

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06603

研究課題名(和文)細胞外小胞miRNAによる腫瘍血管の異常性獲得メカニズム解明と診断・治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism by which extracellular vesicles miRNA induces abnormalities in tumor endothelial cells and development of novel cancer diagnostics and therapy

研究代表者

鳥居 ちさほ(Torii, Chisaho)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員

研究者番号：00780561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍血管の薬剤耐性に関与するがん細胞由来細胞外小胞(Extracellular vesicles: EVs)が関与する可能性を検討した。悪性度の異なるがん細胞からEVsを単離し、それに含まれるmiRNA発現量を比較検討したところ、悪性度の高いがん細胞由来EVsにはmiRNA-Xが多く含まれた。EVsを取り込んだ血管内皮細胞においてmiRNA-X発現が亢進し、さらにその標的遺伝子Yの発現が低下することにより、5-FUに対して薬剤耐性を示した。今後、miRNA-Xと病理学的因子および予後について臨床検体を用いて検討し、新たながんの診断・治療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether extracellular vesicles (EVs) involved in drug resistance in tumor endothelial cells. EVs were isolated from low and high metastatic tumor. We identified miRNA-X which was contained higher level in high metastatic tumor EVs than in low metastatic tumor EVs. miR-X was transported by EVs into endothelial cells and downregulated target gene Y expression. It induced drug resistance to 5-FU in endothelial cells. In the future, we will investigate whether miRNA-X relates to pathological factors and prognosis using clinical samples in order to develop novel cancer diagnostics and therapy.

研究分野：口腔外科

キーワード：腫瘍血管 細胞外小胞 miRNA 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞のみならず、がん間質細胞も正常組織の間質細胞とは異なる性質をもつことが明らかになってきた。研究代表者が所属する研究グループでは世界に先駆けて腫瘍血管内皮細胞の分離と培養に成功し、それらが染色体異常、高い血管新生能、幹細胞性や薬剤耐性など、様々な異常性をもつことを報告してきた (*Cancer Res* 2004, *Am J Pathol* 2009, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, *Am J Pathol* 2012, *PLoS ONE* 2014 etc.)。さらに腫瘍血管内皮細胞が異常性を獲得するメカニズムの一つとして、がん細胞由来の液性因子が関与することを、がん細胞の培養上清を用いた実験で明らかにした (*Am J Pathol* 2012)。

一方、がん細胞は自らの増殖や浸潤に都合の良い環境を作り出すために、細胞間コミュニケーションのツールとして細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) を分泌し、周囲間質を変化させている可能性が知られている。EVs は Exosome や Microvesicles (MVs) などの 50 nm~1000nm ほどのサイズの微小胞の総称で、その内部にタンパク、mRNA、microRNA (miRNA) を含む。研究代表者が所属する研究グループにおいてもこれまでに、EVs の一種である MVs に着目し、腫瘍細胞由来の MVs が腫瘍血管新生を促進することを発見した (*PLoS ONE* 2012)。また、miRNA は約 20bp の 1 本鎖 RNA 分子であり、標的 mRNA に結合し、複数の遺伝子発現を制御し、細胞増殖、細胞分化、アポトーシスといった広範な細胞学的プロセスに重要な役割を果たしている。これまで、がん細胞由来の液性因子が血管内皮の薬剤耐性獲得を誘導することを見出しており、本研究ではがん細胞由来 EVs に着目した。

2. 研究の目的

これまで得られてきた腫瘍血管内皮の特性に関する知見をふまえて、腫瘍血管内皮の異常性のひとつである薬剤耐性に関して、がん細胞由来 EVs と miRNA に着目し、メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 悪性度の異なるがん細胞株の培養上清から細胞外小胞を単離し、miRNA の発現を比較する：

悪性度の異なるがん細胞株の培養上清から超遠心法 (110,000g) により細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) を単離する。単離した EVs は、EVs の膜タンパクである CD63 および CD9 の発現を、抗 CD63、CD9 抗体を用いて評価し、また BCA assay によりタンパク量を定量する。EVs に含まれる miRNA の発現について、すでに先行して解析した miRNA array により候補として上がっているものを、miRNA PCR により比較検討する。

(2) 同定された miRNA を正常血管内皮細胞に導入して、薬剤耐性の変化を in vitro で検討する：

悪性度の高いがんによく含まれる miRNA を正常血管内皮細胞に遺伝子導入し、その影響を検討する。腫瘍血管内皮細胞は薬剤耐性を示すことから、それらの特性を in vitro で評価する。具体的には、5-FU に対する薬剤耐性について MTS assay や PI-AnnexinV assay により評価する。

(3) 同定された miRNA の標的分子をデータベースおよび 3'UTR assay により検討する：

miRNA は標的遺伝子の 3'UTR に配列相補的に結合してその発現制御することが知られている。まず標的遺伝子候補を miR DB, TargetScan, Diana などの複数のデータベースから抽出する。さらに (2) で示された生物学的特性と関連のある遺伝子をピックアップし、3'UTR assay により miRNA が標的 mRNA に結合することを示す。

