

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16357

研究課題名（和文）がん骨転移を引き起こすmicroRNAの探索とliquid biopsyへの応用

研究課題名（英文）Identification of associated microRNAs in bone destruction of breast cancer bone metastasis

研究代表者

川上 洋平（Kawkami, Yohei）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50626570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん骨転移における骨破壊や破骨細胞活性におけるmiRNAの影響を検討した。in vitro, in vivoいずれにおいても、miRNA-16の過剰発現により、乳癌細胞における溶骨性因子の発現が上昇、また破骨細胞分化・活性が上昇し骨破壊が亢進した。miRNA-16は、乳癌骨転移による骨破壊を促進する可能性が考えられた。一方miRNA-133a・223の過剰発現により、乳癌細胞における溶骨性因子の発現が低下し、また破骨細胞分化・活性が低下し、骨破壊が抑制された。これらのmiRNAが、乳癌骨転移の溶骨性病変に対する、新たなバイオマーカーとして早期診断や治療標的として活用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのがん種においてがん細胞が、miRNAやタンパク質を含むエクソソームを放出し、腫瘍産生、がんの進行、遠隔転移に関わる可能性が報告されており“エクソソーム(miRNA)に着目したliquid biopsy”は次世代のがんの診断治療には欠かせない研究分野であると言える。本研究が対象としているいまだ不明な骨転移メカニズムの解明、早期診断、治療への応用という点で、我々が先駆者となりうると確信するとともに研究的・学術的意義が非常に高いと考える。今後のがん治療研究分野において、がん骨転移、骨破壊を診断、制御する事は革新的な領域を創造することになるという点で意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：In the present study, the roles of miRNAs in bone destruction caused by breast cancer metastasis were investigated in vitro and in vivo. Our findings indicate that osteolytic factors derived from breast cancer cells stimulated the osteoclast differentiation and function, and that the effects could be regulated positively by miR-16, but negatively by miR-133a or miR-223. Consistent with these in vitro results, in vivo experiments using a breast cancer bone metastasis animal model demonstrated that miR-16 enhanced bone destruction with increased osteoclast activities; in contrast, miR-133a and miR-223 prevented the destruction with decreased activities. In conclusion, the present study demonstrated that miR-16 may enhance bone destruction caused by breast cancer bone metastasis by promoting osteoclast function via increased expressions of osteoclast differentiation markers and osteolytic factors, while miR-133a and miR-223 may suppress this process.

研究分野：再生医療

キーワード：がん骨転移 エクソソーム miRNA 破骨細胞 骨破壊

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本国民の約半数は何らかのがんにかかると言われており、がんの好発転移臓器である骨転移が増加傾向にある。がん骨転移によって引き起こされる様々な骨関連事象(病的骨折や脊椎転移による麻痺の出現等)は、患者の QOL を著しく低下させる。骨修飾薬などの治療法はあるが十分ではなく、治療開始遅延により予後が不良となる為、早期診断が求められている。がん骨転移の主体となる骨破壊はがん細胞が誘導する破骨細胞活性によって生じることが知られており、これを制御する意義は非常に高い。近年、あらゆる悪性腫瘍においてがん細胞が、miRNA やタンパク質を含むエクソソーム(exosome)を放出し、細胞分化やがん化の制御、腫瘍形成や進行、遠隔転移に重要な役割を担っている可能性が報告されており、がん骨転移及び骨破壊にはがん細胞が分泌するエクソソームに内包された microRNA(miRNA, miR)の関与が示唆されている。miRNA は血液や尿などの体液中に存在しており、低侵襲かつ容易に繰り返し採取可能な liquid biopsy(体液中のがん細胞やその由来成分による悪性腫瘍診断)が注目されている。しかしながら、骨転移のメカニズムは未だ十分には解明されておらず、骨転移をターゲットとした liquid biopsy による診断、治療の報告はない。

