

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659500

研究課題名(和文)患者樹状細胞由来のexosomeを用いた腫瘍選択的核酸デリバリー

研究課題名(英文)Tumor specific delivery of nucleic acid using patient's dendritic cell-derived exosome

研究代表者

細井 創 (Hosoi, Hajime)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20238744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：小児がんの予後の改善のためには革新的な治療法の導入が必要である。近年、がん抑制的に働くmicroRNAが同定され治療薬として期待されている。我々は、microRNAの細胞間輸送に用いられるexosomeをドラッグデリバリーの手段として用いるための検討を行った。今回の検討では、小児がん細胞はexosomeを分泌していること、小児がんexosome由来のmicroRNA発現は小児がん細胞のmicroRNA発現を反映すること、小児がん細胞においてexosomeがmicroRNAの細胞間輸送に用いられていることを示した。ドラッグデリバリーの手段としてexosomeが有用である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Innovative therapeutics is required to improve prognosis of pediatric cancer. Several tumor suppressor microRNAs are identified and clinical application of microRNAs are suggested. Exosome plays important roles in intercellular communication of microRNA. We examined if exosome can be used to deliver tumor suppressor microRNA to pediatric cancer cells. It is revealed that pediatric cancer cells secrete exosome, that expression pattern of exosome-derived microRNA is similar to that of cellular microRNA and that exosome functions as means of intercellular communication. Our findings suggested that exosome can be used as means of microRNA delivery.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学・小児腫瘍学

キーワード：exosome 小児がん microRNA ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

小児がんの生存率は概ね改善したものの、一部の高リスクの小児がんは依然として予後不良である。予後の改善のために革新的な治療法の導入が必要である。近年、がん抑制的に働く microRNA が複数同定され治療薬としての可能性が示唆されているが、実際に治療薬として用いるには、ヒト細胞内へのドラッグデリバリーの点で大きな障壁が存在する。我々は、microRNA の生理的な細胞間輸送に用いられる exosome をドラッグデリバリー的手段として用いる革新的な治療法を提唱する。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍表面抗原結合ペプチドを表出し、がん抑制的に働く microRNA を内包する exosome を、*ex vivo* で培養した患者自身の樹状細胞を用いて作成し、腫瘍選択的に microRNA をデリバリーし治療に用いることを最終目標とする。

今回の検討では、小児がん細胞株における exosome の動態について検討を行った。

3. 研究の方法

使用した小児がん細胞株

ヒト胞巣型横紋筋肉腫細胞株 Rh30、Rh41、ヒト胎児型横紋筋肉腫細胞株 RD、ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y を用いて検討を行った。

exosome の回収

Exosome の回収は 300g・10分、2000g・10分、10000g・30分 で遠心し、それぞれ上清を回収した。上清を 120000g・70分 で超遠心し、ペレットを exosome として回収した。

exosome における発現タンパクの同定

exosome からタンパクを抽出し、ウエスタンブロッティングにより CD63、 $\beta$ -actin を

検出した。

exosome 内の microRNA の定量

QIAzol により Exosome から total RNA を抽出し、cDNA 合成、リアルタイム PCR による定量を行った。

exosome の細胞への取り込み

Exosome 内の RNA を SYTO<sup>®</sup> RNASelect<sup>™</sup> Green Fluorescent Cell Stain を用いて染色した。Exosome Spin Columns を用いて、exosome を洗浄し、小児がん細胞株と共培養し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。DAPI、phalloidin を用いて、細胞を染色した。

4. 研究成果

回収された exosome 由来のタンパク定量

Exosome 由来の蛋白量は、細胞株培養液の上清 40ml 当たり、Rh30 1008  $\mu$ g、Rh41 316  $\mu$ g、RD 2032  $\mu$ g、SH-SY5Y 1334  $\mu$ g であった。細胞株によって異なっており、exosome の分泌量が細胞株によって異なることが示唆された。

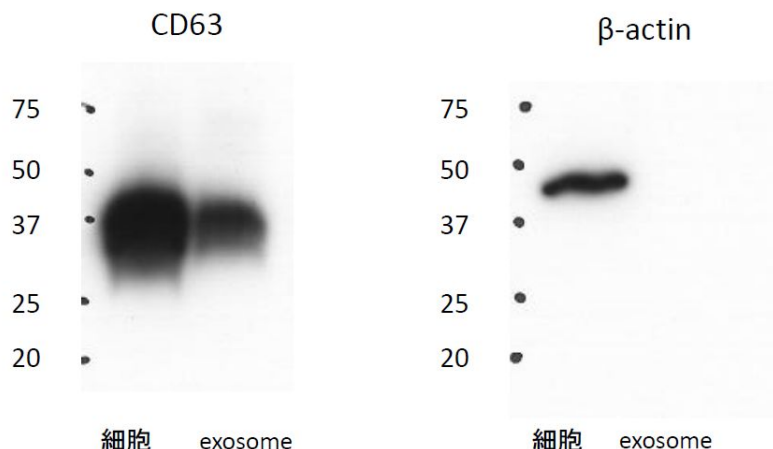
exosome における発現タンパクの同定

において、定量を行った exosome 由来の蛋白では、CD63 が検出された(図 1)。CD63 は exosome の表面マーカーであり、超遠心により回収されたペレット が exosome であることを示唆した。 $\beta$ -actin は exosome 由来の蛋白では検出されず、細胞由来の蛋白の混入がないことを証明した。以上より、小児がん細胞株から exosome が分泌されていることを示した。

exosome 内の microRNA の定量

細胞での microRNA 発現を比較する(図 2)と、横紋筋肉腫細胞株においては、筋特異的な microRNA である miR-206 は高発現を示し

図1. 小児がん細胞株由来exosomeにおいて、CD63の発現を認める。



た。一方で、神経芽腫細胞株では miR-206 の発現は低発現である。Exosome 由来分画においても、miR-206 は Rh30、Rh41、RD で高発現を示し、一方で神経芽腫細胞株である SH-SY5Y では、低発現であった(図 2)。細胞で多く発現されている microRNA は exosome においても高発現しており、細胞内の microRNA プロファイルが exosome に反映されることが示唆された。

#### exosome の細胞への取り込み

RD 由来の exosome (緑の蛍光) は、Rh30、SY5Y 細胞株 (青の蛍光：細胞核、赤の蛍光：細胞骨格) に取り込まれた(図 3)。小児がん細胞株において exosome が microRNA の細胞間輸送に用いられている可能性を示唆した。

以上より、小児がん細胞株は exosome を分泌していること、exosome 由来の microRNA は小児がん細胞株の microRNA 発現を反映する

こと、小児がん細胞株において exosome が microRNA の細胞間輸送に用いられている可能性を示唆した。

#### 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 2 件)

Yoshida H, Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. PAX3-NCOA2 fusion gene has a dual role in promoting the proliferation and inhibiting the myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *Oncogene*. 2013 Nov 11. doi: 10.1038/onc.2013.491. [Epub ahead of print]

