Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Regulatory roles of miRNAs 16, 133a, and 223 on osteoclastic bone destruction caused by breast cancer metastasis

北山, 和道

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2022-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8200号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008200

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Regulatory roles of miRNAs 16, 133a, and 223 on osteoclastic bone destruction caused by breast cancer metastasis

乳癌骨転移による骨破壊に対する miRNA-16, 133a, 223 の制御機能

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒田　良祐　教授）

北山　和道

【目的】

乳癌は、女性の罹患する癌の中で発生率・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も言われている。乳癌骨転移の大半が溶骨性転移であることから、様々な骨関連事象を引き起こし、罹患患者の生存率や ADL を低下させるため、そのメカニズムの理解、制御が重要である。骨転移巣における骨破壊は、腫瘍細胞自身ではなく、主に腫瘍細胞に刺激されて活性化した破骨細胞によって引き起こされることが知られている。近年破骨細胞活性において、microRNA（miRNA、miR）の関与が示唆されているが、乳癌骨転移との関連や骨転移巣での破骨細胞活性における miRNA の役割の多くはいまだ明らかとはなっていない。

本研究の目的は、乳癌骨転移巣における骨破壊や破骨細胞活性に miRNA が与える影響を検討することである。

【方法】

miRNA 導入乳癌細胞の培養上清の検討

乳癌や破骨細胞の機能・活性化との関連が過去に報告されている miR-16、miR-133a、miR-223 に着目し、これら 3 種の miRNA およびコントロールとして GFP のプラスミドを、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 にリポフェクション法で導入し、24 時間後にプラスミド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、導入遺伝子と溶骨性因子（RANKL、IL-1β、IL-6、PTHrP、TNF）の発現を qPCR で評価した。

続いて、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（NFATc1、OSCAR、β3-integrin、cathepsin-K、TRAP）の発現を qPCR で評価し、各群で比較を行った。

破骨細胞活性・機能に対する miRNA の影響

RANKL 刺激によって RAW264.7 から分化させた成熟破骨細胞を、miR-CM および RANKL（ポジティブコントロール）存在下で培養し、2 日後に TRAP 染色を行い破骨細胞数を評価した。

また象牙質培地上にて、同様に miR-CM および RANKL 存在下で破骨細胞を培養し、4 日後に形成された吸収窩を測定して骨吸収能を評価した。

骨転移モデルの作成

CLEA Japan 社より購入した 5 週齢雌の BALB/c ヌードマウスの左脛骨近位に、miR-16（n = 6）、miR-133a（n = 6）、miR-223（n = 6）、GFP（n = 6）を導入した MDA-MB-231（1.0×10^6 細胞）を移植して乳癌骨転移モデルを作成し、4 週後に脛骨組織を回収した。

形態学的評価として、骨破壊の程度および骨量（BV/TV）を μCT で評価した。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-1β、IL-6、PTHrP、TNF）の発現を評価し、各群で比較を行った。

統計解析

2 群間の比較は Student's t-test を用いて行い、多群間の比較は one-way ANOVA 検定の後、Tukey's post hoc test を用いて行った。$P<0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

【結果】

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-1β、PTHrP、TNF の培養上清中の発現は、コントロール群と比較して 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。

RAW264.7 における破骨細胞分化・活性因子である NFATc1、OSCAR、β3-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 β3-integrin、cathepsin-K、TRAP の発現が、miR-223-CM 存在下では OSCAR、β3-integrin、cathepsin-K、TRAP の発現が、それぞれ有意に低下していた。

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、miR-133a および miR-223-CM 存在下では有意に減少していた。象牙質培地上で行った骨吸収能評価においても、吸収窩の面積が 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。

miRNA 導入乳癌細胞による骨破壊の検討（*in vivo*）

μCT による脛骨近位の骨量の解析では、コントロール群と比較して miR-16 群で有意に低下、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。

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。

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。

免疫組織化学染色では、溶骨性因子である RANKL、IL-1β、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。

【考察】

がん転移による骨病変は、骨微小環境における骨吸収と骨形成のバランスが崩れることによって引き起こされ、溶骨性病変と造骨性病変の両方を生じうる。乳癌の転移による骨病変の大半は溶骨性病変であるが、これは乳癌細胞由来の溶骨性因子が、破骨細胞の分化や機能を制御しているためであると報告されている。

近年、miRNA が細胞の分化や増殖、アポトーシスなど様々な生物学的プロセスの制御に重要であることが明らかとなっており、miR-16、miR-133a、miR-223 などいくつかの miRNA が、乳癌の進行や転移、破骨細胞の分化や機能に関与している可能性が報告されている。miR-16 は、骨転移を有する乳癌患者での発現や、破骨細胞分化における発現の上昇が報告されている。一方、miR-133a および miR-223 は、破骨細胞分化や乳癌細胞の増殖を抑制する報告が散見されている。