(2) がんの中でも、乳癌は女性の罹患するがんの中で発生率・死亡率共に最多である。乳癌の転移巣は半数以上が骨であり、全乳癌患者の 5-6%では診断時すでに骨転移を有すると報告されている。また乳癌骨転移の大半が、骨破壊を伴う溶骨型骨病変を形成することから、乳癌細胞に着目した。本研究では、乳癌細胞株から分泌される培養上清(conditioned medium, CM)中のエクソソームを回収し、エクソソームおよび内包されている miRNA の働きを解析し、エクソソームを介したがん骨転移のメカニズムを明らかにする事、さらに治療として、miRNA を利用した骨転移制御法の開発を目標とした。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、がん骨転移モデルとして使用されている MDA 細胞を用いて、がん骨転移部の骨破壊や破骨細胞活性に寄与する miRNA を同定し、in vitro、in vivo で検討する事で、liquid biopsy に応用できる骨転移の早期バイオマーカーを探索することである。また、エクソソームは内包する物質を安定的に輸送するという細胞間情報伝達機能を有することから、がん骨転移の治療標的である破骨細胞への薬剤輸送(ドラッグデリバリーシステム)としての役割を利用し、骨破壊を抑制する薬剤や核酸を封入させたエクソソームを投与するという新たな治療法の開発も行う。

### 3. 研究の方法

(1) 過去の報告・検討をもとに、miR-16 をがん骨転移促進性 miRNA の候補として、miR-133a、miR-223 を抑制因子として着目した。これら 3 種の miRNA および control として GFP の plasmid を、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 に lipofection 法で導入し、24 時間後に plasmid 導入細胞およびその培養上清(各々 miR-16-CM、miR-133a-CM、miR-223-CM、GFP-CM とする)を回収した。各導入細胞および miR-CM における導入遺伝子の発現と溶骨性因子である receptor activator for nuclear factor- B ligand (RANKL)、interleukin (IL)-1、IL-6、parathyroid hormone-related protein (PTHrP)、tumor necrosis factor (TNF) の発現を Real-time PCR で評価した。

(2) 各 miRNA を導入した培養上清(miR-CM)の破骨細胞活性へ与える影響を検討するため、破骨細胞の前駆細胞である RAW264.7(マウスマクロファージ由来細胞株)を各 miR-CM 存在下で 3 日間培養を行い、破骨細胞分化・活性因子である NFATc1(nuclear factor of activated T-cells)、osteoclast-associated receptor (OSCAR)、3-integrin、cathepsin-K、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)の RAW264.7 での発現を Real-time PCR で評価し、各群で

比較を行った。

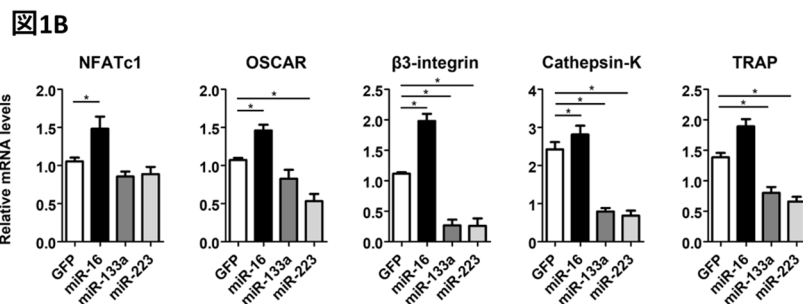
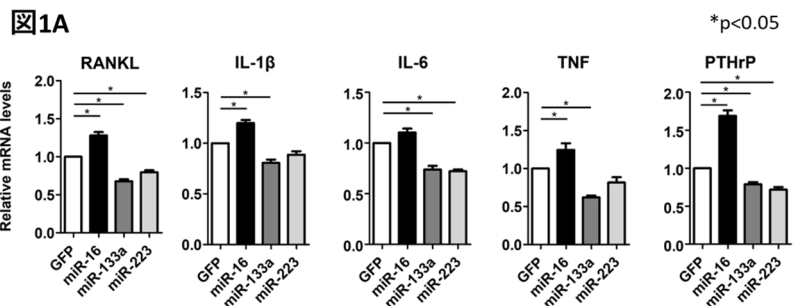
(3) また、前駆細胞である RAW264.7 を RANKL 刺激により成熟破骨細胞へ分化させた後、各 miR-CM 刺激下で培養を行い、2 日後に TRAP 染色を行い破骨細胞の形態を評価した。また、象牙質培地上にて同様に miR-CM 存在下で破骨細胞を培養し、4 日後に形成された骨吸収窩を測定する Bone resorptive assay にて破骨細胞の骨吸収能を定量評価した。

