

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10332

研究課題名(和文) HBp17/FGFBPを制御するエクソソーム由来miRNAによる口腔癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of oral cancer therapy using exosome-derived miRNAs that regulate HBp17/FGFBP

研究代表者

新谷 智章 (Shintani, Tomoaki)

広島大学・病院(歯)・講師

研究者番号：90403518

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)：HBp17/FGFBP-1のmiRNAの制御の可能性を探るため、ED-71で処理したA431細胞の培地からエクソソームmiRNAを解析した。マイクロアレイ解析の結果、ED-71で処理した細胞では12種類のmiRNAが発現上昇していた。MiR-6887-5pは、HBp17/FGFBP-1の3'-UTRと一致していた。SCC/OSCC細胞において、HBp17/FGFBP-1の3'-UTRがmiR-6887-5pの標的であることがレポーターアッセイで確認された。癌細胞におけるmiR-6887-5pの過剰発現は、in vitroでの細胞増殖、コロニー形成及びマウスで腫瘍増殖を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、ED-71がSCC/OSCC細胞のエクソソームmiR-6887-5pを刺激すること、そしてmiR-6887-5pがHBp17/FGFBP-1を直接標的とすることにより、in vitroおよびin vivoでの腫瘍増殖、SCC/OSCC細胞のコロニー形成を抑制することを報告した。我々の知見は、エクソソームmiR-6887-5pが、1,25(OH)2D3およびそのアナログの高カルシウム血症効果を回避しつつ、HBp17/FGFBP-1を標的とするSCC腫瘍の治療薬となることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that Eldecacitol (ED-71), an analog of 1,25(OH)2D3, downregulated the expression of HBp17/FGFBP-1 and inhibited the proliferation of squamous cell carcinoma (SCC) cells in vitro and in vivo through NF- κ B inhibition. To explore the possibility of microRNA (miRNA) control of HBp17/FGFBP-1, we analyzed exosomal miRNAs from medium conditioned by A431 cells treated with ED-71. Microarray analysis revealed that 12 exosomal miRNAs were upregulated in ED-71-treated A431 cells. MiR-6887-5p was identified to have a predicted mRNA target matching the 3'-UTR of HBp17/FGFBP-1. The 3'-UTR of HBp17/FGFBP-1 was confirmed to be a direct target of miR-6887-5p in SCC/OSCC cells, as assessed with a luciferase reporter assay. Functional assessment revealed that overexpression of miR-6887-5p in SCC/OSCC cells inhibited cell proliferation and colony formation in vitro, and inhibited tumor growth in vivo compared with control.

研究分野：口腔外科学

キーワード：微小環境 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘパリン結合タンパク質 17 (HBp17) は、1991 年に A431 細胞の調整培地から初めて精製され、後に線維芽細胞増殖因子結合タンパク質 1 (FGFBP-1) と改名された。この 17kDa の分子は、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 1 および 2 に可逆的に結合し、シャペロンとして働く能力に基づいて単離された。

In vitro および in vivo で Cyp24A1 を大量に誘導しても ED-71 の抗腫瘍活性が影響を受けないことを示すことで、ED-71 の 24-水酸化酵素に対する耐性を明らかにした。さらに、HBp17/FGFBP-1 の発現をダウンレギュレートすることにより、ED-71 が in vivo および in vitro の両方で扁平上皮がん (SCC) に対する抗腫瘍活性を示すことを示した。

2. 研究の目的

本研究では、エクソソーム miRNA の miRNA マイクロアレイ解析により、ED-71 処理-A431 細胞において 12 個のアップレギュレート miRNA と 1 個のダウンレギュレート miRNA が明らかになった。HBp17/FGFBP-1 mRNA の 3' -UTR は、ルシフェラーゼアッセイを用いて miR-6887-5p の直接標的遺伝子であることが確認された。次に、SCC/OSCC 細胞における miR-6887-5p の潜在的な役割について、HBp17/FGFBP-1 の発現および SCC/OSCC 細胞の腫瘍形成能に対する影響を調べることで検討した。

3. 研究の方法

(1) A431 細胞培養液からの SCC/OSCC 由来エクソソームの調製

エクソソーム表面のホスファチジルセリンとの相互作用に基づくイムノアフィニティー法を用いて、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS を用いて、メーカーの指示に従ってエクソソームを精製した。