Yoshida H, Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara

図2. 細胞株のmicroRNAとexosomeのmicroRNAは同様の発現を示す。

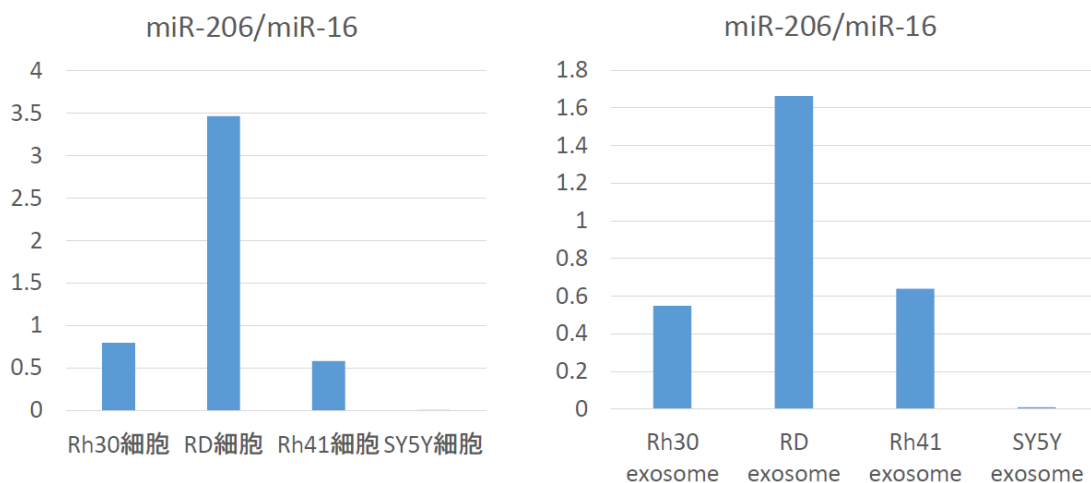
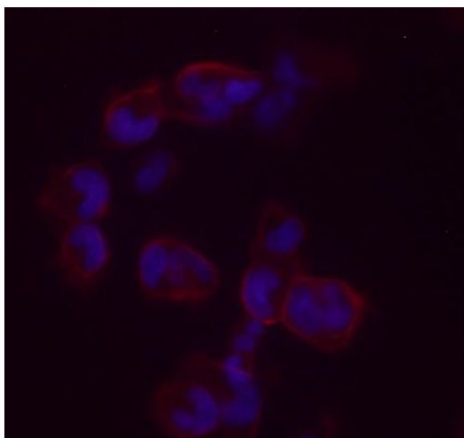
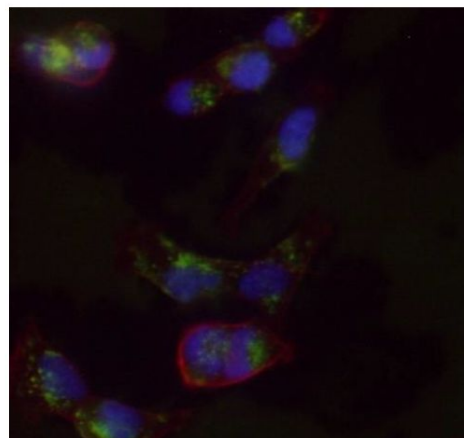


図3. RD由来のexosomeは、Rh30細胞株に取り込まれる。

PBS



RD由来のexosome



T, Hosoi H, et al. Identification of COL3A1 and RAB2A as novel translocation partner genes of PLAG1 in lipoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014 Jul;53(7):606-11.

〔学会発表〕(計 7 件)

細井 創. 教育セッション 軟部組織肉腫治療研究の現況. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 29 日~12 月 1 日; 福岡.

Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. High serum *miR-206* expression levels define an aggressive rhabdomyosarcoma subtype. 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. 2013.9.25-28.; Hong Kong, China.

Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Validation of serum *miR-206* expression level as a diagnostic biomarker for rhabdomyosarcoma: a report of the Children's Oncology Group study ARST12B1. 44th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. 2012.10.5-8.; London, United Kingdom.

宮地 充, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創, 他. 血清 *miR-206* は、転移性横紋筋肉腫において高発現を示す. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 福岡. 2013.11.29.~12.1.

Miyachi M, Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. Circulating microRNA expression profiles identify patients with metastatic rhabdomyosarcoma. 第 71 回日本癌学会学術集会. 横浜. 2013.10.3~10.5.

宮地 充, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創, 他. 胞巣型横紋筋肉腫において、血清 *miR-206* は高発現を示す. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会. 横浜. 2012.11.30.~12.2.

Miyachi M, Miyachi M, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H, et al. High serum *miR-206* expression levels define an aggressive rhabdomyosarcoma subtype. 第 71 回日本癌学会学術集会. 2012 年 9 月 20 日; 札幌.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細井 創 (HOSOI HAJIME)

京都府立医科大学・大学院医学研究科小児  
発達医学・教授

研究者番号: 20238744

### (2) 研究分担者

家原 知子 (IEHARA TOMOKO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科小児

発達医学・准教授

研究者番号: 20285266

土屋 邦彦 (TSUCHIYA KUNIHICO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科小児

発達医学・助教

研究者番号: 90381938

宮地 充 (MIYACHI MITSURU)

京都府立医科大学・大学院医学研究科小児

発達医学・助教

研究者番号: 40584983