

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02703

研究課題名(和文)細胞間情報伝達による肉腫特異的血清マイクロRNAプロファイル成立機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for the establishment of serum miRNA profiles through inter-cellular communication.

研究代表者

土屋 直人 (Tsuchiya, Naoto)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30322712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内non-coding RNAであるマイクロRNA(miRNA)の機能異常が発がん深く関連することは明らかであるが、如何にして腫瘍組織の成立に貢献するか、そのメカニズムは不明である。本研究では、細胞外miRNAプロファイルの成立が、主としてがん細胞由来ではないことを明らかにし、血液細胞や他の組織由来のmiRNAの貢献が大きいことを明らかにした。さらに、細胞外からも検出されるmiRNA構造アイソフォームの生物学的意義についても検討を行い、特定miRNAのアイソフォーム生成が、miRNAのがん促進的細胞内ネットワークの活性化を反映することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは、がん医療創出の有望なツールとして研究されているが、発がんにおける生物学的な意義の全容は理解されていない。細胞外へと分泌されるmiRNAの意義や機能、血清miRNAプロファイルの成立に貢献する分泌細胞も特定されていない。本研究では、血清miRNAプロファイルの成立にがん細胞由来の分泌miRNAがほとんど関与しないこと、正常組織由来と考えられるmiRNAの貢献が大きいことを見出した。さらに、構造アイソフォームの発現優位性がoncogenicなmiRNA制御ネットワークの活性化を反映することも明らかにした。本成果は、miRNAの実用化に向けて、極めて有用な知見を提示する。

研究成果の概要(英文)：To understand the overall functions of the miRNA system for the establishment of malignant cells and tissues, we analyzed the source of extracellular miRNAs (exmiRNA), being detectable in the serum samples from cancer patients. Interestingly, cancer cell-derived exmiRNAs did not contribute to establishing serum miRNA profiles. Therefore, the serum miRNA profile mirrors the reactive changes of patients with cancer-bearing conditions. In addition, the biological relevance of miRNA structural isoforms, which are frequently detectable in serum of the cancer patients, was also investigated. Interestingly, the dominance for the expression of miRNA isoforms clearly correlated with malignant properties of lung cancers. By detailed analyses, we demonstrated that miRNA structural isoforms expression reflects the activation of the cellular miRNA regulatory network, which is controlled by several RNA binding proteins and is required for the establishment of oncogenic gene expression profiles.

研究分野：分子細胞生物学、腫瘍生物学

キーワード：miRNA 細胞外分泌 細胞内ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

miRNA の機能異常は発がんとは深く関連することは疑いないが、如何にしてがん細胞の悪性化誘導や腫瘍組織の成立に貢献しているか、その全容は明らかではない。その理由として、miRNA の機能異常は発現量だけで決定されているわけではなく、RNA 結合タンパク質等で形成される複雑な分子ネットワークを構成することで、標的遺伝子の抑制や活性化が制御されているからである。加えて、特定 miRNA を細胞外へと分泌することで、腫瘍細胞自身の特性変化を誘導し、周囲の微小環境をも制御することから、多様なネットワークを構成することが腫瘍組織の成立に必要なことも疑いない。しかし、これまでの研究からは、「血清 miRNA のプロファイルでがん診断が可能である」や、がん関連 miRNAs の発現変動(異常)の説明として「標的遺伝子の発現制御異常が発がんに関連する」等の画一的な機能解釈を基に应用への展開が検討されている状況にある。したがって、診断・治療薬の開発に確固たる原理が存在しない状況とも考えることができる。