(4) *In vivo* では、各 miRNA の plasmid 導入細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞 /  $10 \mu\text{l}$  PBS) を、がん骨転移モデル動物として実験的に確立されている方法と同様に、5 週齢雌のヌードマウス (Balb/c-nu, CLEA Japan Inc.) の脛骨近位骨端部に移植し、miRNA が骨破壊に与える影響を検討した。4 週後に脛骨組織を回収し、形態学的評価として、骨破壊の程度および骨量 (BV/TV) を  $\mu\text{CT}$  で定量評価した。また組織学的評価として、HE 染色で骨破壊および腫瘍細胞の進展を、TRAP 染色で破骨細胞活性を、免疫組織化学染色で溶骨性因子 (RANKL、IL-1、IL-6、PTHrP、TNF) の発現を評価し、各群で比較を行った。

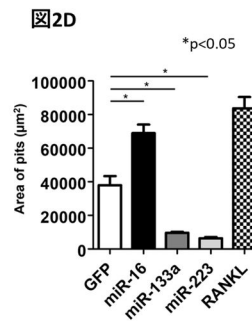
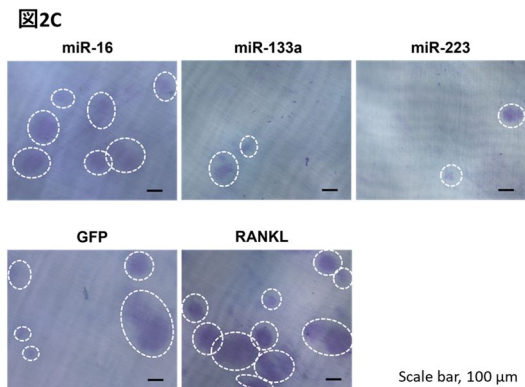
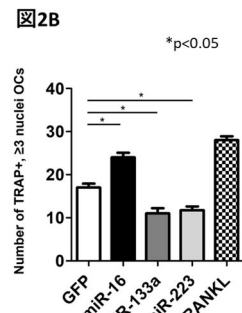
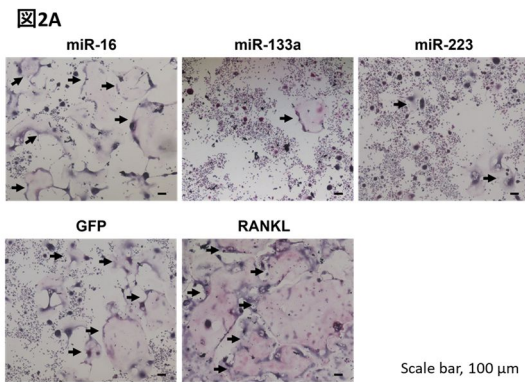
#### 4. 研究成果

##### (1) miR-CM が破骨細胞の分化・機能に与える影響 (*in vitro*)

溶骨性因子である RANKL、IL-1、PTHrP、TNF の培養上清中の発現は、control 群と比較して miR-16 群で有意な増加、miR-133a 群で有意な低下を認めた。また miR-223 群では RANKL、IL-6、PTHrP の発現が有意に低下していた (図 1A)。RAW264.7 における破骨細胞分化・活性因子である NFATc1、OSCAR、 $\beta 3$ -integrin、cathepsin-K の発現は、miR-16-CM 存在下で有意な増加を認めた。miR-133a-CM 存在下では  $\beta 3$ -integrin、cathepsin-K、TRAP の発現が、miR-223-CM 存在下では OSCAR、 $\beta 3$ -integrin、cathepsin-K、TRAP の発現が、それぞれ有意に低下していた (図 1B)。

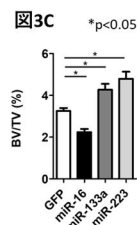
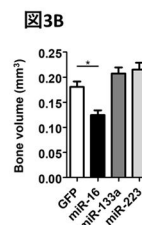
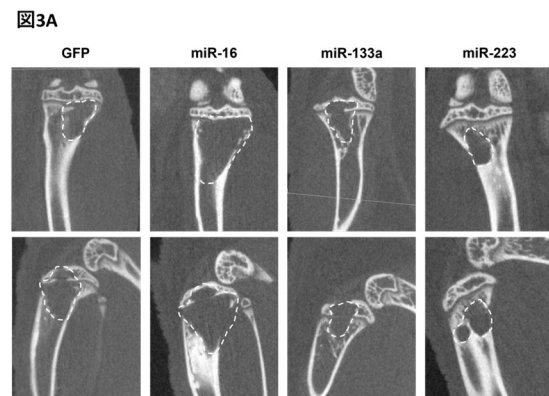