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-1β、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、β3-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。

【結語】

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。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第3132号	氏名	北山 和道
論文題目 Title of Dissertation	Regulatory roles of miRNAs 16, 133a, and 223 on osteoclastic bone destruction caused by breast cancer metastasis 乳癌骨転移による骨破壊に対する miRNA-16, 133a, 223 の制御機能		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 佐々木良平 副査 Vice-examiner 寺井義人 副査 Vice-examiner 伊藤治雄		

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

乳癌は、女性の罹患する癌の中で発生率・死亡率共に最多である。乳癌は骨転移しやすく、また骨転移巣の大半が溶骨性病変であり、様々な骨関連事象によって生存率や ADL を低下させるため、そのメカニズムの理解、制御が重要である。転移巣における骨破壊は、主に破骨細胞が担うが、近年破骨細胞活性において、microRNA（miRNA、miR）の関与が示唆されている。しかし乳癌骨転移との関連や、その役割の多くは明らかではない。今回研究者らは、乳癌骨転移巣における骨破壊や破骨細胞活性に miRNA が与える影響を検討した。

方法

乳癌や破骨細胞との関連が報告されている miR-16、miR-133a、miR-223 に着目し、これら 3 種の miRNA および GFP（コントロール）のプラスミドを、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 にリポフェクション法で導入し、24 時間後に培養上清（miR-CM）を回収し、溶骨性因子（RANKL、IL-1β、IL-6、PTHrP、TNF）の発現を qPCR で評価した。続いて、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（NFATc1、OSCAR、β3-integrin、cathepsin-K、TRAP）の発現を qPCR で評価した。

成熟破骨細胞を各 miR-CM 存在下で培養し、2 日後に TRAP 染色を行い破骨細胞数を評価した。また象牙質培地上にて、破骨細胞を miR-CM 存在下で培養し、4 日後に形成された吸収窩を測定して骨吸収能を評価した。

5 週齢雌の BALB/c ヌードマウスの左脛骨近位に、miR-16（n = 6）、miR-133a（n = 6）、miR-223（n = 6）、GFP（n = 6）を導入した MDA-MB-231（1.0×10^6 細胞）を移植して乳癌骨転移モデルを作成し、4 週後に組織を回収した。

形態学的評価として、骨破壊の程度および骨量（BV/TV）を μCT で評価した。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の発現を評価した。2 群間の比較は Student's t-test を、多群間の比較は one-way ANOVA 検定の後、Tukey's post hoc test を用いて行った。$p<0.05$ を統計学的に有意とした。

結果

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（RANKL、IL-1β、IL-6、PTHrP、TNF）の培養上清中の発現は、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 群で有意に

低下した。RAW264.7における破骨細胞分化・活性因子（NFATc1、OSCAR、β3-integrin、cathepsin-K、TRAP）の発現は、miR-16群で有意に増加し、miR-133a群およびmiR-223群で有意に低下した。TRAP染色および骨吸収能評価において、破骨細胞数および吸収窩の面積はmiR-16群で有意に増加し、miR-133aおよびmiR-223群で有意に減少した。

miRNA導入乳癌細胞による骨破壊の検討（in vivo）

μCTでは、miR-16群で有意に骨量は低下し、骨破壊が亢進したが、miR-133a群およびmiR-223群では骨量は有意に増加し、骨破壊は抑制された。HE染色では、miR-16群において骨破壊が広く観察され、miR-133a群およびmiR-223群では軽度であった。TRAP染色では、破骨細胞数はmiR-16群で有意に増加し、miR-133a群およびmiR-223群で有意に減少した。免疫組織化学染色では、溶骨性因子（RANKL、IL-1β、IL-6、TNF、PTHrP）はmiR-16群で強く染色され、陽性細胞数は有意に増加した。miR-133a群およびmiR-223群で陽性細胞数は有意に減少した。

考察および結論

近年、miRNAが細胞の様々な生物学的プロセスの制御に重要であることが明らかとなっており、miR-16、miR-133a、miR-223などいくつかのmiRNAが、乳癌の進行や破骨細胞の機能に関与している可能性が報告されている。本研究の検討では、乳癌細胞の培養上清中および骨転移巣での溶骨性因子の発現がmiR-16群で増加し、miR-133a群およびmiR-223群で低下した。また破骨細胞活性および骨破壊はmiR-16群で増加、miR-133aおよびmiR-223群で低下した。

今回の研究により、miR-16は乳癌細胞由来の溶骨性因子の発現増加や、破骨細胞の分化・活性増強を介して、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。

本研究は、miRNAが乳癌骨転移による骨破壊に与える影響を研究したものであるが、従来明らかとなっていなかったそのメカニズムについて重要な知見を得たものであり、新たなバイオマーカーや治療標的となり得る点で価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。