(2) A431 由来エクソソームの miRNA マイクロアレイ解析

A431 由来エクソソームの miRNA プロファイルに対する ED-71 の影響を調べた。miRNeasy Serum/Plasma Kit を用いて精製したエクソソームから、RNA を抽出した。サンプルは miRCURYHy3/Hy5 Power Labeling Kit を用いて標識し、ヒト miRNA オリゴチップにハイブリダイズした。チップは 3D-Gene Scanner 3000 でスキャンした。結果は 3D-Gene extraction software を用いて解析した。

(3) miR-6887-5p 標的遺伝子の予測とデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

(4) 細胞増殖およびコロニー形成アッセイ

無血清培養における細胞の増殖に対する miR-6887-5p と miR-451a の影響を調べた。

(5) 動物実験

miR-6887-5p 模倣体または miR-NC でトランスフェクトした A431 細胞または Ca9-22 細胞を 0.2mL の DF 栄養培地に懸濁した後、マウス背部に皮下注射した。A431 細胞および Ca9-22 細胞を投与したマウスは、それぞれ注射から 39 日後および 60 日後に犠牲にした。

4. 研究成果

(1) A431-CM から精製したエクソソームの評価

走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態学的観察、およびエクソソームのバイオマーカーである CD9 とエクソソームの NC であるシトクロム c のウェスタンブロット分析により、A431 由来のエクソソームの質を評価した。SEM イメージングによると、エクソソームは直径 30 ~ 150nm の扁平な球状であった。CD9 の発現とシトクロム c の非存在がウェスタンブロット分析によって確認された (図 1a)。

(2) マイクロアレイ解析による A431 エクソソーム miRNA の同定

エクソソーム miRNA プロファイルは、マイクロアレイ解析によって得られた。ED-71 処理細胞とコントロール細胞の miRNA プロファイルを比較した統計解析の結果、13 種類の発現量の異なる miRNA が検出され、そのうち 12 種類が発現上昇していた (図 1b)。

(3) MiR-6887-5p は HBp17/FGFBP-1 を標的とする

HBp17/FGFBP-1 は、バイオインフォマティクスデータベース TargetScan によって、8 塩基の配列 (GUCCCC) に基づいて、推定 miR-6887-5p 標的として選択された (図 2a)。HBp17/FGFBP-1 の野生型 3' -UTR レポーターは、miR-6887-5p をトランスフェクトした細胞では、miR-NC をトランスフェクトした細胞と比較して、ルシフェラーゼ活性の有意な減少を示した ($p < 0.05$) (図 2b)。miR-6887-5p は HBp17/FGFBP-1 mRNA と直接相互作用するという結論が強く支持される。

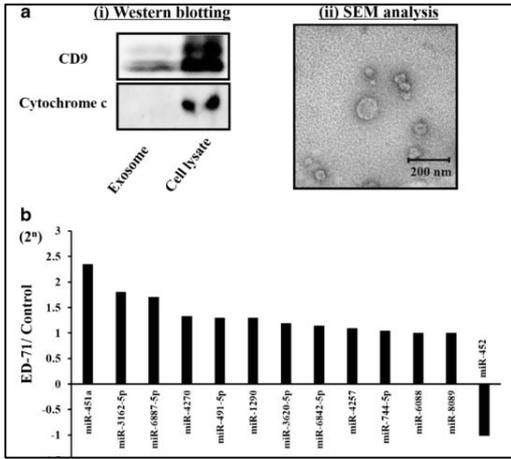


図 1

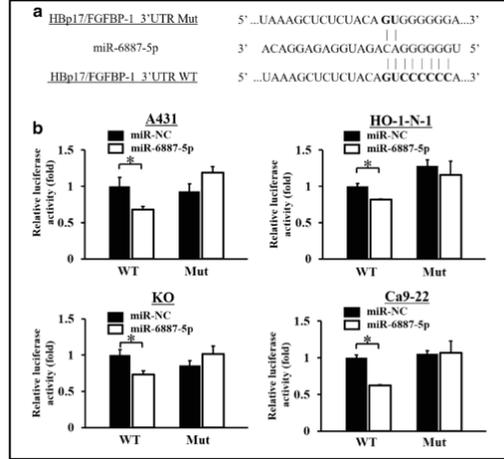


図 2

(4) miR-6887-5p の過剰発現は *in vitro* での SCC/OSCC 細胞の増殖を抑制する
 SCC/OSCC 細胞の増殖に対する miR-6887-5p の生物学的役割を調べた。miR-6887-5p を過剰発現した SCC/OSCC 細胞の増殖率は、miR-NC を発現した細胞よりも低かった (図 3a)。細胞増殖に対する miR-6887-5p の影響もコロニー形成アッセイを用いて評価した。miR-6887-5p をトランスフェクトした細胞は、miR-NC をトランスフェクトした細胞よりもコロニーの形成が少なかった (図 3b)。

