

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791830

研究課題名（和文）Wnt5aを標的とした悪性黒色腫の新規骨転移治療薬開発研究

研究課題名（英文）Research for developing drug to inhibit malignant melanoma bone metastasis by targeting Wnt5a signaling

研究代表者

鍵谷 忠慶 (KAGIYA TADAYOSHI)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：30405774

研究成果の概要（和文）：

悪性黒色腫が骨へ転移する際、破骨細胞が多数形成されて、骨が浸食される。そこで、破骨細胞の分化・形成についてmicroRNAに注目して研究した。RANKLという破骨細胞誘導因子によって、2倍以上変動した成熟microRNAは52種類あり、このうちmiR-210やmiR-378等は、破骨細胞分化に伴ってその発現が増加し、miR-223やmiR-342-3p等は減少を示した。これらのことから、microRNAは破骨細胞の分化に重要な役割を担っている可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Many osteoclasts are formed and resorb bone, in malignant melanoma metastasizing. Then we investigated expression profiling of microRNAs during osteoclast differentiation. During osteoclast formation stimulated by RANKL, which induces osteoclast differentiation, 52 mature microRNAs varied more than twofold between untreated cells and RANKL treated cells. We observed the time-dependent down-regulation of the microRNAs miR-223 and miR-342-3p during osteoclastogenesis. By contrast, the levels of miR-210 and miR-378 increased. It suggests that many microRNAs play roles in osteoclast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：破骨細胞、microRNA、マイクロアレイ、癌、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、メラノサイトに由来する極めて悪性度の高い腫瘍として知られ、足底、手掌について口腔（特に硬口蓋や上顎歯肉）に好発し、化学療法や放射線療法が奏功しにくく、高い浸潤・転移能をもち、末期には全身臓器に転移する極めて予後不良の疾患である。このため悪性黒色腫では、原発巣の治療のみならず、転移巣の治療が他の悪性腫瘍治療に比して、より重要なポイントとなっている。

悪性黒色腫は、14～45%の高頻度で骨に転移する。癌の骨転移は、溶骨性の骨転移と造骨性の骨転移に大別できるが、悪性黒色腫は前者のタイプである。すなわち、破骨細胞が腫瘍細胞と骨との境界部に多数形成され、活発に骨吸収を行っており、骨転移の中心的役割を担っていると考えられる。このため、破骨細胞による骨吸収をコントロールすることが骨転移治療の鍵となる。

2. 研究の目的

最近、Wnt5aが悪性黒色腫で高発現しており、オートクライン的に作用して細胞運動や浸潤を促進していることが報告された (Bittner et al., Nature, 2000)。Wntは分子量約4万の分泌性糖タンパクで、発生における器官形成や出生後の細胞の分化、増殖を制御している。哺乳類のWntは19種類存在し、いずれも細胞膜上の受容体Frizzled (Fz)に結合し、シグナルを伝達している。我々は、これまでWnt5aノックアウトマウスを用いた解析からWnt5aが切歯歯胚の上皮や間葉の細胞増殖を制御していることを報告した。

この解析の過程で我々は、Wnt5aノックアウトマウスにおいて破骨細胞数が変動している可能性を見出した。骨におけるWntシグナリングは、軟骨細胞の分化と骨芽細胞による骨形成に関与することが報告されている。Wnt5aは軟骨膜に発現し、これを過剰発現すると軟骨細胞の成熟が遅延し、長管骨の短縮が起こる。Fzの共役受容体のLRP5は骨芽細胞に発現しており、 β -cateninを介した経路で骨形成量を制御していると考えられ、LRP5欠損型突然変異は骨粗鬆症を伴う偽神経膠腫症の原因となる。

このように、Wntシグナリングは、軟骨細胞や骨芽細胞において解析されつつある一方で、破骨細胞では未開拓の分野となっている。我々は悪性黒色腫細胞の分泌するWnt5aが破骨細胞の分化を促進し、骨吸収力を上昇させるため、高頻度で骨転移が起こると考えて、「Wnt5aシグナリグを阻害することで悪性黒色腫の骨転移は阻害される。」という作業仮説を立て、この仮説を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、破骨細胞にWntシグナル伝達経路があるかどうかを調べた。マウスマクロファージ細胞株RAW264.7を50ng/mlのRANKL存在下で82時間培養し、破骨細胞を形成させたのち、total RNAを回収した。これをマイクロアレイ解析して、mRNAの発現を網羅的に調べた。また、ddYマウス骨髄細胞を10ng/ml M-CSFと100ng/ml RANKL存在下で5日間培養して破骨細胞へ分化させる系でrecombinant Wnt5aを作用させ、培養終了後にTRAP染色を行い、破骨細胞の数を計測した。