(2) TRAP 染色による検討では、miR-16-CM 存在下で破骨細胞数の有意な増加を認め、positive control 群である RANKL 存在下と同等であった。一方、miR-133a および miR-223-CM 存在下では破骨細胞数は有意に減少していた (図 2A、B)。象牙質培地上で行った骨吸収能評価においても、吸収窩の面積は miR-16-CM 存在下で有意に増加し、miR-133a および miR-223-CM 存在下で有意に減少していた (図 2C、D)。

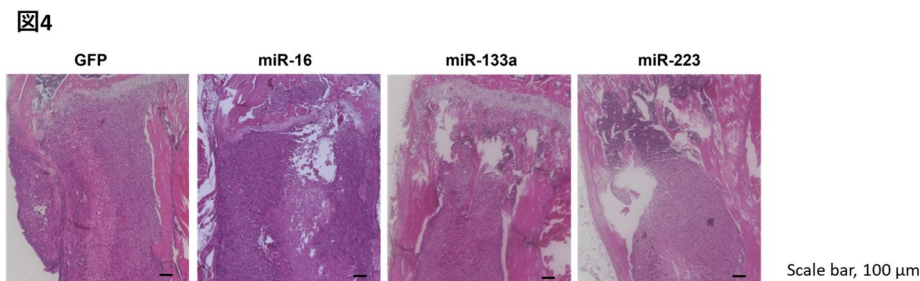


(3) miRNA 導入乳癌細胞による骨破壊の検討 (in vivo)

μCT による脛骨近位の解析では、control 群と比較して miR-16 群で骨量 (Bone volume、BV/TV) は有意に低下、骨破壊が亢進していたが、miR-133a 群および miR-223 群において骨量は有意に増加しており、骨量が維持されていた (図 3A、B、C)。



HE 染色では、miR-16 群において骨破壊を伴う乳癌細胞の浸潤が広く観察されたのに対し、miR-133a 群および miR-223 群では同所見がコントロール群と比較して軽度であった (図 4)。



TRAP 染色による破骨細胞数の検討では、in vitro の結果と同様に、コントロール群と比較して miR-16 群で有意に増加、miR-133a 群および miR-223 群では有意に減少していた (図 5A、B)。

図5A

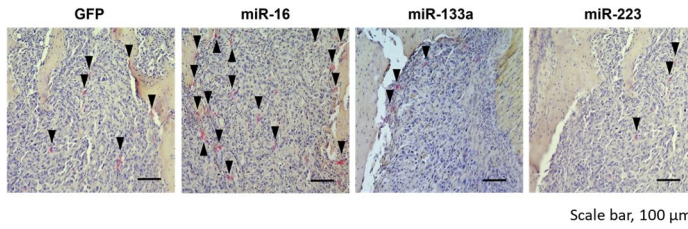
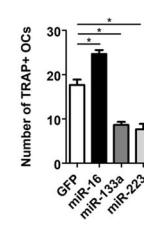


図5B



免疫組織化学染色では、溶骨性因子である RANKL、IL-1、IL-6、TNF、PTHrP は miR-16 群において強く染色され、陽性細胞数の有意な増加を認めた。一方、miR-133a 群および miR-223 群ではコントロール群と比較して陽性細胞数は有意に減少していた(図 6A、B)。

図6A

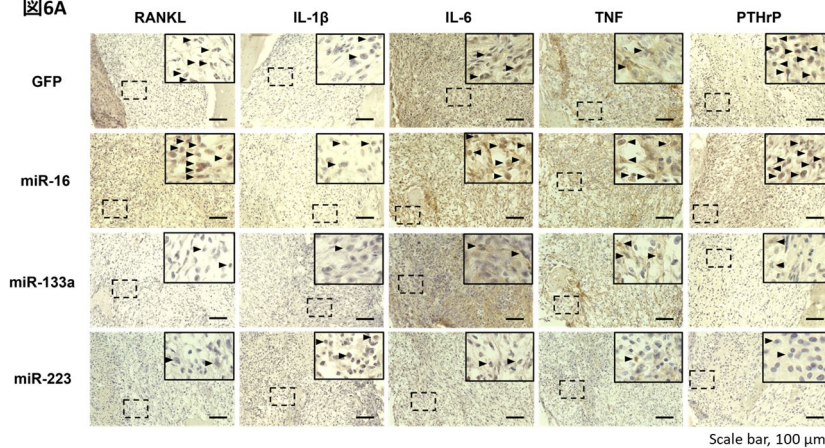
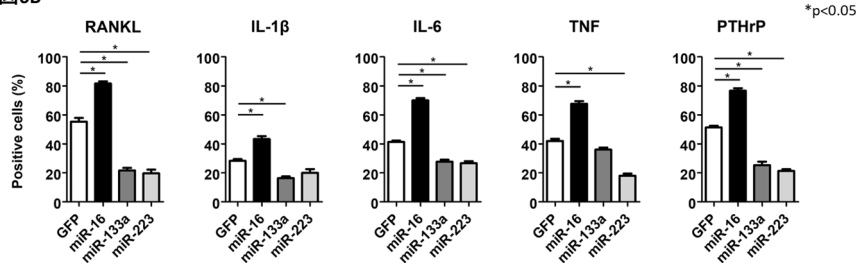


