

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592235

研究課題名(和文) miRNAを含むエクソソームを用いた骨腫瘍治療への応用

研究課題名(英文) Exosome-formed miRNA for the treatment of osteosarcoma

研究代表者

下瀬 省二(Shimose, Shoji)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：30304439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨肉腫細胞株(143B)の増殖抑制または転移を抑制するようなmiRNAに注目し、微小胞であるエクソソームに包まれて細胞外に放出される分泌型のエクソソームフォームmiRNAを利用することで治療に応用することを目的とした。間葉系幹細胞へ合成 miR-143 を導入すると培養上清中にエクソソームフォームのmiR-143として放出し、143Bに容易に毒性なく取込まれ、細胞遊走能を抑制することを明らかにした。骨肉腫細胞に対して有効なmiRNAのデリバリーツールとしてエクソソームフォームmiRNAは、新たな治療法の開発に向けた可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) have emerged as potential anticancer agents, but their clinical application is limited by the lack of an effective delivery system to tumors. Exosomes are small vesicles that play important roles in intercellular communication. Here, we show that synthetic miR-143 introduced into cells is released enveloped in exosomes and that the secreted exosome-formed miR-143 is transferred to osteosarcoma cells. The delivery of exosome-formed miR-143 significantly reduced the migration of osteosarcoma cells. The delivery efficiency of exosome-formed miR-143 was less than that achieved with lipofection, but the migratory potential of osteosarcoma cells was similarly inhibited after both strategies. Our results suggest that exosomes can deliver synthetic miR-143 and are a potentially efficient and functional delivery system.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 microRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

骨軟部悪性腫瘍は、多種多様な腫瘍が含まれ、悪性度も様々で、同一の腫瘍でさえも組織像が多彩なため、確定診断および治療に難渋する例が少なくない。それゆえ、骨軟部悪性腫瘍の治療における、従来とは異なる革新的な治療を開発することが望まれている。近年、タンパク質に翻訳されないmicroRNA (miRNA) が新しい遺伝子制御因子として細胞の増殖、分化、アポトーシスなどといった生命現象や疾患に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。特に多くのmiRNAが発癌と密接な関連があるという報告がなされており、miRNAの癌遺伝子および癌抑制遺伝子としての役割が注目されている。これらmiRNAは、これまで細胞内で機能し、速やかに分解されると考えられていた。しかし、miRNAは、エクソソームといったエンドソーム由来の小胞顆粒に包まれた形で細胞外に分泌し、血漿など体液中に存在し、循環していることが明らかになってきた。さらに興味深いことは、細胞より分泌されたmiRNAは、標的細胞内へ移動し、遺伝子の発現を制御することで標的細胞の機能を制御していることが報告された。このことは、分泌miRNAが組織間、細胞間を行きかい相互作用するサイトカインのような機能があると考えられる。以上のことからmiRNAを含んだエクソソームに注目する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新たな細胞間コミュニケーション因子として注目を集めている分泌microRNAを含む“エクソソーム”が骨悪性腫瘍治療に応用できるかを検討するものである。そのために(1)マウス骨肉腫モデルへのmiRNAを含むエクソソーム投与による治療効果とその局在を明らかにする(2)骨肉腫細胞より分泌するエクソソームの機能とその局在を決定する。最後に(3)磁性化エクソソームを作製し、外磁場装置を用いたドラッグデリバリーシステム(DDS)と組み合わせることにより臨床応用の可能性を明らかにすることで次世代の治療ツールになることを期待する。

3. 研究の方法

(1) 培養上清中へのmiRNA分泌

① これまでに高転移能を有するヒト骨肉腫細胞株(143B)へのmiR-143の過剰発現は、その遊走能を減少させ、肺への転移を抑制することが報告されている。そこで、miR-143に注目し、間葉系幹細胞(MSC)へ合成miR-143を10nM、50nMとリポソーム法により過剰導入し、培養した。24時間後、細胞および培養上清よりsmall RNAを精製し、miR-143量をリアルタイムPCRにより測定した。

② 分泌された培養上清中のmiR-143の機能を調べるために、143B細胞へ培養上清を添加し、143B細胞への取込み、増殖能と遊走能への影響を調べた。

の影響を調べた。

(2) エクソソームフォーム miR-143

① MSCへの合成miR-143導入によりエクソソームの分泌量への影響を調べるために、Qnanoシステムにより微粒子数を測定した。また、エクソソームマーカーとして知られているFlotillin-1などの抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。

② エクソソームを含む培養上清およびその培養上清を超遠心法によりエクソソーム層とそれ以外の上清に分離し、この3種類のサンプルよりsmall RNAを精製し、各層におけるmiR-143の量をリアルタイムPCRにより測定した。

③ 培養上清およびエクソソーム層とエクソソーム除いた上清の3種類を各々143B細胞へ添加し、細胞への取込みや遊走能への影響を調べた。

(3) 既存のリポフェクション法とエクソソームフォームによるmiRNAの導入効果の検討

① リポソーム法とエクソソームフォームによるmiR-143の143B細胞への取込みおよび増殖能と遊走能への影響を調べた。

(4) 高転移能を有するヒト骨肉腫細胞株143Bと有さないHOSのエクソソームの違い

① エクソソームを含む培養上清とエクソソーム、そして、エクソソームを除いた培養上清を用いて間葉系幹細胞の細胞遊走能を調べた。

② HOSと143B細胞より分泌しているエクソソーム中のmiRNAをnCounterシステムによりプロファイリング解析を行った。

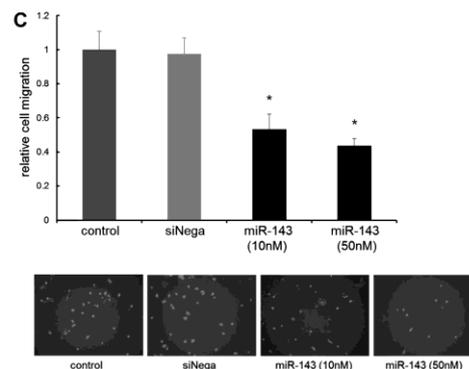
4. 研究成果

(1) 培養上清中へのmiRNA分泌

① MSCへの合成miR-143の過剰導入は、細胞および培養上清中におけるmiR-143を濃度依存的に増加させることを明らかにした。

② ①で明らかになったように、miR-143が豊富に存在している培養上清は、143B細胞への添加により濃度依存的に細胞内へ取込まれた。この細胞は、増殖能には影響を及ぼさなかったが、遊走能を有意に抑制した(図1)。

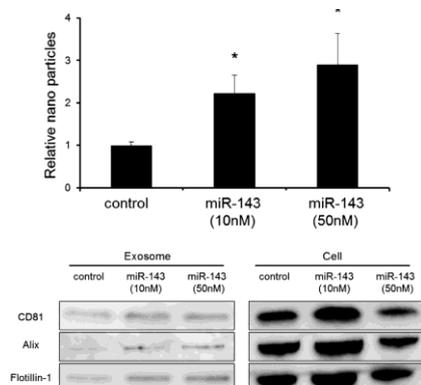
図1. 分泌miRNAによる細胞遊走の抑制



## (2) エクソソームフォーム miR-143

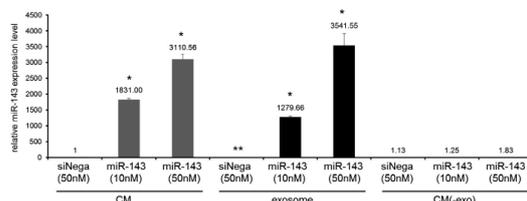
① MSC への合成 miR-143 導入によりエクソソームの分泌量は、粒子数およびエクソソームマーカー量ともに増加していた (図 2)。