さて近年、悪性腫瘍において microRNA と呼ばれる non-coding RNA の発現パターンが、正常細胞・組織と異なっているという報告が相次いでいる。また、microRNA はエクソソームによって細胞外へ分泌され、他の細胞へ情報伝達をしている可能性が示唆されている。これらの報告から、我々は悪性黒色腫が骨へ転移する際の破骨細胞形成に microRNA が関与している可能性を考えた。そこで、RAW264.7 へ RANKL を作用させて、破骨細胞へ分化させる系を用いて内因性の microRNA の発現変動を解析した。50ng/ml の RANKL を作用させてから 0, 24, 82 時間後に small RNA を含む total RNA を回収し、*c-fos*, *Nfatc1*, *Trap* 等の破骨細胞分化関連遺伝子の発現を PCR で定量し、使用した細胞株の性質を調べると同時に、マイクロアレイ解析によって、成熟 microRNA の発現変動を調べた。また、Target Scan によって microRNA の標的遺伝子を予測した。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析によると、Wnt receptor である Frizzled (Fz)1~10 については、Fz2 が最も強く発現し、Fz 1, 4, 5, 6, 8, 9, 10 も発現していた。また、Fz の共役受容体 LRP5, LRP6, および Ror2 も発現していた。Receptor の存在を確認後、recombinant Wnt5a を作用させたところ、形成された破骨細胞数は、非作用群と比べて約 25%減少した。Wnt は分子量約 4 万の糖タンパクであるが、recombinant Wnt5a では糖鎖修飾等の状態が、野生型と一致するとは限らないという点を考慮し、この結果について、今後更に検討することにした。

さて、RAW264.7 において、RANKL 刺激後 12-24 時間で *c-fos* の発現はピークとなり、82 時間で TRAP 等の発現が著しく上昇して、

成熟した破骨細胞が形成された。この分化過程で、2 倍以上変動した成熟 microRNA は 52 種類あり、このうち miR-210 や miR-378 等は、破骨細胞分化に伴ってその発現が増加し、miR-223 や miR-342-3p 等は減少を示した。また miR-342-3p は、破骨細胞分化にとって重要な *Trap* と *Mitf* を標的遺伝子としている可能性が予測された。これらのことから、microRNA は破骨細胞の分化に重要な役割を担っている可能性が考えられる。

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 3 件)

1. Taira M, Shimoyama Y, Kagiya T, Sasaki M, Nezu T, Harada H, Kimura S. Proteome analyses of human macrophages exposed to low cytotoxic IC90 copper (2+) ions. *Dent Mater J.* 2011; *in press*
2. Taira M, Kagiya T, Harada H, Sasaki M, Kimura S, Narushima T, Nezu T, Araki Y. Microscopic observations and inflammatory cytokine productions of human macrophage phagocytising submicron titanium particles. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21:267-275
3. Taira M, Kagiya T, Sasaki M, Sasaki K, Saitoh S, Nezu T, Harada H, Kimura S, Araki Y. First-stage Genome-Wide Gene Expression Analyses of Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to IC50 Ni (2+) ions. *J Oral Tissue Eng.* 2009; 7(2):107-120

[学会発表] (計 10 件)

1. 安藤禎紀、鍵谷忠慶、藤村朗：ヒト遊離歯肉下口腔上皮下リンパ管構築 第 116 回日本解剖学会全国学術集会

- 2011年3月29日 (震災のため誌上開催)
2. 鍵谷忠慶、安藤禎紀、藤村朗：破骨細胞分化におけるmicroRNAの関与について 岩手医科大学歯学会第71回例会 2011年2月26日 岩手医科大学 (盛岡市)
 3. 鍵谷忠慶、安藤禎紀、藤村朗：破骨細胞分化におけるmicroRNAの発現解析 日本解剖学会第56回東北・北海道連合支部学術集会 2010年9月25日 旭川医科大学 (旭川市)
 4. 鍵谷忠慶、安藤禎紀、藤村朗、三浦廣行：破骨細胞におけるcalpain-slingshotを介したアクチンリング制御について 第52回歯科基礎医学会学術大会2010年9月22日タワーホール船堀 (東京都)
 5. 安藤禎紀、桑島幸紀、鍵谷忠慶、藤村朗、三浦廣行：Suncus murinus 口腔粘膜下リンパ管構築 -舌- 第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月21日タワーホール船堀 (東京都)
 6. 大津圭史、藤原尚樹、石関清人、鍵谷忠慶、原田英光：間葉系幹細胞と血管内皮細胞との相互作用 第115回日本解剖学会全国学術集会 2010年3月30日 岩手県水産会館 (盛岡市)
 7. 鍵谷忠慶、藤原尚樹、石関清人、原田英光：破骨細胞におけるcalpainによる細胞骨格制御機構について 岩手医科大学歯学会第35回総会 2009年12月5日 岩手医科大学 (盛岡市)
 8. 原田英光、石関清人、大津圭史、鍵谷忠慶、藤原尚樹：ヘルトヴィッヒ上皮鞘形成過程におけるサービカルループでの細胞動態 第51回歯科基礎医学会学術大会 2009年9月11日 朱鷺メッセ (新潟市)

9. 石関清人、大津圭史、鍵谷忠慶、藤原尚樹、原田英光：GFPマウスを用いたメッセル軟骨の形質転換のイメージング解析 第51回歯科基礎医学会学術大会 2009年9月10日朱鷺メッセ (新潟市)
10. 大津圭史、藤原尚樹、石関清人、鍵谷忠慶、佐々木憲明、原田英光：Rhoキナーゼによるエナメル芽細胞の極性制御機構 第51回歯科基礎医学会学術大会 2009年9月10日 朱鷺メッセ (新潟市)

5. 研究組織

(1) 研究代表者

鍵谷 忠慶 (KAGIYA TADAYOSHI)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：30405774

(2) 研究協力者

安藤 禎紀 (ANDO YOSHINORI)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：40583662

藤村 朗 (FUJIMURA AKIRA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：80173459

平 雅之 (TAIRA MASAYUKI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：60179398

藤原 尚樹 (FUJIWARA NAOKI)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：20190100

石関 清人 (ISHIZEKI KIYOTO)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：50057775

原田 英光 (HARADA HIDEMITSU)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：70271210