

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12332

研究課題名(和文) リンゴ果汁中ナノベシクル内microRNAによる大腸癌抑制効果の検討

研究課題名(英文) Effects on the suppression of colorectal cancer cells by microRNA into nanovesicles in apple juice

研究代表者

千葉 満 (Chiba, Mitsuru)

弘前大学・保健学研究科・講師

研究者番号：20583735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノベシクルは細胞間の情報伝達因子として機能する細胞外小胞で、近年、果物果汁中においてもその存在が明らかとなっている。私はこれまでに、ナノベシクル内に多くのmicroRNAが存在し、細胞に対して機能変化を誘導することを明らかにしてきた。この研究ではリンゴ果汁中に含まれるナノベシクルにmicroRNAをはじめとしたsmall RNAが存在することを明らかにした。また、RNAを含有するナノベシクルが大腸癌細胞株に取り込まれることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nanovesicles are extracellular vesicles that function as intercellular signal transduction factors. Recently, its existence has been clarified in fruit juice. I have clarified that a number of microRNAs exist in nanovesicles and induce functional changes on the cell. In this study, it was revealed that micro RNA and other small RNAs exist in nanovesicle contained in apple juice. In addition, it was revealed that nanovesicles containing RNA are taken up into colorectal cancer cell lines.

研究分野：腫瘍学

キーワード：リンゴ microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

日本において大腸癌は女性の死亡率1位であり、男性においても高い死亡率を示している。大腸癌による死者を減らすためには、予防と早期発見が重要であり、大腸癌の予防には食物繊維の摂取が重要であることが多くの研究者によって証明されている。近年、多くの自然成分由来の健康食品による効果が注目されており、その例としてリンゴの抗酸化作用や脂質代謝亢進作用が挙げられる。それらに加えて我々は以前にリンゴ成分には抗腫瘍効果があることを報告した[1]。その解析でリンゴポリフェノールに抗腫瘍効果をもつことが明らかになったが、その他のリンゴ成分における抗腫瘍効果については全く不明である。

microRNA は細胞内における遺伝子の発現調節に関わる非翻訳 RNA である。近年、細胞外液中に含まれるナノベシクル(細胞外小胞)の中に microRNA が存在することが発見され[2]、我々は以前にナノベシクルが別の細胞内へ取り込まれて機能することを証明した[3,4]。ナノベシクルは植物中にも存在することが知られており、Juらはグレープフルーツ中のナノベシクルが大腸炎の予防に役立つことを示した[5]。我々が着目しているリンゴの果実にも microRNA が存在することが報告されており[6]、リンゴ果汁に含まれる microRNA 内包ナノベシクルが癌細胞に対して抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆される。しかしながら、その点については十分検討されていない。以上の背景から研究代表者は本研究課題を着想するに至った。

### <引用文献>

- [1] T. Miura, **M. Chiba**, K. Kasai, *et al.* **Carcinogenesis**. 29(3):585-93 (2008).
- [2] H. Valadi *et al.* **Nat Cell Biol**.9(6):654-9(2007).
- [3] **M. Chiba**, M. Kimura, S. Asari. **Oncology Reports**. 28(5):1551-8 (2012).
- [4] S. Kubota, **M. Chiba**, M. Watanabe, *et al.* **Oncology Reports**. 33(1):67-73 (2015).
- [5] S. Ju *et al.* **Molecular Therapy**. 21(7):1345-57(2013).
- [6] R. Xia *et al.* **Genome Biology**. 13:R47(2012).

## 2. 研究の目的

本研究課題では、抗腫瘍性の高いリンゴ果汁中ナノベシクルを探索するとともに、ナノベシクルに含まれる腫瘍抑制性 microRNA の同定と機能を調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) リンゴナノベシクルに含まれる RNA の検出と網羅的解析

青森県産の各品種のリンゴをすり潰し、リンゴ果汁を回収した。リンゴ果汁から様々なデブリ成分を除去し、遠心分離によりリンゴ

ナノベシクルを回収した。ナノベシクルから RNA を抽出し、Agilent Bioanalyzer(Agilent Technologies 社)で RNA ピークを確認した。また次世代シーケンサーによりリンゴナノベシクル中に含まれる small RNA 種を調べた。

(2) リンゴナノベシクルの大腸癌細胞株への取り込み

リンゴナノベシクルの大腸癌細胞内への取り込みを確認するために、リンゴナノベシクルに内在する RNA を SYTO RNASelect (ThermoFisher Scientific)で蛍光標識した。蛍光標識したナノベシクルを大腸癌細胞株に添加し、細胞内に取り込まれた蛍光を共焦点顕微鏡により観察した。

(3) リンゴナノベシクル添加による大腸癌細胞株への影響解析

各タンパク濃度のリンゴナノベシクルを添加したときの大腸癌細胞株の細胞死(トリパンプルー色素排除法)、細胞増殖抑制(アラマブルー蛍光法)、アポトーシス性およびネクローシス性細胞死(Annexin V/Propidium Iodide/Hoechst33342 によるフローサイトメトリー解析)などを解析した。

## 4. 研究成果

(1) リンゴナノベシクルに含まれる RNA の検出

リンゴナノベシクルから含まれる RNA を検出するために、Agilent Bioanalyzer による電気泳動を行った。その結果、25~200ヌクレオチドサイズの small RNA が検出された。この結果からリンゴナノベシクルには small RNA が多く含まれることが示唆された(図1)。