当研究室も参画した国家プロジェクト「体液中 miRNA 測定基盤開発」プロジェクトでは、10000 を超える血清検体を用いて、miRNA のプロファイリングを実施し、13 種類のがん種を 1 回の miRNA プロファイリングで層別化できることを明らかにした (Matsuzaki et al. in revision)。同プロジェクトの中でも、約 1,000 症例の骨軟部腫瘍の患者血清検体の miRNA プロファイリングを行い、悪性症例(肉腫)で特異的に検出される血清 miRNA を同定し、それらを組み合わせて骨軟部腫瘍の組織型によらず悪性症例を診断可能とする diagnostic index II を見出した (Asano et al. Nat. Commun. 2019)。Index II は、肉腫の早期段階から悪性症例の鑑別診断が可能であり、肉腫のステージに依存していなかった。通常、がん細胞が分泌する腫瘍マーカーの検出はステージに依存している。従って、肉腫特異的な血清 miRNA は、肉腫細胞から分泌されているものを検出しているのではなく、肉腫が存在することによって生じる生体反応を反映していると考えられる。即ち、肉腫の発生は、細胞外小胞及び分泌 miRNA によって介在される細胞間情報伝達によって、肉腫細胞から免疫細胞や炎症細胞、または肉腫微小環境の維持に関連する細胞へと伝達され、それら細胞から分泌される細胞外小胞・miRNA、によって生体が担がん状態を反映する血清 miRNA プロファイルを獲得すると考えられる。現在、がん特異的な分泌 miRNA プロファイル(血清 miRNA プロファイルなど)の成立を分子レベルで説明する事は出来ず、どのように情報が細胞間伝達されるか、その結果どのような生体反応が惹起されるかについてもほとんど明らかになっていない。そのメカニズムを理解することで、肉腫発生機構を解明し、その成果を新規分子標的治療法の開発へと応用できると確信する。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞外 miRNA (血中 miRNA) プロファイルの成立機構を明らかにすること、特に分泌 miRNA が周辺非がん細胞に与える影響と分泌細胞の特定を行うことを目的とする。さらに、miRNA システムの全体象を理解するために、細胞外にも分泌される miRNA アイソフォームの生物学的意義の解析も実施した。

3. 研究の方法

(1) 細胞外 miRNA の機能解析

肉腫細胞の培養上清から、総 RNA もしくはエクソソーム濃縮から得られた総 RNA を用いてマイクロアレイ解析を実施した。エクソソーム画分に濃縮される miRNA を選別し、候補 miRNA とした。複数の肉腫細胞で共通して検出される miRNA について、レンチウイルス発現ベクターを構築し、ドキシサイクリン誘導型の細胞株の樹立を実施した。それらの miRNA を血液細胞(本研究では、単球の代表として THP-1 細胞を利用)へと導入し、遺伝子発現解析を実施した。

(2) 血清 miRNA プロファイルの成立に貢献する miRNA 分泌細胞の解析

上述の国家プロジェクトで収集したデータを利用し、がん由来 miRNA の貢献度について検討を実施した。また、既存データベース等も用いて、プロファイルの成立に貢献する miRNA と分泌細胞を検討した。

(3) miRNA 構造アイソフォームの解析

細胞株の miRNA シークエンス解析を実施し、成熟型およびアイソフォームの発現プロファイルを作成した。候補となる miRNA アイソフォームと成熟体の各々を定量化する定量的 RT-PCR を評価した。がん細胞株および非がん細胞株を用いて、当該 miRNA アイソフォームの発現様式を検討した。臨床検体を用いて、当該 miRNA アイソフォームの発現と臨床病理学的な相関を検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞外 miRNA の機能解析

血清 miRNA によるがんの層別診断法の確立に関する研究からも明らかな様に、腫瘍細胞が分泌した miRNA やタンパク性因子による周辺非腫瘍細胞の制御が、担がん状態を示す血清 miRNA プ

ロファイルの成立に必要である。肉腫患者由来の細胞株(20株以上)を用いて、細胞外 miRNA のプロファイリングを実施した。これら細胞株は、様々な肉腫の組織型の検体由来である。マイクロアレイ解析の結果から、肉腫細胞が分泌する miRNA は、類似しているものが多いと考えられた。これらの中から、ランダムに miRNA を選択し、レンチウイルス発現ベクターを構築して、機能の解析を実施した。上記の miR-451a を、単球細胞株 (THP-1) に発現させると、強く細胞増殖が抑制されることがわかった。一方、miR-X、miR-Y は、THP-1 細胞の増殖を亢進するが、肉腫細胞である HT-1080 の増殖には影響を与えなかった。即ち、肉腫が分泌した miRNA を自身が再取り込みしても、表現型には影響を与えないと考えられる。miR-X と miR-Y によって影響を受ける細胞内ネットワークを検討したところ、ケモカインやサイトカイン、その下流因子が主として活性化されていることがわかった。実際に、miR-Y により THP-1 におけるケモカインの発現が亢進した。その誘導メカニズムとして、血液細胞分化の抑制因子である ID1 が miR-Y によって抑制されることに起因することを見出した。さらに、miR-Y を発現させた肉腫細胞株と THP-1 および正常単球細胞を共培養すると、THP-1 の miR-Y の上昇とケモカインの発現上昇が認められ、肉腫から分泌された miRNAs が周辺非腫瘍細胞へ、本解析では単球へと取り込まれ、マクロファージへの分化が部分的に誘導されることがわかった。腫瘍の微小環境を考えると、肉腫が分泌した miRNA と他のタンパク性因子が協調することにより、腫瘍微小環境中では非腫瘍細胞の増殖や分化が活発に行われていると考えられる (Tsuchiya et al. in preparation)。

(2) 血清 miRNA プロファイルの成立に貢献する miRNA 分泌細胞の解析

上述のように、血清 miRNA のプロファイルを利用して 13 種類のがん種を層別化することが可能である。10,000 検体を用いて取得した血清 miRNA プロファイルを解析し、がん種を層別化するための貢献度が大きい miRNA を抽出した。さらに、それら miRNA の正常組織における発現分布をデータベースにより解析を行なった結果、がん種の層別化を可能とする miRNA はがん細胞由来ではないことがわかった。興味深いことに、血液細胞由来や他の正常組織で発現が高い miRNA の貢献度が大きいことから、がんが全身性に影響を与える疾患であること、それらに基づいた全身性の生体反応に由来する miRNA が血清プロファイルの成立に必須であることを見出した (Matsuzaki et al. in revision)。

(3) miRNA 構造アイソフォームの生物学的意義の解析

肺がん細胞株(5株)の miRNA シークエンスの結果から、特定の miRNA アイソフォームの発現が極めて高いことを見出した。そのうちのひとつ miR-A について成熟体とアイソフォーム miR-A2 について定量的 RT-PCR 法により各々を定量化できることを確認した。がん細胞株と非がん細胞株を増殖期と高密度培養(コンフルエント)における両者の発現を解析したところ、miR-A は細胞が高密度になり増殖が低下すると発現上昇を示すことがわかった。一方、miR-A2 は非がん細胞株では、増殖停止後に発現は抑制されることがわかった。興味深いことに、がん細胞における miR-A2 の発現は増殖が低下しても上昇した。miR-A2 の発現優位性を評価するために優位性スコア ($D \text{ score} = 2^{-\text{Dct}(\text{miR-A2-miR-A})} \times -\text{Dct}(\text{miR-A2-U48})$) で評価することとした。D score は miR-A2/miR-A 比が高く miR-A2 の発現が高い、いわゆる miR-A2 依存度が高いことを示す。従って、細胞増殖が低下した条件では、がん細胞株は D score が高く、非がん細胞株は低い。その生物学的意義を明らかにするために、肺腺がん症例 ($n = 138$) のがん部と非がん部における D score の評価を実施した。がん部における D score は非がん部に比して極めて高かった。興味深いことに、D score によって、再発患者を極めて効率よく特定できた。特に、早期ステージ(I & II)の再発症例捕捉に極めて有効であることがわかった。ゲノム解析の結果から、D score は肺がんのドライバー遺伝子変異とは相関しないが、遺伝子変異数と有意な正の相関を示した。すなわち、D score の高い症例は遺伝子変異数が多い。さらに、RNA-Seq 解析の結果、D score の高い症例は、細胞周期の S 期亢進、特に DNA 複製制御因子群と染色体分配制御因子の発現が高く、遺伝子変異数との相関を説明できる結果であった。また、再発の原因となる転移能について、D score の高い症例では、持続的な EMT 圧力がかかっており、細胞内で TWIST の活性化が生じていることがわかった。しかし、腫瘍組織全体では、EMT を起こしておらず、D score の高い早期肺がんでは、微小転移が生じることが再発の要因となることがわかった。極めて特徴的なことは、D score の高い腫瘍組織は、免疫細胞の浸潤が顕著であるものの、免疫回避の分子背景を有していることである。すなわち、免疫チェックポイント阻害剤の効果が期待できる症例を濃縮していた。なぜ、miR-A2 の発現優位性が生じるか検討するために、Gene Ontology (GO) カテゴリーの RNA 制御因子に属する遺伝子 (>1000) から、D score によって発現変動を示す約 400 遺伝子を抽出し、D score との相関を解析した。その結果、複数の RNA 結合タンパク質を同定した。これら遺伝子のノックダウンによって、D score が低下すること、細胞増殖の低下が誘導されることを見出した (Fujiwara et al. Submitted)。

miRNA システムが、がん細胞やがん組織の特性決定に大きな役割を有することは疑いないが、その全体像は、極めて複雑で多くの因子が関与している。その全容を明らかにするためには、画一的な機能解釈だけではなく、新たな知見を既存の知見と融合する必要がある。本研究では、がん細胞が分泌する miRNA は、腫瘍組織内の他の細胞の特性変化を誘導するが、患者血清の miRNA プロファイルの成立にはほとんど関与しないことを見出した。さらに、細胞外からも検出されるこ

