

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 8日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791819

研究課題名（和文）エクソソームによる子宮内膜の細胞間情報伝達の分子機構と内膜癌化に関する基礎研究

研究課題名（英文）Cell-to-cell communication via exosome transfer in endometrial cancer

## 研究代表者

毎田 佳子（MAIDA YOSHIKO）

独立行政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：20397219

研究成果の概要（和文）：エクソソームは直径数 10nm の細胞外分泌小胞であり、新たな細胞間情報伝達分子として注目されている。本研究課題では子宮内膜癌細胞と子宮内膜間質細胞とのエクソソームを介した情報伝達機構につき検討し、内膜癌細胞から内膜間質細胞へとエクソソームを介した機能性 small RNA の受け渡しが証明された。子宮内膜癌細胞は、エクソソーム内 RNA の授受を介して内膜間質細胞の遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Exosomes are small membrane vesicles containing various RNAs. Recent evidence suggests that human cells communicate with each other by exchanging exosomes. We found that endometrial cancer cells transmit gene regulatory small RNAs to endometrial fibroblasts using exosomes as vehicles. The results indicate a novel cell-to-cell communication between cancer cells and stromal cells via exosome transfer.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌、exosome、microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

細胞間の情報伝達分子として新たに注目されている分子にエクソソームがある。エクソソームは直径 50～80nm の細胞外分泌小胞で種々の細胞から分泌されており、ヒトの体液中には多くのエクソソームが存在している。エクソソームには蛋白や核酸など様々な分子が含まれており、ヒトの細胞はエクソソームの授受を介してこれらの分子の遣り取りが可能であると考えられている。エクソソームに内包される RNA としてメッセンジャー RNA (mRNA) や microRNA (miRNA) が報告されているが、特にエクソソーム内 miRNA の種

類や量はエクソソームを分泌した細胞の種類や病態によって異なっており、新たなバイオマーカーとしての利用が期待されている。エクソソーム内 RNA の機能の有無に関して、ヒトの細胞から分泌されたエクソソーム内 mRNA が、他の細胞内でタンパク質に翻訳可能であることが実験的に示されている。この報告は、エクソソーム内 RNA を介してヒト細胞が相互に遺伝子発現を制御し合う新たな細胞間コミュニケーション機構の存在を示唆しているが、その生理的意義、病理学的意義は未だ明らかではない。

上皮から発生する癌は周囲に間質を伴う。癌間質細胞は癌の増殖や浸潤、転移に密接に

関与していることが示唆されている。癌に特異的な微小環境の維持や癌の病態形成には、癌細胞と癌間質細胞との細胞間コミュニケーションを介した連携が重要と考えられている。一方、がんと miRNA との関連については、発がん促進的あるいは抑制的に働く miRNA の存在や、転移に関連する miRNA など、個々の miRNA の機能に注目した多くの研究が進められており、種々のがん腫において miRNA ががん形質の獲得に関与していると考えられている。

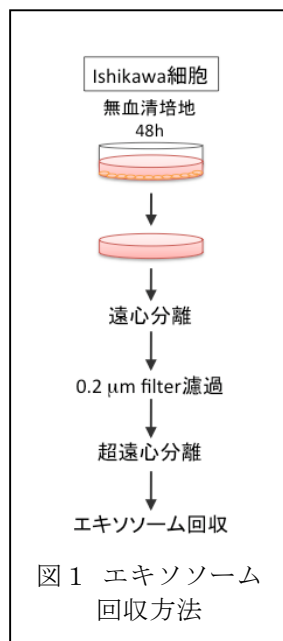
## 2. 研究の目的

本研究では子宮内膜を用いて、上皮細胞と間質細胞、正常細胞と癌細胞とがエクソソーム内 RNA を介して行う細胞間コミュニケーションの分子機構を明らかにし、エクソソーム内 RNA により伝搬される情報や機能が子宮内膜の癌化に如何に関与するかを明らかにする。これらの検討により、エクソソーム内 RNA を介した細胞間情報伝達の生物学的意義を解明し、エクソソーム内包 RNA を細胞間情報伝達の新たな制御手段として内膜癌の診断や治療に応用することを最終目標とする。

## 3. 研究の方法

子宮内膜癌細胞株 Ishikawa の無血清培養上清より超遠心にてエクソソームを回収し (図 1)、1) エクソソームの細胞間授受、2) エクソソーム内包 RNA のプロファイリング、3) エクソソーム内包 RNA の内膜間質細胞への受け渡しについて検討した。

子宮内膜間質細胞は informed consent の得られた提供者の摘出子宮より分離培養した。



## 4. 研究成果

### (1) 子宮内膜癌細胞由来のエクソソームの回収

子宮内膜癌細胞が分泌するエクソソームを超遠心にて分離し、電子顕微鏡による大き

さ、形態の確認、エクソソームマーカーである CD63 の発現の確認を行った (図 2)。

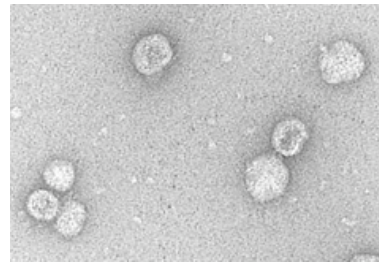


図 2 Ishikawa 細胞由来のエクソソーム (電顕像)

### (2) 子宮内膜癌細胞由来のエクソソーム内 RNA と細胞内 RNA との発現プロファイルの比較

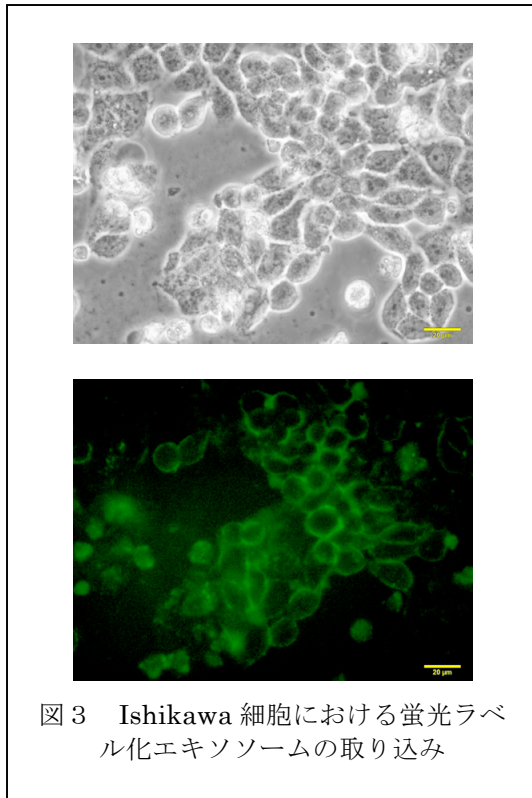
エクソソームを分泌する子宮内膜癌細胞および分泌されたエクソソームより各々 RNA を抽出し、RNA の鎖長分布ならびに発現する RNA の種類についてマイクロアレイを用いて検討した。エクソソームには鎖長の短い RNA が豊富に含まれること、および、miRNA の選択的な取り込みが見られることを明らかにした。

### (3) 子宮内膜癌細胞由来エクソソームの細胞間授受に関する検討

子宮内膜癌細胞が分泌するエクソソームを蛍光タンパクでラベルした。子宮内膜癌細胞、正常子宮内膜上皮細胞、正常子宮内膜間質細胞、子宮内膜癌間質細胞を用いて、子宮内膜癌が分泌した蛍光ラベル化エクソソームの取り込みの有無を検討した (図 3)。実験に用いた細胞間で、子宮内膜癌細胞由来エクソソームの受け取りやすさに差があることを明らかにした。

### (4) 子宮内膜癌細胞由来のエクソソームを介した機能性 small RNA の細胞間授受に関する検討

子宮内膜癌細胞に target の short hairpin RNA (shRNA) もしくは non-target の shRNA を導入し、各 shRNA が子宮内膜癌の分泌するエクソソームに取り込まれていることを確認した。それらのエクソソームを子宮内膜間質細胞に添加し、target の shRNA を含むエクソソームを添加した場合に特異的に子宮内膜間質細胞内での target shRNA の発現上昇と target 遺伝子に対する発現抑制が観察さ



れることを確認した。この結果から、機能性の shRNA が子宮内膜癌細胞由来のエクソソームを介して子宮内膜間質細胞へと輸送されることが示唆された。

(5) 子宮内膜癌細胞と子宮内膜間質細胞との miRNA 発現プロファイルの比較

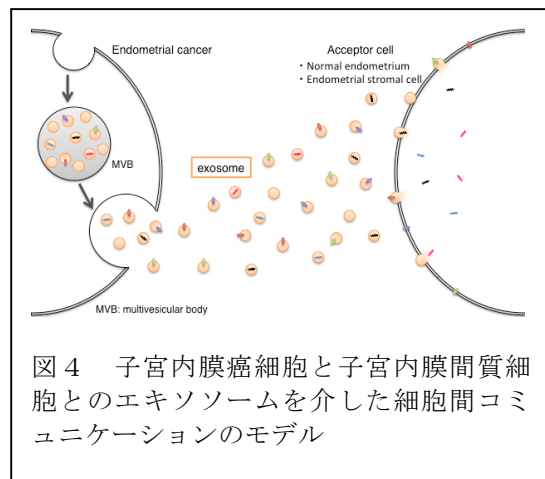
子宮内膜癌細胞と子宮内膜間質細胞との miRNA の発現プロファイルを比較し、子宮内膜間質細胞の多くは子宮内膜癌細胞とは異なるクラスターに分類されることを明らかにした。

(6) 子宮内膜癌細胞由来のエクソソームを介した機能性 miRNA の細胞間授受に関する検討

子宮内膜癌細胞のエクソソームに豊富に存在し、子宮内膜間質細胞での発現量の低い miRNA について、子宮内膜癌由来のエクソソーム添加による子宮内膜間質細胞での発現量の変化を検討した。エクソソーム添加により、子宮内膜間質細胞での当該 miRNA の発現が外来性に増加すること、および、増加した当該 miRNA が機能性であることが示唆された。

本研究により、子宮内膜癌細胞から子宮内膜間質細胞へとエクソソームを介して機能性の small RNA が受け渡されていることが証

明された (図4)。



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)

[学会発表] (計4件)

1. 毎田佳子、京哲、保野由紀子、水本泰成、中村充宏、高倉正博、井上正樹. 子宮内膜癌細胞が分泌する RNA を介した細胞間コミュニケーション. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 2013年5月10日, 札幌市.
2. 毎田佳子、京哲、張秀智、保野由紀子、水本泰成、中村充宏、高倉正博、西内巧、井上正樹. Cell-to-cell communication via exosome transfer in endometrial cancer. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月20日, 札幌市.
3. 毎田佳子、京哲、保野由紀子、水本泰成、中村充宏、高倉正博、西内巧、井上正樹. 子宮内膜癌細胞が分泌する RNA と細胞間コミュニケーション. 第52回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 2012年7月19日, 東京都.
4. 毎田佳子、京哲、保野由紀子、水本泰成、中村充宏、高倉正博、西内巧、井上正樹. 子宮内膜癌細胞における細胞外分泌 microRNA と細胞間コミュニケーション. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会, 2012年4月13日, 神戸市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

毎田 佳子 (MAIDA YOSHIKO)

独立行政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：20397219

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし