRNA 発現は、比較 Ct 法により定量化した。

3-5. ELISA assay

E1 および ST2 細胞の RANKL および OPG 分泌は ELISA 法を用いて検討した。細胞はビタミン D3 (10^{-8} M)、デキサメタゾン (10^{-7} M) および細胞外小胞 (100 ng/ml) を含む培地で 24 時間培養を行い、培養上清を回収した後 Quantikine ELISA kit (R&D systems) を用いて定量化を行った。

3-6. アリザリンレッド染色

E1 および ST2 の成熟化は、アリザリンレッド染色により評価した。E1 および ST2 細胞は、グリセロリン酸 (10 mM)、アスコルビン酸 (50 µg/ml) および細胞外小胞 (100 ng/ml) を含む培地で、それぞれ 14 および 21 日間培養を行った。10%ホルマリンで固定後、アリザリンレッド S 染色液を用いて染色をおこない石灰化の評価を行った。

3-6 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

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

非骨転移性性乳癌細胞(67NR)および骨転移性乳癌細胞(4T1)の培養上清より単離したEV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-EV)および4T1由来細胞外小胞(4T1-EV)のいずれも粒子径に有意な差はなく、それぞれ 125.2 ± 70.5 nm と 134.3 ± 85.6 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)。

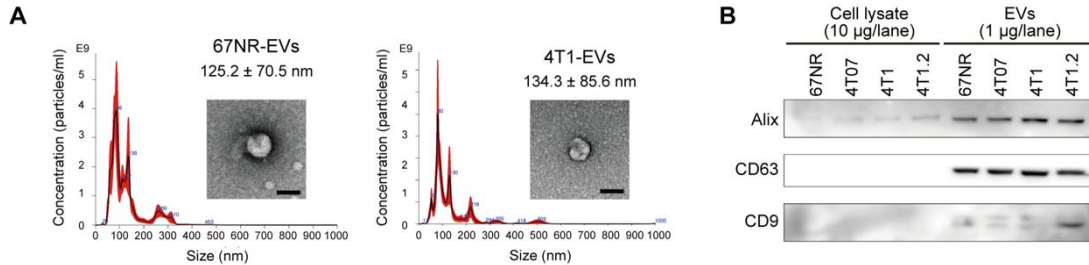


Fig.1 乳癌細胞由来EVのキャラクタリゼーション

4-2 骨転移性乳癌細胞由来EVのRANKL・OPG発現に及ぼす影響

MC3T3-E1 および ST2 細胞を用い、EV 刺激後の RANKL、OPG 発現変化を real time-PCR および ELISA により検討した。

MC3T3-E1 および ST2 細胞へのビタミン D3 およびデキサメタゾン刺激により RANKL 遺伝子およびタンパク分泌の顕著な上昇と OPG 遺伝子および蛋白分泌の低下が確認されたが、67NR-EV および 4T1-EV の存在下でも、それら遺伝子、タンパク発現への影響はみられなかった (Fig.2)。

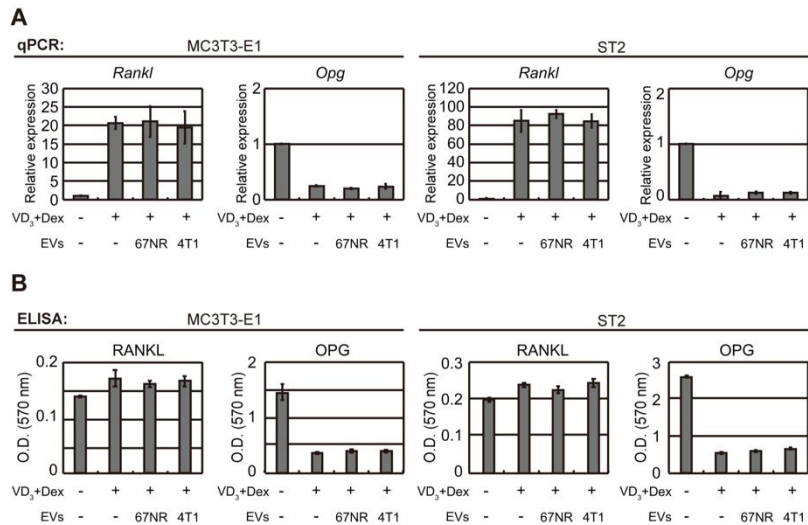


Fig.2 乳癌細胞由来EVのRANKL/OPG発現に及ぼす影響

4-3 骨転移性乳癌細胞由来EVの細胞増殖に及ぼす影響

MC3T3-E1 および ST2 細胞増殖に対する細胞外小胞の影響は、CCK-8 assay kit を用いて行った。その結果、67NR-EV 刺激による細胞増殖への影響はみられなかったが、4T1-EV 刺激では、いずれの細胞においても増殖促進効果が認められた (Fig. 3、MC3T3-E1; data not shown)。

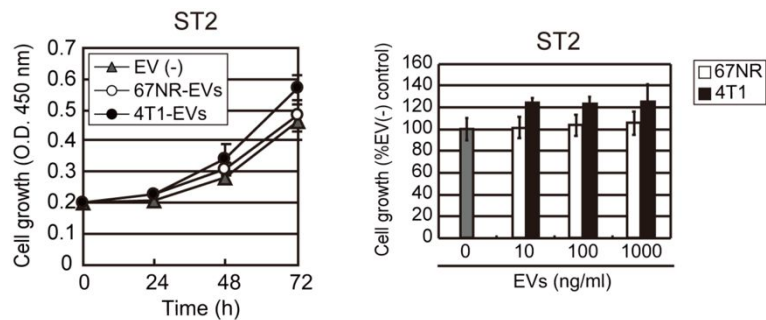


Fig.3 乳癌細胞由来EVの細胞増殖に及ぼす影響

4-4 骨転移性乳癌細胞由来 EV の骨芽細胞分化・石灰化に及ぼす影響

骨転移性乳癌細胞由来 EV の MC3T3-E1 および ST2 細胞の分化・石灰化への影響は、アリザリンレッド染色および real time-PCR 法により検討した。骨芽細胞分化誘導において、67NR-EV による石灰化への影響はみられなかったが、4T1-EV 存在下では顕著な石灰化の抑制が観察された。4T1-EV による石灰化抑制において、骨芽細胞分化に関わる重要な転写因子である Runx2、Osx 遺伝子発現の顕著な低下がみられ、さらに成熟に重要な転写因子である ATF4 の顕著な発現低下が確認された。(Fig. 4)

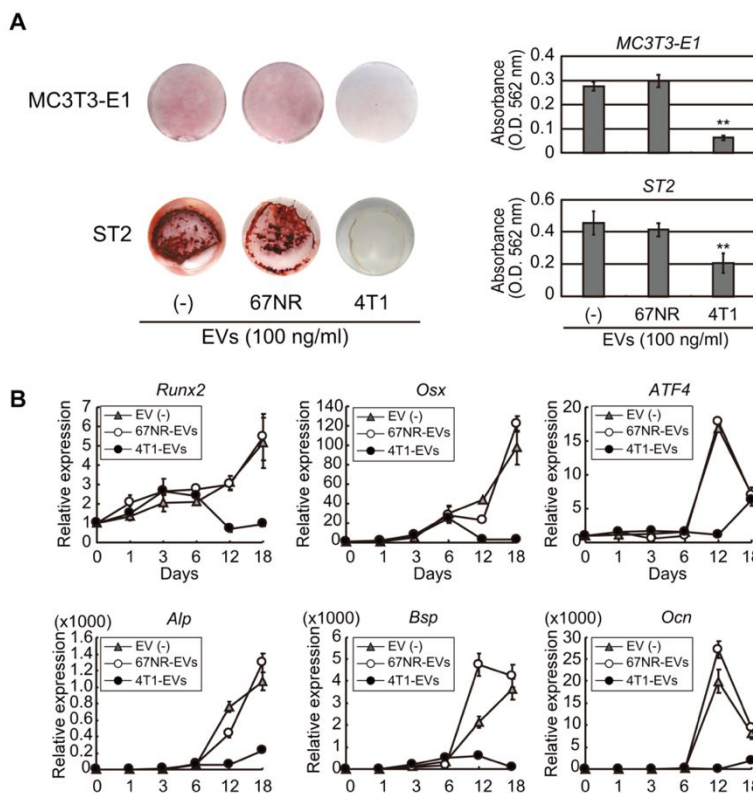


Fig. 4 骨転移性乳癌細胞由来EVの石灰化および骨分化マーカー発現に与える影響

4-5 転移性乳癌細胞由来 EV の MAP キナーゼシグナルに及ぼす影響

次に、4T1-EV による骨芽細胞石灰化抑制の分子メカニズム解明のため、骨芽細胞分化、成熟に関わる重要な細胞質内シグナル伝達経路である mitogen activated protein kinase (MAPK) シグナル (ERK、JNK、p38MAPK) に注目し、それらシグナルの活性化に及ぼす影響を Western blot 法により検討を行った。興味深いことに、骨芽細胞分化刺激後の ERK、JNK、p38MAPK のリン酸化亢進が、4T1-EV 存在下では顕著に抑制された (Fig. 5)。

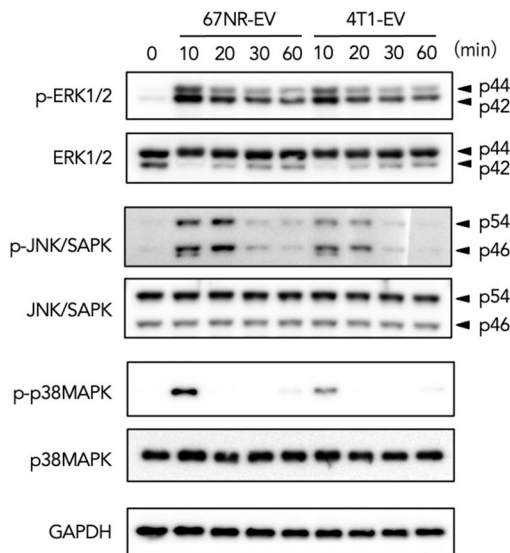


Fig. 5 骨転移性乳癌細胞由来EVのMAPキナーゼシグナルへの影響

以上の結果から、4T1-EV は MAPK シグナルの調節を介して骨芽細胞成熟を制御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可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Norihisa Uehara, Yukari Kyumoto, Akiko Kukita, Toshio Kukita
2. 発表標題 Breast cancer cell-derived extracellular vesicle-mediated transfer of miRNAs regulates osteoclast function
3. 学会等名 Cutting Edge of Bone and Mineral Research (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原 範久、久本 由香里、久木田 明子、久木田 敏夫
2. 発表標題 骨転移性乳癌細胞由来細胞外小胞に内包されるmicroRNAと破骨細胞間コミュニケーション
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原範久、久本由香里、久木田明子、山座孝義、久木田敏夫
2. 発表標題 骨転移性乳癌細胞由来細胞外小胞を介した破骨細胞制御
3. 学会等名 日本解剖学会第74回九州支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁澤 伸英、上原範久、久本由香里、久木田敏夫
2. 発表標題 骨転移性マウス乳癌細胞由来細胞外小胞の癌細胞 - 骨芽細胞間コミュニケーションにおける役割
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

〔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
連携研究者	久木田 敏夫 (Kukita Toshio) (70150464)	九州大学・歯学研究科・教授 (17102)	
連携研究者	久本 由香里 (Kyumoto Yukari) (40729026)	九州大学・歯学研究科・助教 (17102)	
連携研究者	三上 剛和 (Mikami Yoshikazu) (80434075)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------