

# 主論文

## Clinical and Functional Significance of Intracellular and Extracellular *microRNA-25-3p* in Osteosarcoma

(骨肉腫における細胞内・細胞外 *microRNA-25-3p* の臨床的および機能的意義)

### 【緒言】

*microRNA* (miRNA) は、複数の標的遺伝子を持つ 20-25 塩基程度の1本鎖 RNA である。標的遺伝子の 3'側非翻訳領域(UTR)と相互作用し、遺伝子発現の翻訳後調節に関与している。今日まで、多くの疾患において miRNA の調節不全が報告されており、miRNA が発癌性または腫瘍抑制性の機能を有することが示されている。また miRNA は、循環血液中に分泌されることが実証され、腫瘍細胞から分泌されるエクソソームなどの細胞外小胞で検出され、腫瘍微小環境の細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。近年、悪性腫瘍における miRNA や循環型 miRNA の発現異常における様々な知見が蓄積されてきているが、単一 miRNA 発現異常の悪性腫瘍の進展における機能や臨床病理学的意義について明らかになっているものは少ない。

希少がんである骨肉腫は、集学的治療により予後は徐々に改善しているものの、再発や転移により致命的な経過をたどる。我々は以前骨肉腫患者における循環型 *miR-25-3p* を特定し、骨肉腫細胞からの分泌および患者血清中の存在を報告した。本研究では、*miR-25-3p* の細胞内外における機能および組織における発現の臨床的意義を検討することを目的とした。

### 【対象と方法】

#### 臨床検体と生命予後

骨肉腫生検凍結組織より抽出した RNA より、miRNA, mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。また予後との相関を Kaplan-Meier 法により検討した。なお、本研究は本学生命倫理委員会の承認を得ている(研 1509-037)。

#### 細胞株

骨肉腫細胞株: 143B、U2OS、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた。

#### エクソソームの抽出と確認

細胞株培養上清から超遠心法を用いてエクソソームを抽出し、Nanosight および電子顕微鏡、ウエスタンブロットによりエクソソームの形態、特異的タンパク発現を確認した。

#### RT-PCR

細胞株と培養上清および骨肉腫生検凍結組織の mRNA (miRNA を含む)を Qiagen 社製のキットを用いて抽出し、TaqMan プローブを用いて RT-PCR を行った。解析は  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いて行った。

#### ウエスタンブロット

細胞株よりタンパクを抽出し、SDS-PAGE によって分離し、PVDF メンブレンに転写した。1次抗体: 抗 CD9, 81 抗体、 $\beta$ -actin 抗体、抗 Dkk3 抗体、二次抗体: IRDye® 800CW 抗ウサギ IgG、IRDye® 680RD 抗マウス IgG を使用した。

### ルシフェラーゼアッセイ

骨肉腫細胞株に pGL3-Dkk3-3' UTR 通常型または pGL3-Dkk3-3'UTR 変異型とともに *miR-25-3p* を導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

### 血管内皮細胞管腔形成アッセイ

HUVEC 細胞に LNA *miR-25-3p*, *miR-25-3p* を導入し、エクソソーム添加、非添加下で、マトリゲル上で HUVEC 細胞の管腔形成を評価した。

### 細胞増殖・障害アッセイ

骨肉腫細胞株に LNA *miR-25-3p*, *siDkk3* を導入し、ドキソルビシン、シスプラチン、メソトレキセート、ドセタキセルを各濃度で暴露させ、72 時間後に細胞増殖能を測定した。

### 細胞移動・浸潤能アッセイ

骨肉腫細胞株に LNA *miR-25-3p*, *miR-25-3p*, *siDkk3* を導入し、48 時間後に BioCoat マトリゲルインバージョンチャンバーに播き直し、16 時間後に移動した細胞数を測定した。

### 免疫染色

骨肉腫生検パラフィン切片を用いて、抗 *Dkk3* 抗体で免疫染色を行った。

### 統計解析

2群間比較では Student-t test、多群間比較では One-way ANOVA を行った。 Kaplan-Meier 法で生存曲線を作成し、ログランク検定を行った。有意水準は  $p < 0.05$  に設定し、統計解析には SPSS を用いた。

## 【結果】

### 骨肉腫生検組織における *miR-25-3p* の発現は臨床予後と負の相関を示す

当科で治療を行った 45 例における Kaplan-Meier 解析を行った。その結果、骨肉腫生検組織における *miR-25-3p* の発現高値は、全生存率における予後不良と有意に相関し、無転移生存率とも有意に相関した。血清だけでなく組織においても *miR-25-3p* の発現と骨肉腫患者予後は負の関係にあることが示された。