(4) 悪性度の異なるがん細胞株をマウスに移植し、形成された腫瘍塊から腫瘍血管内皮細胞を分離・培養する：

悪性度の異なるがん細胞株をマウスに皮下移植し、形成された腫瘍塊からそれぞれ腫瘍血管内皮細胞を分離する。分離には、抗 CD31 抗体および抗 CD45 抗体を用いて、血管内皮細胞分画である CD31(+)CD45(-)細胞を、MACS を用いた磁気ビーズ細胞分離法およびフローサイトメトリーにより採取する。

(5) 同定された miRNA の標的分子の発現を、分離・培養した腫瘍血管内皮細胞間で比較する：

がん細胞由来 EVs に含まれる miRNA が、腫瘍血管内皮細胞の特異性に関与しているのであれば、腫瘍血管内皮細胞においてその標的遺伝子の発現が制御されているはずである。悪性度の高いがん由来の血管内皮細胞は、悪性度の低いがん由来血管内皮細胞よりも高い異常性を示すため、それらの違いが細胞外小胞 miRNA に起因するかどうか、PCR 法により標的遺伝子の発現を比較する。

(6) 単離した細胞外小胞を正常血管内皮に処理し、その取り込みと miRNA および標的分子の発現変動を検討する：

細胞外小胞が血管内皮に与える影響について、単離した細胞外小胞を血管内皮細胞に処理して in vitro で評価する。あらかじめ細胞外小胞を PKH26dye により赤色蛍光標識し、血管内皮細胞に処理後、フローサイトメトリーによりその取り込みを評価する。細胞外小胞を介して miRNA が血管内皮に作用したかどうか、細胞外小胞処理後の血管内皮から miRNA を抽出し、これまでに絞り込んできた miRNA の発現を比較する。さらに、RNA を抽出して標的遺伝子の発現を RT-PCR 法により

解析する。

(7) 臨床検体を用いて miRNA の発現量を比較する：

細胞外小胞は血液、唾液中にも分泌されることが知られている。健常人および北海道大学病院のがん患者の血液を用いて細胞外小胞を単離し、それに含まれる miRNA 量を検討する。

4. 研究成果

悪性度の高いがん由来 EVs には miRNA-X が多く含まれ、それを正常血管内皮細胞に遺伝子導入すると、5-FU に対する薬剤耐性が誘導されることを見出した。

次に miRNA-X の標的遺伝子を絞り込んだ。TaregetScan, miRDB など複数のデータベースから標的遺伝子候補を抽出し、3' UTR assay により miRNA-X が候補遺伝子に結合するかどうか、さらにその標的遺伝子候補を siRNA でノックダウンした際に、5-FU に対する薬剤耐性がキャンセルされるかどうか検討した。その結果、標的遺伝子 Y が選出された。

単離したがん由来 EVs を PKH26dye で標識し、正常血管内皮細胞に処理すると、赤色蛍光を発する細胞がフローサイトメトリーにより検出され、EVs が血管内皮細胞に取り込まれていることが確認された。EVs を血管内皮細胞に処理すると、miRNA-X の発現が亢進し、さらに標的遺伝子 Y の発現が低下した。

がん患者の血清から EVs を超遠心法で回収し、miRNA 量を検討すると、健常人よりも miRNA-X の発現が高かった。

以上より、がん細胞が分泌した EVs には miRNA-X が多く含まれ、それを取り込んだ血管内皮細胞は標的遺伝子 Y の発現が低下することにより、5-FU に対して薬剤耐性を示すことが明らかになった。

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6件)

1. Hida K., Maishi N., Akiyama K., Ohmura-Kakutani H., Torii C., Ohga N., Osawa T., Kikuchi H., Morimoto H., Morimoto M., Shindoh M., Shinohara N., Hida Y., : Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity Show drug resistance, *Cancer Sci*, 108(11), 2195-2203, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1111/cas.13388> 査読あり
2. Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Sato Y., *Hida K.: Vasohibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma, *Anticancer Res*, 37(3),

1219-1225, 2017, DOI: 10.21873/anticancer.11437 査読あり

3. Hida K., Maishi N., Dorcas Akuba-Muhyia Annan, Kondoh M., Hojo T., Umma Habiba, Ohga N., Ishikawa K., Sato M., Torii C., Yanagiya M., Morimoto M., Hida Y., Shindoh M. : Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1, *J Oral Biosci*, 59 (2017), 50-54, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.job.2016.10.004> 査読あり
4. Hida K., Maishi N., Kawamoto T., Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Yamada K., Hojo T., Kikuchi H., Sato M., Torii C., Shinohara N., Shindoh M. : Tumor endothelial cells express high pentraxin 3 levels, *Pathol Int*, 66(12), 687-694, 2016 DOI: 10.1111/pin.12474 査読あり
5. Hida K., Maishi N., Torii C., Yanagiya M., Annan Akuba-Muhyia Dorcas., Morimoto M., Alam Mohammad Towfik : Comparison of characteristics of mouse immortalized normal endothelial cells, MS1 and primary cultured endothelial cells, *Hokkaido Journal of Dental Science*, 37(1), 40-48, 2016 査読あり
6. Hida K., Maishi N., Torii C., Hida Y. : Tumor Angiogenesis—Characteristics of Tumor Endothelial Cells, *Int J Clin Oncol*, 21(2), 206-212, 2016, DOI: 10.1007/s10147-016-0957-1 査読あり