とが知られている miRNA アイソフォームの発現優位性が、がん細胞における oncogenic miRNA ネットワークの活性化を反映していることを見出した。本研究の成果は、がんにおける miRNA の役割を理解する上で新たな知見を提供する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuchiya R., Yoshimatsu Y., Tsuchiya N., Ohtori S., Kawai A, Kondo T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Comprehensive miRNA expression analysis for histological subtypes of soft tissue sarcoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 13-22
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 Omata D., Munakata L., Kageyama S., Suzuki Y., Maruyama T., Shima T., Chikaarashi T., Kajita N., Masuda K., Tsuchiya N., Maruyama K., Suzuki R.	4. 巻 30
2. 論文標題 Ultrasound image-guided gene delivery using three-dimensional diagnostic ultrasound and lipid-based microbubbles.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Drug Target.	6. 最初と最後の頁 200-208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1061186X.2021.1953510.	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 Asano N., Matsuzaki J., Ichikawa M., Kawauchi J., Takizawa S., Aoki Y., Sakamoto H., Yoshida A., Kobayashi E., Tanzawa Y., Nakayama R., Morioka H., Matsumoto M., Nakamura M., Kondo T., Kato K., Tsuchiya N., Kawai A., Ochiya T	4. 巻 10
2. 論文標題 A serum microRNA classifier for the diagnosis of bone and soft tissue sarcomas of various histological subtypes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09143-8	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 土屋直人	4. 巻 296
2. 論文標題 野生型・変異型p53とマイクロRNA: ネットワーク理解とがん分子標的の同定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 390-395
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 無
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 Fujiwara Y, Saito M, Robles AI, Nishida M, Takeshita F, Watanabe M, Ochiya T, Yokota J, Kohno T, Harris CC, Tsuchiya N.	4. 巻 33
2. 論文標題 A Nucleolar Stress-Specific p53-miR-101 Molecular Circuit Functions as an Intrinsic Tumor-Suppressor Network.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 33-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.06.031.	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 Asano N, Matsuzaki J, Ichikawa M, Kawauchi J, Takizawa S, Aoki Y, Sakamoto H, Yoshida A, Kobayashi E, Tanzawa Y, Nakayama R, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Kondo T, Kato K, Tsuchiya N, Kawai A, Ochiya T	4. 巻 10
2. 論文標題 A serum microRNA classifier for the diagnosis of sarcomas of various histological subtypes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09143-8.	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 土屋 直人、山本 大樹、高本 悠真
2. 発表標題 腫瘍微小環境の制御におけるCMTM6の役割
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoto Tsuchiya
2. 発表標題 Extracellular miRNA and CMTM6 mediated inter- and intracellular communication in sarcoma metastasis.
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋 直人
2. 発表標題 CMTM6分泌による腫瘍微小環境の制御と転移誘発機構の関連
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukon Nishiyama, Naofumi Asana, Naoto Tsuchiya
2. 発表標題 miR-451a-CMTM6経路は肉腫の悪性化に關与する
3. 学会等名 日本がん学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Nishiyama, Naofumi Asano, Naoto Tsuchiya
2. 発表標題 CMTM6-mediated maintenance for the malignancy of sarcomas
3. 学会等名 Annual Meeting of American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Nishiyama, Naofumi Asano, Tadashi Kondo, Naoto Tsuchiya.
2. 発表標題 CMTM6 is a potential metastasis regulator of EWS cells.
3. 学会等名 AACR annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naofumi Asano, Juntaro Matsuzaki, Junpei Kawauchi, Satoko Takizawa, Eisuke Kobayashi, Robert Nakayama, Masaya Nakamura, Morio Matsumoto, Tadashi Kondo, Ken Kato, Naoto Tsuchiya, Akira Kawai, Takahiro Ochiya.
2. 発表標題 Development of diagnostic method for bone and soft tissue sarcomas of various histological subtypes using serum microRNA profiles.
3. 学会等名 ASCO annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山郵子、浅野尚文、近藤格、土屋直人
2. 発表標題 予後と相関するマイクロRNAによる肉腫の転移制御機構
3. 学会等名 日本RNA研究会・細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山郵子、浅野尚文、近藤格、土屋直人
2. 発表標題 肉腫におけるCMTM6による転移発症の分子ネットワークの解析
3. 学会等名 第77回日本がん学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野末悠馬、土屋直人
2. 発表標題 p53変異がん細胞の細胞周期制御におけるNEK9の役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------