### 骨肉腫細胞における *miR-25-3p* は腫瘍促進的に機能する

Locked nucleic acid (LNA) を用いて *miR-25-3p* 機能阻害を行い、機能解析を実施した。143B, U2OS 細胞株において *miR-25-3p* 発現阻害を確認した後、骨肉腫細胞株に LNA-*miR-25-3p* を導入したところ、腫瘍増殖能・浸潤能は有意に抑制された。さらに、*miR-25-3p* の機能阻害は化学療法抵抗性を改善させることより、細胞内 *miR-25-3p* は骨肉腫に対して促進的な機能を示すことが明らかになった。

### *miR-25-3p* の標的遺伝子である *Dkk3* は骨肉腫進展に抑制的に機能する

*in silico database* を用いて *miR-25-3p* の標的遺伝子を探索し、Wnt- $\beta$  catenin 経路で重要な役割を担う *Dkk3* 分子を特定した。143B, U2OS 細胞株において *miR-25-3p* 発現阻害により *Dkk3* 発現は上昇した。siRNA による発現阻害により、腫瘍増殖能、浸潤能のいずれも *miR-25-3p* 発現阻害と逆の結果を示した。従って、*Dkk3* は腫瘍抑制的に働いていることが明らかになった。

### 骨肉腫生検組織における *Dkk3* の発現は臨床予後と正の相関を示す

*Dkk3* の骨肉腫における臨床病理学的意義を検討するため、骨肉腫 20 例における免疫染色を行った。その結果、全症例の 61% で発現を示し、発現強度の程度により、臨床予後と関連する傾向にあった。次に RT-PCR 法による *Dkk3* 発現について、Kaplan-Meier 法で解析を行った結果、*Dkk3* の発現低値が

患者予後不良と有意に相関した。これらのデータから、骨肉腫組織における *Dkk3* と *miR-25-3p* は臨床病理学的意義において逆相関し、それぞれの骨肉腫細胞における腫瘍促進的および抑制的な機能を反映している可能性が示された。

#### 分泌型 *miR-25-3p* はエクソソームを介して周囲微小環境に作用している可能性がある

骨肉腫細胞から分泌されるエクソソームを抽出し、*Nanosight* およびウエスタンブロットによりその存在を確認した。細胞外 *miR-25-3p* の発現はエクソソーム分画において高値を示し、細胞外における安定性をエクソソームにより獲得している可能性が示唆された。また、骨肉腫細胞由来エクソソームにより血管内皮細胞の管腔形成および浸潤能が促進されることを示し、*miR-25-3p* の導入においても同様の結果が得られた。従って、*miR-25-3p* は細胞外においても周囲環境に作用し、骨肉腫の進展を担っていることが示唆された。

#### 【考察】

様々な悪性腫瘍で細胞内 *miRNA* の発現異常が明らかになり、血中における発現も特定されているが、各癌種において重要な役割を担う *miRNA* の腫瘍進展における全貌を明らかにした報告は極めて乏しい。本研究では患者血清中で高発現している *miR-25-3p* の細胞内外での機能を解明し、臨床病理学的意義も明らかにした。少なくとも肉腫においては初めての報告であり、新規バイオマーカーならびに治療標的としての臨床応用も期待されるデータを示すものである。本研究では、細胞内 *miR-25-3p* 発現異常が増殖能、浸潤能だけでなく、薬剤耐性にも関与していることが明らかになった。従って、薬剤抵抗性を変化させうる *miR-25-3p* は新しい治療標的になる可能性がある。

近年、エクソソームに包含される *miRNA* が癌の遠隔転移の促進的な役割を担うことが示唆されている。本研究では、細胞外 *miR-25-3p* が血管内皮細胞の管腔形成や遊走能を促進させ、血管新生を促進させていることが明らかとなり、周囲環境を変化させ、骨肉腫の腫瘍進展を促進させていることが示唆された。遠隔転移の好発部位である肺の微小環境との関連性の解析により、この *miRNA* の骨肉腫における役割がさらに理解されることだろう。

#### 【結論】

骨肉腫細胞内外の双方における *miR-25-3p* の臨床病理学および機能的意義が明らかになった。*miR-25-3p* は骨肉腫細胞内において腫瘍増殖、浸潤能、薬剤耐性に関与し、腫瘍促進的な役割を担う一方、その標的遺伝子である *Dkk3* は腫瘍増殖、浸潤能に関与し、腫瘍抑制的な役割を担うことが判明した。また、骨肉腫組織における *miR-25-3p* の発現は臨床予後と負の相関関係にあり、*Dkk3* の発現は正の相関関係にあることが示された。さらに、細胞外 *miR-25-3p* はエクソソーム分画に包まれ安定性を獲得し、正常血管内皮細胞の管腔形成および浸潤能を促進させ、微小環境に作用している可能性が示された。これらの結果は、細胞内外の *miR-25-3p* 発現異常が、骨肉腫における新規バイオマーカーおよび治療標的としての臨床的意義を示唆するものである。