

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10482

研究課題名(和文) 高転移性乳癌細胞は転移抑制性miRNAsをexosomeに内包して細胞外に捨てる

研究課題名(英文) Highly metastatic mouse mammary carcinoma cells decrease suppressive miRNAs via exosome

研究代表者

伊藤 裕子 (ITO, YUKO)

大阪医科大学・その他部局等・功労教授

研究者番号：40148432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス乳癌細胞(BJMC3879)は同系のマウスに移植するとリンパ節、肺にほぼ100%の割合で転移が認められる。先行研究でこの転移能はBJMC3879がリンパ管内皮細胞増殖因子(VEGF-C)を強く発現しているためであると考えられた。今回この細胞が分泌するexosomeが転移にどのように関わっているか、BJMC3879が発現しているVEGF-Cの受容体VEGFR-3とVEGF-Cの発現を調節するmiR-27bに注目して検討した。その結果VEGF-Cを抑制するmiR-27bをexosomeにより捨て、exosomeに含まれているVEGF-Cをオートクリンのように利用して増殖すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR-27bのexosomeによる排出を止める、またはmiR-27bを遺伝子導入すればVEGF-Cの発現が低下し、乳癌の増殖、転移をおさえることができる。女性の死亡原因の上位にある乳癌の核酸医学的治療の基礎をかためることができたとと言える。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that high expression level of VEGF-C in mouse mammary carcinoma cell (BJMC3879) caused high metastatic propensity to lymph nodes or lungs because of its ability for lymphangiogenesis. This study was aimed to demonstrate the role of the exosome mouse mammary carcinoma cell-derived, for metastasis. We hypothesized that excessive expression of miR-27b suppressed expression of VEGF-C in BJMC3879 cell was removed via secretion of exosome under the severe environment such a hypoxia condition, and BJMC3879 could proliferate by VEGF-C/VEGFR-3 system. BJMC3879 could use their exosomes containing VEGF-C due to VEGFR-3-expression on their cell membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：乳がん リンパ行性転移 VEGF-C Exosome microRNA hypoxia

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 種々の細胞で細胞膜に包まれた microvesicles (MVs) (直径 50-100nm の exosomes とこれより大きい shedding vesicles に分類される) には受容体タンパク、タンパク分解酵素、miRNA、mRNA などが含まれ、ドナー細胞から標的細胞へと伝播され標的細胞の色々な機能変化をもたらすことが報告されている()。特に miRNA はサイズが小さい非翻訳 RNA で翻訳修飾後に標的遺伝子に調節機能を発揮するため、近年盛んに治療および非侵襲的検査法への応用が試みられている。
- (2) 乳癌のリンパ行性転移にはリンパ管新生が必須であり、乳癌細胞が分泌するリンパ管内皮細胞増殖因子(VEGF-C)が腫瘍周囲の既存のリンパ管内皮が発現している受容体(VEGFR-3)に結合すると、リンパ管が新生する。VEGF-C の遺伝子を標的とする miRNA には miR-27(), miR-128()などが知られている。

2. 研究の目的

高転移性乳癌細胞における転移抑制性 miRNA と exosome の関係を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 材料として低転移性マウス乳癌細胞(BJMC338)と同系の高転移性マウス乳癌細胞(BJMC3879)を用いて、通常酸素濃度(normoxia)(20% O₂)と低酸素濃度(hypoxia)(1% O₂)培養条件下で比較した。
- (2) Exosome の採取：採取前 48 時間 exosome free で培養後、上清を 100,000g で 4 時間遠沈した。
- (3) ナノサイトで exosome のサイズと濃度を解析した。
- (4) 走査電子顕微鏡(SEM)と透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて exosome の超微形態を観察した。
- (5) Exosome marker (CD9, CD63, CD81) と VEGF-C の発現を Western blot で確認した。
- (6) (2)で得られたペレットより RNA を抽出し、発現している miRNA を網羅的に解析、BJMC338 と BJMC3879 で比較した。この結果より、VEGF-C の調整に関わっている miRNA を検索した。この miRNA について qRT-PCR で発現を解析した。

4. 研究成果

- (1) ナノサイトによる exosome のサイズ解析：normoxia において最頻値は BJMC338 が 127 nm, BJMC3879 が 122 nm でほぼ同じ直径であった。

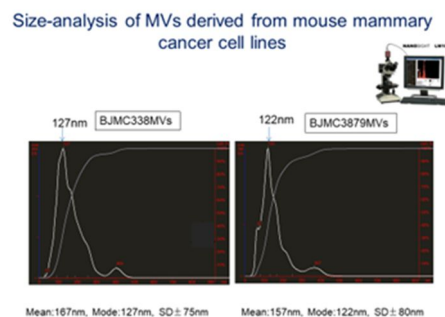


図1 ナノサイトによる解析

(2) SEM による exosome の超微形態観察

BJMC338, BJMC3879 の培養上清中に Microvesicles($\phi > 100$ nm)と Exosomes($\phi 50 \sim 100$ nm)が観察された。

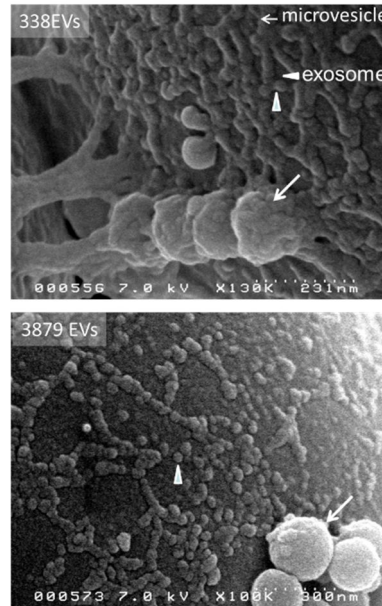


図2 SEM 写真

(3) Exosome marker

normoxia で培養した BJMCs から採取した exosome が発現している exosome marker は CD63 は共通して発現が認められるが、CD9, CD81 は発現に差があった。

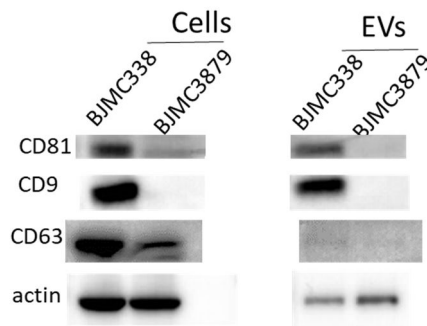


図3 exosome marker の Western blot による発現解析

(4) VEGF-C の発現

Normoxia における VEGF-C の発現は BJMC3879 細胞で 338 細胞よりも強かった。Exosome での発現も BJMC3879-exosome で強く、precursor および mature VEGF-C が発現していた。Hypoxia において、細胞における VEGF-C の発現は両者で減少していたが、exosome における発現は両者ともに増加していた。

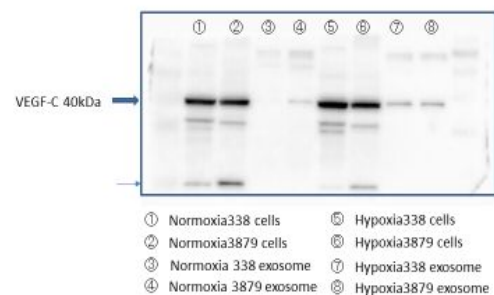


図4 VEGF-C の Western blot による発現解析

(5) miRNA の網羅的解析

Hypoxia で培養した BJMC338 と 3879 が分泌した exosome が内包する miRNA の網羅的を行った。BJMC3879-exosome で 338 よりも発現が高い miRNA は 58 個あった。その中から VEGF-C を標的とする miRNA-27b, miRNA-128 について検討することにした。

Expression of miRNAs in MVs under hypoxia(1%O₂*)

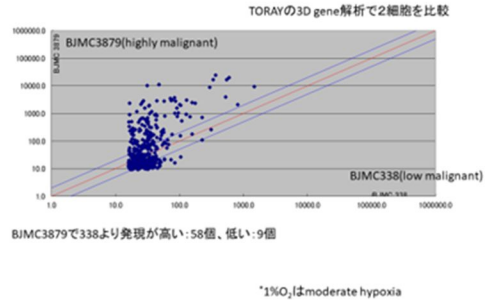


図5 BJMC338-, 3879-exosome 中の miRNA 比較

(6) VEGF-C をターゲットとする miRNA の解析

miRNA-128 は qRT-PCR による解析では発現が認められなかった。

BJMC338 細胞の miRNA-27b は hypoxia で発現が増加していたが、3879 では normoxia と同程度に保たれていた。一方、exosome 中の miRNA-27b は両者において hypoxia で増加しており、3879 で顕著であった。

