

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07221

研究課題名(和文) SrcによるmicroRNAのエクソソーム内包メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of Src-mediated selective miRNA sorting into exosomes.

研究代表者

内藤 陽子 (NAITO, Yoko)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員(常勤)

研究者番号：10553026

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)：細胞外小胞エクソソームに内包されるmicroRNA(miRNA)による受容細胞への生理的・病理的作用が注目されるも、そもそもどのようにmiRNAが選択的にエクソソームへ内包されるかといったメカニズムは明らかでない。それに対して本研究では、Srcによるがん形質獲得において特定のmiRNAがエクソソームに内包されるメカニズムの解明に取り組んだ。Src依存的にエクソソームに内包されるmiRNAに結合するタンパク質の探索を行い、miRNAの運び屋となる候補因子を同定した。さらに、Srcと運び屋因子がどのようにmiRNAの内包化を制御しているかを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソーム内包miRNAの疾患依存的プロファイルや受容細胞への機能解析が多い中、本研究は、がん進展に伴うmiRNAのエクソソーム内包化の制御機構の解明に取り組んだ。エクソソームを標的としたがん治療の方法は、がん細胞によるエクソソーム分泌から受容細胞の取り込みの間の阻害に焦点が当てられている。それに対して、本研究は、エクソソーム伝播のさらに上流となる形成過程における、がん進展促進的なmiRNAの内包阻害といった新たな治療戦略の開発に貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：Exosomal microRNAs (miRNA) have been reported to be able to regulate multiple biological events and pathological processes. However, it's not clear how specific miRNAs are selectively sorted into exosome. Therefore, in this study, I investigated the mechanism(s) by which tumor-related miRNAs are internalized into exosomes during Src-mediated cancer progression. I identified candidate factor that could be carrier by binding to miRNAs and examined how Src and candidate carrier coordinately regulate the internalization of tumor-related miRNA into exosomes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エクソソーム miRNA がん進展 選択的内包化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞間コミュニケーションの破綻は細胞の異常な増殖・動態を引き起こし、がんの発生や悪性化につながる。細胞内情報伝達の重要因子である Src は、大腸がんや乳がんを始めとする様々ながん組織で異常な発現上昇や活性化が見られ、その程度はがんの悪性度に相関することが知られるチロシンキナーゼである。がん細胞で Src が活性化されている大半の原因は活性調節系の異常であると考えられており、活性化抑制的な制御因子の一つが Csk (C-terminal Src kinase) である。正常細胞に Src を過剰発現させてもがん化形質の獲得は弱い。Csk ノックアウト細胞に Src を発現させた細胞はがん化形質を獲得する。本研究では、この Src によりがん化可能なモデル細胞系を用いて解析する。がん細胞ではエクソソーム産生が増加することや、がん組織では腫瘍促進的 miRNA の上昇あるいは抑制的 miRNA の減少が知られる。また、がん細胞由来エクソソームの内包 miRNA は前転移ニッチ系形成などがん微小環境形成に寄与することが報告されている。興味深いことに、Src がん化細胞では非がん化細胞と比較してエクソソーム産生が亢進する。これらのことから、Src はエクソソーム産生に機能することで局所的な細胞内シグナル制御のみならず、生体内の遠隔地で細胞機能制御に寄与すると示唆される。これに対し申請者は、Src 活性化によるがん化に伴ったエクソソーム産生の変動は、“量”のみならず“質”つまり内包物にも変化がある可能性を考えた。そこで先行実験として、Src がん化モデル細胞系由来の各エクソソームに含まれる全 small RNA の次世代シーケンズを行った。RNA-seq で検出された約 200 種の miRNA 中、Src 活性依存的に内包量が増減していた約 30 種の miRNA を選定した。しかしこれらを細胞内 miRNA プロファイルと比較すると、選定したエクソソーム miRNA の細胞内量は変動していなかった。つまり、細胞内発現量によらず、Src により選択的にエクソソームに内包される miRNA の存在が明らかとなった。これより Src によってどの様に特定の miRNA がエクソソームに内包されるのかが問題点となった。miRNA のエクソソーム内包メカニズムは殆ど知られていないが、疾患関連 miRNA などエクソソーム特異的内包物の存在から、内包メカニズムの解明が重要視されつつあった。

### 2. 研究の目的

Src 制御下において特定の miRNA がエクソソームに内包されることが明らかとなったことを受け、本研究においては、Src によるがん化に伴って特定の miRNA が選択的にエクソソームに内包されるメカニズムを明白にし、それがどの様にがん微小環境形成に寄与するのかを解明することを目的とした。これにより、がん細胞の増殖や転移を促進する miRNA のエクソソームへの内包を標的とする阻害薬など、がん治療・予防法の開発に有用な知見を得ることを目指した。このために以下の目標に取り組んだ。

- 1) Src 活性依存的に内包される miRNA に結合するタンパク質 = “運び屋”の同定
- 2) 運び屋候補による miRNA のエクソソーム内包に対する寄与の検証
- 3) Src による運び屋因子の制御メカニズムの解析

### 3. 研究の方法

Src がん化細胞由来エクソソームで内包量の変動が大きかった miRNA の中で、胃がんや転移性前立腺がん患者の血中で発現が高いことや、機能的にも大腸がん、乳がん、肝がんなどで腫瘍促進的作用について報告がある miRNA (miR-A とする) に焦点を当てて以下の実験を行った。