図6B



(4) 本研究における *In vitro* の検討では、乳癌細胞の培養上清中の溶骨性因子である RANKL、IL-1、IL-6、PTHrP、TNF の発現は miR-16 群で増加し、miR-133a 群および miR-223 群で低下していた。また破骨細胞の前駆細胞である RAW264.7 を用いた検討では、破骨細胞分化・活性因子である NFATc1、OSCAR、 $\alpha$ 3-integrin、cathepsin-K、TRAP の発現が、miR-16-CM 存在下で増加、miR-133a-CM および miR-223-CM 存在下では低下していた。これらの結果から、乳癌細胞由来の溶骨性因子が破骨細胞の分化・活性を制御し、その効果は miR-16 により促進され、miR-133a および miR-223 により抑制されることが示唆された。*In vitro* の結果と同様に、乳癌骨転移モデルを用いた *in vivo* での検討では、miR-16 群で乳癌細胞における溶骨性因子の有意な発現増加、破骨細胞活性および骨破壊の促進を認めた。一方、miR-133a 群および miR-223 群では乳癌細胞における溶骨性因子の発現が低下し、破骨細胞活性および骨破壊が抑制されており、動物モデルを用いた *in vivo* でも今回検討した miR-16、miR-133a、miR-223 が、乳癌骨転移による骨破壊において、破骨細胞活性を介して制御していることが示された。

(5) 本研究の結果から、miR-16 は溶骨性因子の発現や破骨細胞分化・活性因子の発現増加を介して破骨細胞の機能を増強させることにより、乳癌骨転移による骨破壊を促進する可能性があり、一方 miR-133a および miR-223 はこの過程を抑制することが示唆された。これら 3 つの miRNA は、乳癌骨転移による骨破壊の新たなバイオマーカーや治療標的となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazumichi Kitayama, Teruya Kawamoto, Yohei Kawakami, Hitomi Hara, Toshiyuki Takemori, Shuichi Fujiwara, Shunsuke Yahiro, Tomohiro Miyamoto, Yutaka Mifune, Yuichi Hoshino, Kenichiro Kakutani, Tomoyuki Matsumoto, Takehiko Matsushita, Takahiro Niikura, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue	4. 巻 59(5)
2. 論文標題 Regulatory roles of miRNAs 16, 133a, and 223 on osteoclastic bone destruction caused by breast cancer metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2021.5277	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 北山和道、河本旭哉、原仁美、深瀬直政、川上洋平、竹森俊幸、藤原周一、八尋俊輔、宮本智弘、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 乳癌骨転移における骨破壊に寄与するmiRNAの探索
3. 学会等名 第54回 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北山和道、河本旭哉、原仁美、深瀬直政、川上洋平、竹森俊幸、藤原周一、八尋俊輔、宮本智弘、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 乳癌骨転移による骨破壊に寄与するmiRNAの検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北山和道、河本旭哉、原仁美、深瀬直政、川上洋平、竹森俊幸、藤原周一、八尋俊輔、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 The regulatory roles of miRNAs 16, 133a, and 223 on osteoclastic bone destruction by breast cancer metastasis
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北山和道、河本旭哉、原仁美、川上洋平、竹森俊幸、藤原周一、八尋俊輔、宮本智弘、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 がん骨転移における骨破壊に寄与するmiRNAの探索
3. 学会等名 第53回 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北山和道、河本旭哉、原仁美、川上洋平、竹森俊幸、藤原周一、八尋俊輔、宮本智弘、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 乳癌骨転移における骨破壊に寄与するmiRNAの探索
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北山和道、河本旭哉、原仁美、川上洋平、竹森俊幸、藤原周一、八尋俊輔、宮本智弘、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題 Identification of associated microRNAs in bone destruction by breast cancer bone metastasis
3. 学会等名 ORS (Orthopaedic Research Society) Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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