[学会発表](計11件)

1. 間石奈湖, 鳥居ちさほ, 川本泰輔, 森本真弘, 秋山廣輔, 吉岡祐亮, Alam Mohammad Towfik, 南敬, 落谷孝広, 樋田泰浩, 樋田京子: 高転移性腫瘍 miR による血管内皮における薬剤耐性誘導, 第26回日本がん転移学会学術集会, 2017.7.28(大阪)
2. Randa Ibrahim Dawood, Yanagiya M., Maishi N., Hida Y., Torii C., Kikuchi H., Ohga N., Tei K., Kitakura T., Shindoh M., Hida K. : Correlation between endothelial CXCR7 expression and clinic pathological factors in oral squamous cell carcinoma (OSCC), 第5回がん代謝研究会 in 札幌, 2017.7.14(札幌)
3. 森本真弘, 鳥居ちさほ, 川本泰輔, 間石奈湖, 吉岡祐亮, 落谷孝広, 樋田泰浩, 樋田京子: 高転移性腫瘍エクスソーム miR による血管内皮の薬剤耐性誘導, 第5回がん代謝研究会 in 札幌, 2017.7.14(札幌)
4. 柳谷美沙, 間石奈湖, 鳥居ちさほ, 樋田泰浩, 大賀則孝, 鄭漢忠, 進藤正信, 北川善政, 樋田京子: Correlation between CXCR7 expression of blood vessels and clinicopathological features in oral

- squamous cell carcinoma, 第 24 回日本血管生物医学学会学術集会, 2016.12.10 (長崎)
5. Hida K., Torii C., Maishi N., Morimoto M., Akiyama K., Kawamoto T., Minami T., Yoshioka Y., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Ochiya T: Tumor endothelial cells acquire drug resistance by exosomal-miR derived from high metastatic tumor, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11.2, Boston, Massachusetts, USA
 6. 柳谷美沙, 間石奈湖, 鳥居ちさほ, 樋田泰浩, 大賀則孝, 鄭 漢忠, 進藤正信, 北川善政, 樋田京子: 口腔扁平上皮癌における腫瘍血管マーカーCXCR7 の発現解析, 第 49 回北海道病理談話会, 第 7 回 IGM 研究交流会, 2016.10.18 (札幌)
 7. 森本真弘, 鳥居ちさほ, 川本泰輔, 秋山廣輔, 間石奈湖, 吉岡祐亮, 落谷孝広, 柳谷美沙, 菊地 央, 北川善政, 鄭漢忠, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 高転移性腫瘍エクソソーム miRNA は血管内皮の IL6 を誘導し血管新生阻害療法への耐性を誘導する, 第 7 回 IGM 研究交流会, 2016.10.18 (札幌)
 8. 柳谷美沙, 間石奈湖, 鳥居ちさほ, 樋田泰浩, 大賀則孝, 鄭 漢忠, 進藤正信, 北川善政, 樋田京子: 口腔扁平上皮癌における腫瘍血管マーカーCXCR7 の発現解析, 第 49 回北海道病理談話会, 2016.10.15 (札幌)
 9. 間石奈湖, 鳥居ちさほ, 川本泰輔, 秋山廣輔, 吉岡祐亮, 落谷孝広, 柳谷美沙, 森本真弘, 菊地 央, 鄭 漢忠, 北川善政, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 高転移性腫瘍 miR による血管内皮における IL-6 を介した薬剤耐性誘導, 第 49 回北海道病理談話会, 2016.10.15 (札幌)
 10. Dorcas A Annan, Maishi N., Soga T., Hida Y., Torii C., Kikuchi H., Hida K.: Tumor endothelial cells are resistant to acidic environments, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016.10.7 (横浜)
 11. 森本真弘, 鳥居ちさほ, 秋山廣輔, 川本泰輔, 間石奈湖, 鄭 漢忠, 北川善政, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 高転移性腫瘍 miR による血管内皮における IL-6 を介した薬剤耐性誘導, 第 8 回日本 RNA-i 研究会, 2016.9.2 (広島)

〔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
<http://www.igm.hokudai.ac.jp/vascular-biology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 ちさほ (TORII, Chisaho)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・
客員研究員
研究者番号: 00780561

(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

()