図2. 合成 miRNA 導入によるエクソソーム分泌への影響



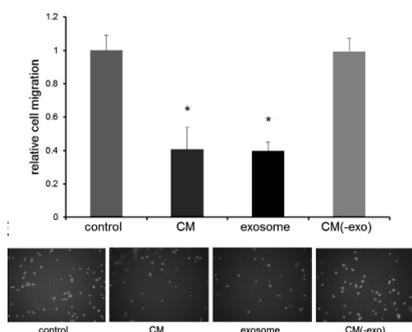
② 培養上清 (CM)、エクソソーム (exosome) とエクソソームを除いた培養上清 (CM-exo) における miR-143 の存在は、培養上清中とエクソソーム層に多く含まれていた (図 3)。このことより、培養上清に分泌した miRNA は、エクソソームフォームとして存在していることが示唆された。

図3. エクソソーム層における miR-143



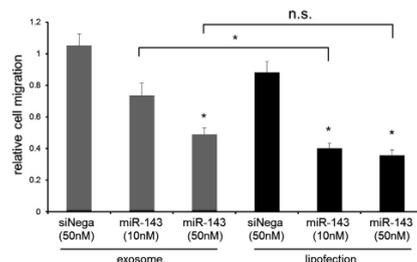
③ ②の結果を支持するように培養上清 (CM)、エクソソーム (exosome) とエクソソーム除いた上清 (CM-exo) の添加による遊走能への影響は、培養上清とエクソソームの添加により遊走能を有意に抑制した (図 4)。

図4. エクソソームフォーム miR-143 による遊走抑制



(3) 既存のリポフェクション法とエクソソームフォームによる miRNA の導入効果を検討した結果、リポソーム法はエクソソームフォームより多くの miR-143 を導入することはできるが、細胞遊走能の抑制効果は、エクソソームフォームとリポフェクション法 (50nM) による有意な差はなかった (図 5)。

図5. リポフェクション法とエクソソームフォームによる遊走抑制効果の比較



(4) 高転移能を有するヒト骨肉腫細胞株 143B と有さない HOS のエクソソームの違い

① エクソソームを含む培養上清とエクソソーム、そして、エクソソームを除いた培養上清を用いて間葉系幹細胞の細胞遊走能への効果を調べた。エクソソームを含む培養上清とエクソソームのみでその遊走能が増加し、特にエクソソームのみで遊走能が増加していた。

② そこで HOS と 143B 細胞で発現している miRNA および分泌しているエクソソーム中の miRNA を nCounter システムによりプロファイリング解析を行った。その結果、143B の細胞内で発現が HOS に比べて 2 倍以上増加していた miRNA は 40 種、エクソソーム中の miRNA も 40 種であった。そして、細胞内とエクソソーム中で共通している miRNA は 6 種のみであった。以上により各々の細胞間における分泌 miRNA の種類や発現量に違いがあり、必ずしも細胞内で発現している miRNA とエクソソーム中に存在する miRNA が一致するわけではなかった。

今後、さらに miRNA を含むエクソソームが骨肉腫や転移に関与しているかを明らかにしていくことが重要であるが、本研究より新たな DDS としてエクソソームを利用した miRNA の補充療法の開発に向けて可能性を示す結果を得た。

## 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Shimbo K, Miyaki S, Ishitobi H, Kato Y, Kubo T, Shimose S, Ochi M. Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 445 (2): 381-387, 2014.

〔学会発表〕（計1件）

1. 新保慶輔、味八木茂、下瀬省二、久保忠彦、藤森淳、越智光夫 分泌型 microRNA による骨肉腫細胞への抑制効果 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 平成25年10月17日、18日 幕張メッセ国際会議場（千葉市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下瀬 省二 (Shimose Shouji)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
准教授  
研究者番号：30304439

(2) 研究分担者

越智 光夫 (Ochi Mitsuo)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
教授  
研究者番号：70177244

久保 忠彦 (Kubo Tadahiko)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：70397959

味八木 茂 (Miyaki Shigeru)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：10392490