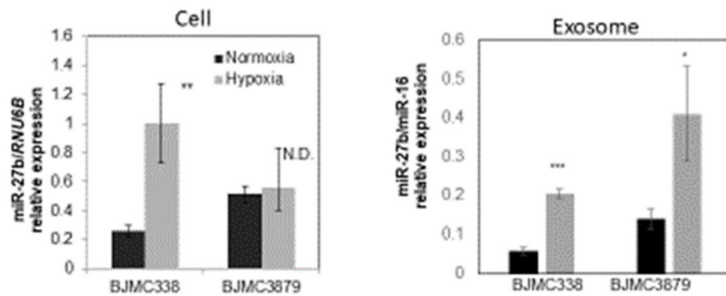


図6 miRNA-27 の qRT-PCR による発現解析

(7) BJMC3879 が発現する VEGF-C 受容体 VEGFR-3 の意義についての解析

BJMC3879 は VEGFR-3 を発現していた(図7)。VEGF-C/VEGFR-3 のシグナルが実行されているか Akt/phosphoAkt の系を自己 exosome の伝播で調べた。また、細胞における VEGFR-3 の発現低下を抗 VEGFR-3 抗体処理により実行し、自己 exosome の伝播実験を行った(図8)。抗体処理後、自己 exosome を伝播すると phosphoAkt の発現は減少した。

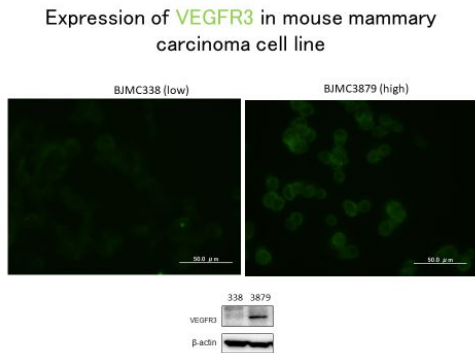


図7 BJMC における VEGFR-3 の発現

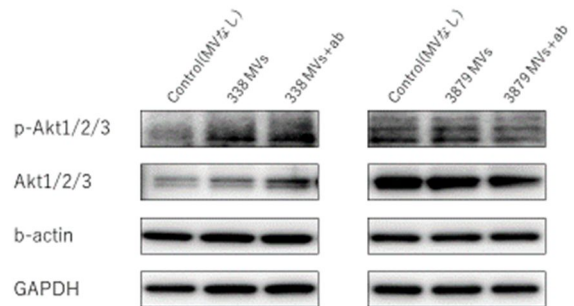


図8 VEGF-C/VEGFR-3 のシグナル実行

(8) 以上のことから、高転移性のマウス乳がん細胞細胞では転移抑制性の miRNA27b を exosome に内包して細胞外に分泌することで VEGF-C の発現を調整し微小環境の変化に対応していると思われた。また、exosome に含まれる VEGF-C をオートクリンのように利用していると思われた。

<引用文献>

Ratajczak et al., Membrane-derived Microvesicles: Important and Underappreciated Mediators of Cell-To-Cell Communication, *Leukemia* 20:1487-95,2006

Baj-Krzyworzeka et al., Tumour-derived Microvesicles Carry Several Surface Determinants and mRNA of Tumour Cells and Transfer Some of These Determinants to Monocytes, *Cancer Immunol Immunother* 55:808-8018,2006

Jun Ye et al., miRNA-27b targets vascular endothelial growth factor C to inhibit tumor progression and angiogenesis in colorectal cancer. *Plos one*, vol.8, Issue 4, e60687

Jing Hu et al., microRNA-128 plays a critical role in human non-small cell lung cancer tumorigenesis, angiogenesis and lymphangiogenesis by directly targeting vascular endothelial growth factor C, *European J of Cancer* (2014) 50, 2336-2350.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akio Horibe, Nabil Eid *, Yuko Ito, Hitomi Hamaoka, Yoshihisa Tanaka and Yoichi Kondo	4. 巻 18
2. 論文標題 Upregulated autophagy in Sertoli cells of ethanol-treated rats is associated with induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS), androgen receptor suppression and germ cell apoptosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18051061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takai T., Yoshikawa Y., Inamoto T., Minami T., Taniguchi K., Sugito N., Kuranaga Y., Shinohara H., Kumazaki M., Tsujino T., Takahara K., Ito Y., Akao Y., and Azuma H.	4. 巻 18
2. 論文標題 A novel combination RNAi toward Warburg effect by replacement with miR-145 and silencing of PTBP1 induces apoptotic cell death in bladder cancer cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18010179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinohara H., Kuranaga Y., Kumazaki Y., Sugito N., Yoshikawa Y., Takai T., Taniguchi K., Ito Y., and Akao Y.	4. 巻 199
2. 論文標題 regulated polarization of tumor-associated macrophages by miR145 via colorectal cancer-derived extracellular vesicles	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Immunol	6. 最初と最後の頁 1505,1515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1700167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 N. FUKUI, P.K. MOY, A. HIRATA, Y. ITO, Y. KIMURA, Y. NAKAJIMA, N. KATO-KOGOE, S. KASUYA, K. YAMAMOTO, H. TERAJ, and T. UENO.	4. 巻 62
2. 論文標題 Evaluation of Angiogenesis during Bone Regeneration Following Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) and Artificial Bone Insertion Prior to Implant Placement.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Bulletin of the Osaka Medical College	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Betsuyaku T, Eid N, Ito Y, Tanaka Y, Otsuki Y, Kondo Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Ethanol enhances thymocyte apoptosis and autophagy in macrophages of rat thymi.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Histol Histopathol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.14670/HH-11-861.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi K, Sakai M, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, Nakayama T, Ueda H, Nakagawa Y, Ito Y, Futamura M, Uno B, Otsuki Y, Yoshida K, Uchiyama K, Akao Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 PTBP1-associated microRNA-1 and -133b suppress the Warburg effect in colorectal tumors.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.8005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eid N, Ito Y, Horibe A, Otsuki Y	4. 巻 17
2. 論文標題 Ethanol-induced mitophagy in liver is associated with activation of the PINK1-Parkin pathway triggered by oxidative DNA damage.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Histol Histopathol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3390/ijms17010071.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinohara H, Kumazaki M, Minami Y, Ito Y, Sugito N, Kuranaga Y, Taniguchi K, Yamada N, Otsuki Y, Naoe T, Akao Y.	4. 巻 371
2. 論文標題 Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2015.11.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuko Ito, Nabil Eid, Masa-Aki Shibata, Yoshinori Otsuki and Yoichi Kondo
2. 発表標題 Mouse mammary carcinomas secrete extracellular vesicles. in vitro and in vivo study
3. 学会等名 2nd World Congress on Cancer (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Ito, Masa-Aki Shibata, Kohei Taniguchi, Yukihiro Akao
2. 発表標題 The ultrastructural features of exosomes derived from mouse mammary carcinomas in vitro and in vivo studies
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤裕子、柴田雅朗、谷口高平、ナビル・イード、濱岡仁美、大槻勝紀、近藤洋一
2. 発表標題 高転移性マウス乳癌が分泌するエクソソームの生物学的特徴
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤裕子、柴田雅朗、前村憲太郎、近藤洋一
2. 発表標題 Microvesiclesによる細胞間コミュニケーション
3. 学会等名 第58回組織細胞化学学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田雅朗、濱岡仁美、伊藤裕子
2. 発表標題 マンゴスチン果皮抽出物の -マンゴスチンを模倣した合成 -マンゴスチンドデカン酸ジエステルのマウス乳癌転移抑制
3. 学会等名 第75回日本癌学会総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴田 雅朗 (Shibata Masa-Aki) (10319543)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	Eid Nabil A.S. (Eid Nabil) (50570165)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	2019年9月よりUAEUエミレーツ大学に転出したため、削除されている。
研究分担者	濱岡 仁美 (黒瀬仁美) (Hamaoka Hitomi) (80545608)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	