

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18529

研究課題名（和文）破骨細胞に影響を与える骨肉腫細胞由来エクソソーム内分子の解明

研究課題名（英文）Identification of molecules that suppressed osteoclastogenesis in extracellular vesicles derived from osteosarcoma cells

研究代表者

荒木 麗博 (Yoshihiro, Araki)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10800625

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：骨肉腫の発生した骨微小環境において破骨細胞の分化が抑制されており、その機序として骨肉腫細胞由来エクソソーム内分子miRNA146a-5pが、前破骨細胞内のTRAF6の生成を抑制する結果、NF- κ B経路の蛋白のリン酸化が抑制され、その下流で転写因子NFATc1の働きも抑制されるために前破骨細胞の融合が阻害されることを見出した。

患者の生検組織で破骨細胞の分化が抑制されているほど、化学療法の有効性が乏しいため予後不良となりやすく、in vivoでエクソソーム分泌に関わるTSG101遺伝子をノックアウトした骨肉腫細胞のマウス移植実験で、腫瘍周囲の破骨細胞の分化が維持され、肺転移が減少することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、骨肉腫の進展に細胞外小胞が深く関与しており、その産生を抑えることで、腫瘍の浸潤・転移を抑えることができる可能性が示されました。今後、骨肉腫の早期発見や予後診断、新たな治療法の開発へと研究が進展することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：In an orthotopic implantation study, we found that osteosarcoma-derived SEVs had the potential to enhance metastases and angiogenesis. In addition, osteosarcoma derived SEVs decreased the number of mature osteoclasts in vivo. In vitro osteoclastogenesis studies revealed that the inhibition of osteoclast maturation by osteosarcoma derived SEVs was mediated by suppressing the NF- κ B signal pathway. MicroRNA analysis of SEVs from different malignant human osteosarcomas revealed that miR-146a-5p was involved in the inhibition of osteoclastogenesis. In osteosarcoma patients, lower numbers of osteoclasts in biopsy specimens were correlated with higher malignancy. These findings indicated that osteosarcoma-derived SEVs enhance distant metastasis of osteosarcomas by inhibiting osteoclast maturation, which may be a useful prognostic marker. This diagnostic method may enable to predict malignancy at early stage, and help to provide optimal care to patients with risk of high malignancy.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 破骨細胞 エクソソーム マイクロRNA 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は小児から AYA 世代に好発する原発性悪性骨腫瘍である。上皮系腫瘍の癌と同様に、肺などへの遠隔転移が生存に大きな影響を及ぼし、化学療法が進歩した現代であっても、骨肉腫患者の 5 年生存率は非転移例が 70-80% であるのに対し、転移例ではわずか 10-20% と非常に低い。すなわち、転移を予防することが患者の長期生存につながるため、近年、腫瘍が転移をきたす前の原発巣周囲の微小環境の変化の解明が生存率の改善に重要と考えられている。

腫瘍の浸潤や転移に関わる分子として、腫瘍が分泌する細胞外小胞、特にエクソソームとよばれる 30-150nm の小さな細胞外膜小胞が近年、注目を集めている。エクソソームはその膜及び内部にタンパクや RNA、DNA などをも有し、それらを運搬することで原発巣周囲の細胞だけでなく、遠隔細胞へも情報伝達が可能である。多くの癌腫において、腫瘍細胞由来エクソソームが腫瘍周囲の微小環境を変化させ、血管新生や転移などを促していることが報告されているが、骨肉腫細胞由来エクソソームが骨微小環境や転移に及ぼす影響についてはいまだ不明である。

2. 研究の目的

骨肉腫細胞由来エクソソームによる破骨細胞への影響及び肺転移との関係を解明し、その原因となっているエクソソーム内の分子の同定を行うことである。

3. 研究の方法

(1) in vivo 実験において骨肉腫におけるエクソソームの役割の解明

エクソソームの分泌・排出を制御する分子のひとつである TSG101 遺伝子を knock out したマウス骨肉腫細胞 (LM8KO 細胞株) を樹立し、Wild type のマウス骨肉腫細胞 (LM8WT) との性質の違いを、腫瘍移植マウスにおいて腫瘍の性質の変化及び肺転移の量の変化、腫瘍周囲の骨組織の変化を組織学的に評価し、また生存率を Kaplan-Meier 曲線で評価する。

(2) in vitro 実験において骨肉腫由来エクソソームの破骨細胞への影響の解明

マウス骨肉腫細胞 (LM8 細胞株) 由来エクソソームを添加したマウス由来破骨前駆細胞 (マクロファージ) の破骨細胞への分化がどうかを評価する。TRAP 染色により破骨細胞の分化の程度を顕微鏡及びソフトウェアを使用して解析する。また前破骨細胞内の分子への影響を qRT-PCR 及び Western blot にて確認する。

(3) 患者検体 (治療前の生検組織) における破骨細胞の分化と予後の関係

原発性骨肉腫患者全 70 人の治療前の生検組織における CathepsinK 陽性の分化した破骨細胞の数と、化学療法の効果、転移や予後との関係を後ろ向きに調査する。

(4) 骨肉腫細胞由来エクソソーム内 miRNA の全網羅的解析

悪性度の異なる 2 種類のヒト骨肉腫細胞 (低悪性度の HOS 細胞株、高悪性度の 143B 細胞株) を用いて、分泌するエクソソーム内の miRNA をマイクロアレイにて全網羅的解析を行い、含有量の比率を測定する。さらに同定された miRNA を導入した前破骨細胞による破骨細胞への分化の変化を (2) 同様の in vitro 実験にて確認する。

4. 研究成果

(1) LM8 の TSG101 遺伝子ノックアウト細胞株 (LM8KO 細胞株) は野生株 (LM8WT 細胞株) と比べ、腫瘍組織の Ki-67 index の有意な減少及び、CD31、CD34 及び VEGFA の発現の有意な減少を認め、さらに肺転移の数及びその面積においても有意な減少を認めた。さらに LM8KO 細胞株の腫瘍周囲の骨組織では CathepsinK 陽性の破骨細胞の分化が有意に維持されていることが確認された。また LM8KO 細胞株の腫瘍担持マウスの生存率 (n=8) は LM8WT 細胞株の腫瘍担持マウスの生存率 (n=8) と比較して、有意に長かった (p<0.05)。これらのことから、骨肉腫細胞由来エクソソームが骨微小環境で破骨細胞の分化を抑制し、血管新生を促して局所浸潤と、遠隔転移の促進への関与が示された。

(2) in vitro にてマウス骨肉腫細胞 (LM8 細胞株) 由来エクソソームを添加したマウス由来破骨前駆細胞 (マクロファージ) において破骨細胞の分化が抑制されていることを TRAP 染色にて確認した。また破骨細胞分化の転写因子である NFATc1 をはじめ、その下流の DC-STAMP、OC-STAMP、Atp6v02d などの分化誘導分子が有意に抑制されていることを mRNA レベルで qRT-PCR にて確認し、さらに NFATc1 の上流の NF- κ B 経路で NF- κ B 及び I κ B のリン酸化と、その上流の TRAF6 の生成が蛋白レベルで抑制されていることを Western blot で確認した。これらのことから骨肉腫細胞は骨微小環境において、その分泌するエクソソームにより、まず TRAF6 の生成を抑制し、その下流の NF- κ B 経路の蛋白のリン酸化を抑制、さらにその下流の NFATc1 の転写を抑制することによって、破骨細胞の分化を阻害していることを見出した。同様に、ヒト骨肉腫細胞 (143B

細胞株)由来エクソソームを用いた *in vitro* での破骨細胞誘導実験においても、TRAF6 の生成が抑制されていることを Western blot で確認した。

(3) 患者年齢・性別・腫瘍サイズ、部位、治療方法に有意差がないにも関わらず、生検組織内の分化した破骨細胞の数が多い方が、化学療法の有効性を有意に認め、無転移生存率、全生存率もそれぞれ有意に良好な結果であった。

(4) 高悪性度ヒト骨肉腫細胞株の 143B 細胞株由来エクソソーム内に 5 倍以上多く含まれている miRNA16 種類を同定した。その中で、TRAF6 の生成を抑制する分子である miRNA146a-5p が含まれていることを見出した。143B 細胞株由来エクソソーム内に含有される miRNA146a-5p は HOS 細胞株由来エクソソームと比較して有意に多く (qRT-PCR) さらに前破骨細胞に miRNA146a-5p を transfection した細胞は、TRAF6 の発現量は有意に抑制され (qRT-PCR) 破骨細胞分化誘導実験 (TRAP 染色) でもその分化が有意に抑制されていることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshihiro Araki, Hisaki Aiba, Takeshi Yoshida, Norio Yamamoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Tuan D. Nguyen, Kiyo-aki Ishii, Takayuki Nojima, Satoru Takahashi, Hideki Murakami, Hiroyuki Tsuchiya and Rikinari Hanayama	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteosarcoma-Derived Small Extracellular Vesicles Enhance Tumor Metastasis and Suppress Osteoclastogenesis by miR-146a-5p	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 667109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2021.667109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshihiro Araki, Norio Yamamoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Takashi Higuchi, Kensaku Abe, Yuta Taniguchi, Hirotaka Yonezawa, Sei Morinaga, Yohei Asano, Hiroko Ikeda, Takayuki Nojima, Hiroyuki Tsuchiya	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 The number of osteoclasts in a biopsy specimen can predict the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for primary osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80504-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ayhan Yurtsever, Takeshi Yoshida, Arash Badami Behjat, Yoshihiro Araki, Rikinari Hanayama and Takeshi Fukuma	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural and mechanical characteristics of exosomes from osteosarcoma cells explored by 3D-atomic force microscopy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 6661-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshihiro Araki, Norio Yamamoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Takashi Higuchi, Kensaku Abe, Yuta Taniguchi, Hirotaka Yonezawa, Sei Morinaga, Yohei Asano, Hiroyuki Tsuchiya
2. 発表標題 Molecular mechanism for suppression of osteoclastogenesis by osteosarcoma cell-derived extracellular vesicles
3. 学会等名 13th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木麗博、山本憲男、林克洋、武内章彦、三輪真嗣、五十嵐健太郎、樋口貴史、米澤宏隆、森永整、浅野洋平、土屋弘行
2. 発表標題 骨肉腫細胞由来エクソソームが破骨細胞の分化に及ぼす影響とその機序
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒木麗博、山本憲男、林克洋、武内章彦、三輪真嗣、五十嵐健太郎、谷口裕太、米澤宏隆、森永整、浅野洋平、吉田孟史、華山力成、土屋弘行
2. 発表標題 骨肉腫細胞由来エクソソームが破骨細胞の分化抑制に及ぼす分子メカニズム
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木麗博、山本憲男、林克洋、武内章彦、三輪真嗣、五十嵐健太郎、谷口裕太、米澤宏隆、森永整、浅野洋平、吉田孟史、華山力成、土屋弘行
2. 発表標題 骨肉腫細胞由来エクソソームによる破骨細胞の分化抑制に関する分子メカニズム
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨腫瘍の予後診断方法又は予後診断補助方法	発明者 土屋弘行、華山力成、山本憲男、吉田孟史、荒木麗博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021- 77371	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------