(5) miR-6887-5p はヌードマウスにおける腫瘍増殖を阻害する

in vivo での SCC/OSCC 腫瘍増殖に対する miR-6887-5p の効果を調べるため、miR-6887-5p 模倣体または miR-NC 模倣体をトランスフェクトした A431 または Ca9-22 細胞を無胸腺ヌードマウスに移植した。A431 と Ca9-22 の腫瘍サイズを週 2 回測定し、それぞれ 39 日目と 60 日目に動物を犠牲にした。miR-6887-5p を導入した A431 細胞の腫瘍増殖は、miR-NC を導入した A431 細胞よりも抑制された (図 4a)。miR-6887-5p を導入した A431 腫瘍の腫瘍体積は、miR-NC を導入した腫瘍よりも小さかった (図 4b)。miR-6887-5p グループの腫瘍重量の減少は明らかであった (図 4c)。さらに、腫瘍増殖に対する miR-6887-5p の顕著な効果が Ca9-22 腫瘍で観察された。

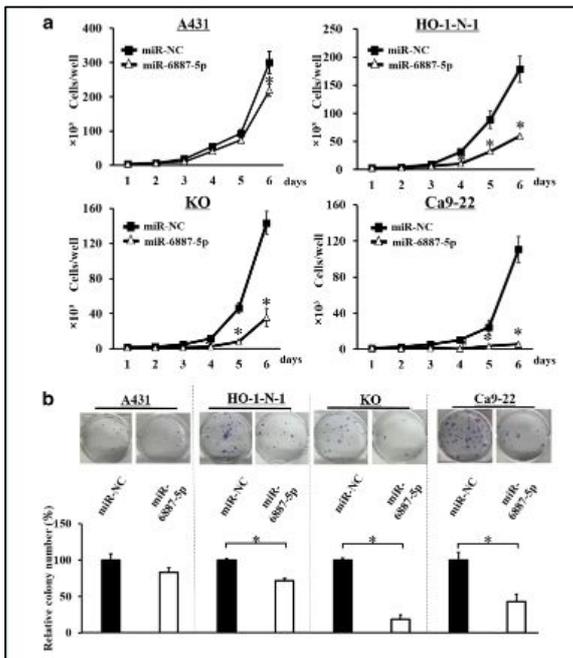


図 3

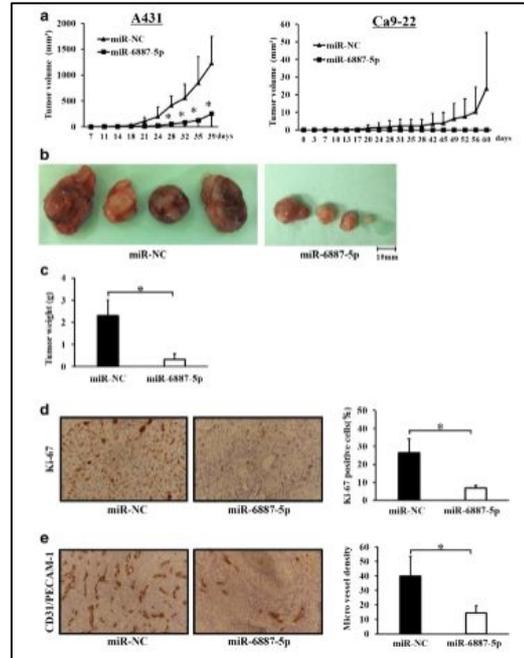


図 4

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
研究分担者	岡本 哲治 (Okamoto Tetsuji) (00169153)	東亜大学・その他の研究科・教授 (35503)	
研究分担者	林堂 安貴 (Hayashido Yasutaka) (70243251)	広島大学・病院(歯)・講師 (15401)	

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