#### 1) Src 活性依存的に内包される miR-A に結合するタンパク質 = “運び屋”の同定

選択的な miRNA のエクソソーム内包機構を明らかにするため、miR-A 特異的な結合因子を探索し“運び屋”候補タンパク質を同定した。miR-A 結合因子の探索は RNA プルダウンアッセイを行った。さらに miR-A 特異的な沈降物の質量分析解析を行い、miR-A 結合タンパク質を同定した。

#### 2) 運び屋候補による miR-A のエクソソーム内包に対する寄与の検証

選定した運び屋候補タンパク質を阻害し、miR-A のエクソソーム内包が抑制されるかを検証した。Src がん化細胞で運び屋因子の遺伝子ノックアウトおよび回復実験を行い、これらの細胞が産生するエクソソーム内包 miR-A の量をリアルタイム RT-qPCR で調べた。

#### 3) Src による miR-A 結合因子の制御メカニズムの解析

Src 活性依存的な発現量の制御についての検証には、Src がん化モデル細胞系あるいは、Dasatinib 処理したがん細胞を用いたウェスタンブロットを行った。さらに、Src 活性依存的な miR-A 結合因子の分泌については、Src がん化モデル細胞由来のエクソソームライセートを用いたウェスタンブロットを行った。

#### 4) 運び屋因子によってエクソソームへ内包される miRNA の探索

Src 活性の高いがん細胞株を用いて、運び屋 X のノックダウン細胞株を作成し、この細胞由来

のエクソソームに内包される miRNA を用いて miRNA-Seq を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) Src 活性依存的に内包される miR-A に結合するタンパク質 = “運び屋”の同定

miR-A 結合因子の探索のために、まず RNA プルダウンアッセイ (ベイト: ピオチン修飾 miR-A あるいは miR-A スランブル配列、プレイ: エクソソーム内包タンパク質あるいは細胞内タンパク質) を行った(図 1)。さらに miR-A 特異的な沈降物 (図 1 中の\*印) の質量分析解析を行った。これらの候補のうち、既知の報告において RNA 結合能や、エクソソームもしくは膜輸送との関連が知られていること、さらに我々が行った Src 活性化細胞由来のエクソソーム内包物の解析結果をもとに、9 つの結合因子候補を選定した。

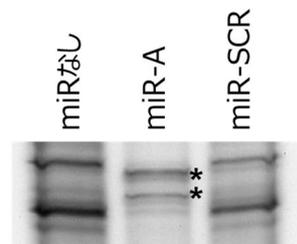


図 1 . プルダウンによる miR-A 特異的な結合因子の同定

次に、選定した候補因子の過剰発現株を作成し、各因子と miR-A が結合するかをプルダウン・ウェスタンブロッティングアッセイにより確認した。これにより、複数の miR-A 結合因子を同定した。

##### 2) 運び屋候補による miR-A のエクソソーム内包に対する寄与の検証

選定した miR-A 結合タンパク質を阻害し、miR-A のエクソソーム内包が抑制されるかを検証した。Src がん化細胞において miR-A 結合因子の遺伝子ノックアウトおよび回復実験を行い、これらの細胞が産生するエクソソーム内包 miR-A の量をリアルタイム RT-qPCR で調べた。その結果、遺伝子 X の阻害によって、細胞内 miR-A の発現量はあまり変動させずに、エクソソーム内包 miR-A の量を減少させることが判明した。この因子を運び屋 X とした。つまり Src 依存的にエクソソームへと内包される miRNA である miR-A は、運び屋 X に結合してエクソソーム内へと誘導されると考えられる。また、この運び屋 X の阻害によってエクソソーム産生量の変動はないことも確認した。

##### 3) Src による運び屋 X の制御メカニズムの解析

Src 活性依存的に細胞内の運び屋 X の発現量が制御されているかの検証を行った。Src がん化モデル細胞系あるいは、Dasatinib 処理したがん細胞を用いて、運び屋 X の発現量の変動をウェスタンブロットにて調べた。その結果、運び屋 X の細胞内発現量は Src 活性に非依存的であることが分かった。

さらに、Src 活性が運び屋 X タンパク質の分泌に寄与するかを調べた。Src がん化モデル細胞由来のエクソソームライセートを用いたウェスタンブロットを行ったところ、Src 細胞由来のエクソソームにおいての運び屋 X の増加が見られたことより、Src 活性により運び屋 X の分泌が増加することが分かった

他にも、蛍光免疫染色法によって Src 活性依存的に運び屋 X の細胞内分布、膜への移行が変動するかや、プルダウンによって Src 活性依存的に運び屋 X と miR-A との親和性が変動するかについての検証を行った。

##### 4) 運び屋 X 依存的にエクソソームへ内包される miRNA の探索

Src 活性の高いがん細胞株を用いて、運び屋 X のノックダウン細胞株を作成した。この細胞由来のエクソソームに内包される miRNA について次世代シーケンシングによるプロファイリングを行った。がん進展との関連性などから、運び屋 X 依存的にエクソソームに内包される複数の miRNA を選定した。さらに同サンプルを用いてリアルタイム RT-PCR を行うことで、それらの内包化の検証を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------