また抽出されたリンゴナノベシクル由来 RNA の種類を調べるために次世代シーケンズ解析を行った。その結果、miR-159、miR-396、miR-166をはじめとした microRNA が同定された。情報学的解析によりこれらの microRNA は植物に存在する microRNA であることが確認できた。また、ヒト標的遺伝子との相同性を有する microRNA も確認された。

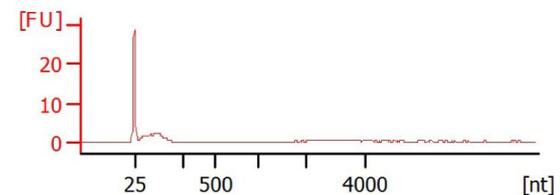


図1 バイオアナライザ解析による small RNA の検出 25~200ヌクレオチドサイズの small RNA が検出された。

(2) リンゴナノベシクルの大腸癌細胞株への取り込み

方法のように蛍光標識したリンゴナノベシクルを3種類の大腸癌細胞株の培養上清へ

添加した。その結果、細胞内に蛍光が観察され、大腸癌細胞株細胞内に取り込まれることが明らかとなった(図2)。

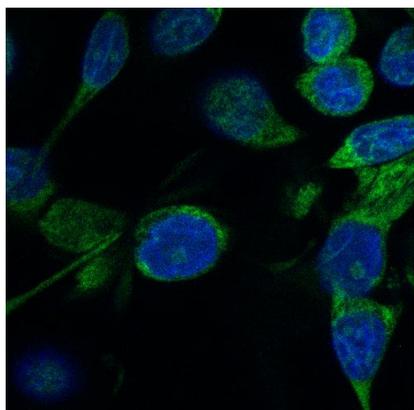


図2 . 大腸癌細胞株による蛍光標識ナノベシクルの取り込み . SYTO RNASelect によりリンゴナノベシクル内の RNA を緑色に標識し、大腸癌細胞株に添加した。核は DAPI により青色を示す。大腸癌細胞内の緑色蛍光はナノベシクル内の RNA が取り込まれたことを示す。

### (3) リンゴナノベシクル添加による大腸癌細胞株への影響解析

各タンパク濃度のリンゴナノベシクルを3種類の大腸癌細胞株の培養上清へ添加した。その結果、添加したナノベシクルタンパク濃度内では細胞死、細胞増殖抑制の有意な差は認められなかった。原因としてはナノベシクルに含有している腫瘍抑制性 microRNA 量が不十分であったことが考えられる。今後、microRNA を含有するナノベシクル回収法の検討、ドラッグデリバリーシステムのキャリアとしての検討、動物実験の検討などを実施する予定である。

\* 本研究課題で得られたデータは現在論文投稿準備中であり、本報告書でのデータ提出は最小限に留めた。

### 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 10 件)

\*: Corresponding author

M. Chiba\*. Exosomal natural antisense transcripts in culture supernatants released from colorectal cancer SW480 cells. *Biomedical Research*. in press. 査読有 .

千葉 清\*. 疾患バイオマーカーとしての体液中マイクロ RNA の探索研究. *臨床化学*. 47(2): 155-60 (2018). 査読無 .

千葉 清\*. 久保田 梨, 門前 暁. 細胞外小胞の細胞内への取り込み機構. *細胞*. 50(5): 267-70 (2018). 査読無 .

S. Monzen, M. Chiba, T. Ueno, Y. Morino, K. Terada, H. Yamaya, Y. Hosokawa. A

radioresistant fraction of acute promyelocytic leukemia cells exhibit CD38 cell-surface antigen and mRNA expression. *Oncology Letters*. 15(5): 6709-14 (2018). 査読有 .

M. Chiba\*, S. Monzen, C. Iwaya, Y. Kashiwagi, S. Yamada, Y. Hosokawa, Y. Mariya, T. Nakamura, A. Wojcik. Serum miR-375-3p increase in mice exposed to a high dose of ionizing radiation. *Scientific Reports*. 8(1): 1302 (2018). 査読有 .

T. Kurokawa, K. Kohno, K. Nagai, M. Chiba, S. Pak, S. Murata, K. Fukunaga, H. Yasue, N. Ohkohchi. Antisense RNA transcripts in the blood may be novel diagnostic markers for colorectal cancer. *Oncology Letters*. 14(3): 3487-93 (2017). 査読有 .

R. Saga, S. Monzen, M. Chiba, H. Yoshino, T. Nakamura, Y. Hosokawa. Anti-tumor and anti-invasion effects of a combination of 4-methylumbelliferone and ionizing radiation in human fibrosarcoma cells. *Oncology Letters*. 13(1): 410-6 (2017). 査読有 .

N. Nanashima, K. Horie, M. Chiba, M. Nakano, H. Maeda, T. Nakamura. Anthocyaninrich blackcurrant extract inhibits proliferation of the MCF10A healthy human breast epithelial cell line through induction of G0/G1 arrest and apoptosis. *Molecular Medicine Reports*. 16(5): 6134-41 (2017). 査読有 .

千葉 清\*, 門前 暁. Topics from special edition 癌細胞由来エキソソームの間質細胞への影響. *細胞*. 48(9): 434-7 (2016). 査読無 .

M. Chiba\*, N. Watanabe, M. Watanabe, M. Sakamoto, A. Sato, M. Fujisaki, S. Kubota, S. Monzen, A. Maruyama, N. Nanashima, I. Kashiwakura, T. Nakamura. Exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells promote cell migration in HepG2 hepatocellular cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *International Journal of Oncology*. 48(1): 305-12 (2016). 査読有 .

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

千葉 満 (CHIBA, Mitsuru)  
弘前大学・大学院保健学研究科・講師  
研究者番号：20583735

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )