

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2013～2014
 課題番号：25830089
 研究課題名(和文) 機能性エクソソームを介した腫瘍細胞-血管内皮細胞間コミュニケーション機序の解明

 研究課題名(英文) Cell-to-cell communication between tumor cell and their microenvironment via exosomes

 研究代表者
 梅津 知宏 (Umez, Tomohiro)

 東京医科大学・医学部・講師

 研究者番号：40385547

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たに樹立した低酸素耐性株と独自のin vitroモデル系およびin vivoモデル系を用いた「がん微小環境におけるエクソソームを介した細胞間コミュニケーション機序の解明」を目的とした。初年度は低酸素環境に曝された腫瘍細胞から放出されるエクソソームの変化をmiRNAアレイにて解析した。最終年度は、得られたmiRNAプロファイリング結果をもとに低酸素環境において血管新生を誘導するエクソソーム含有miRNAを同定した。新たに樹立した低酸素耐性亜株由来のエクソソームは血管内皮細胞の管腔形成能をin vitroで亢進し、ヌードマウス皮下に移植したマトリゲル内でも血管新生が確認された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the role of tumor-derived exosome in their microenvironment using multiple myeloma cell lines which show continuous growth in vitro under chronically hypoxic conditions (hypoxia-resistant MM cells; HR-MM cells). We isolated the exosomes from HR-MM cells and assessed exosomal miRNA profiling using the TaqMan low-density array. Endothelial tube formation assay was used for validating function of MM cell-endothelial cell (HUVECs) communication. We found miR-135b was significantly up-regulated in exosomes from HR-MM cells compared to those in the parental cells. The exosomal miR-135b directly suppressed its target, factor inhibiting HIF-1 (FIH-1), in endothelial cells, and enhanced endothelial tube formation under hypoxia. HR-MM cell-derived exosomes could enhance density of CD31 positive endothelial cells in Matrigel plug. Suggesting that the exosomal miR-135b might therefore be one of promising target for controlling angiogenesis in MM.

研究分野：腫瘍生物学、発生工学

キーワード：がん微小環境 エクソソーム miRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍血管新生における腫瘍細胞—血管内皮細胞間の相互作用では、VEGF (リガンド) と VEGFR2 (レセプター) を介したような「分泌因子による間接的な伝達」や、Notch や Integrin のような「細胞間または細胞外マトリックスとの直接的な接触による伝達」が知られている。われわれは、独自に構築した *in vitro* モデル系を用いて、“エクソソーム”と呼ばれる分泌小胞 (直径 20-100 nm) によって腫瘍細胞から血管内皮細胞へ情報が伝達しうることを明らかにしてきた (Umezumi et. al., *Oncogene* 2013)。このエクソソームを介した細胞間情報伝達は「第3の細胞間コミュニケーション機序」として注目されており、これまで細胞間を移動しないと考えられていた核酸 (DNA・RNA) や細胞膜結合性タンパク質 (EGFR など) までもが他の細胞に移動する可能性が示唆されている (Sanderson et. al., *J Cell Biochem* 2008)。特に、non-coding RNA の一種である microRNA (miRNA) が細胞外にも存在することに注目が集まっており、われわれは腫瘍細胞由来 miRNA がエクソソームに含有された状態で細胞外へと放出され、それらが血管内皮細胞内へと取り込まれる現象を、蛍光標識 miRNA を用いたタイムラプスイメージングによって明らかにしてきた。さらに細胞間を移動した腫瘍細胞由来 miRNA が血管内皮細胞内で機能を発揮することにより血管新生を制御していることも証明した (Umezumi et. al., *Oncogene* 2013)。

(2) 一方、腫瘍生物学の進歩にともない腫瘍の発生・浸潤・転移のメカニズムが明らかになると、研究対象が腫瘍そのものだけでなく腫瘍とその周辺細胞とで構築される「がん微小環境」へと急速に広がりを見せている。血管から離れた腫瘍の中心部は低酸素、低栄養状態に陥り、腫瘍細胞はその生存をかけて周囲の血管内皮細胞を引き寄せて自身の延命を図る。この腫瘍細胞による血管新生誘導には、vascular endothelial growth factor (VEGF) や angiopoietin などの血管新生因子が関与しており、臨床においてもヒト VEGF 中和抗体 (ベバシズマブ) などの分子標的薬を用いた血管新生阻害療法が行われている。最近の研究において、この「がん微小環境」における腫瘍細胞—血管内皮細胞間の情報伝達に「機能性エクソソーム」も関与している可能性が示されてきている。

(3) 最近、各分野で注目を集めているエクソソームであるが、この直径 20-100nm の

細胞膜 (脂質 2 重膜) 小胞は、細胞内の多胞性エンドソーム (multi-vesicular endosome) で産生され、エクソサイトーシス (exocytosis) によって細胞外へと分泌される。エクソソーム分泌メカニズムはセラミド依存性であり、その証拠としてスフィンゴミエリン分解酵素 (neutral sphingomyelinase 2: nSMase 2) の阻害薬によって、エクソソームの細胞外分泌は抑制されることが示されている (Kosaka et. al., *J Biol Chem* 2010)。このようにエクソソームの細胞外放出メカニズムの一端は明らかになりつつある一方で、エクソソームが細胞外へ放出される意義として、細胞内不要物の排出メカニズムの一部なのか、はたまた標的細胞へとシグナルを伝達するために細胞内物質が選択的にエクソソームに含有されるメカニズムが存在するのか、解明すべき点が多く残されている。

2. 研究の目的

がん治療の新たな標的として、腫瘍細胞とその周辺細胞 (血管内皮細胞、間質細胞) および周辺環境 (低酸素、低栄養) で構築される「がん微小環境」に注目が集まっており、本研究では、がん微小環境における“エクソソーム”を介した細胞間コミュニケーション機序の解明を目的とし、われわれが独自開発した *in vitro* モデル系とタイムラプスイメージング技術を用いて「細胞間メッセンジャー」としてのエクソソームの機能について解析した。また、本研究では、低酸素、低栄養環境下に曝された腫瘍細胞から放出されるエクソソームおよびエクソソーム含有 miRNA を解析することで、血管内皮細胞の血管新生を誘導するエクソソーム含有因子の同定を行うことを目的とした。ここ数年でエクソソームを利用したがんの早期診断・治療法の開発が急速に行われている一方でエクソソームの生理機能の謎は多く、これらの解明はエクソソームの医療応用に必須である。

3. 研究の方法

(1) 初年度において、生体内での「がん微小環境」に近い培養モデル系を確立するため、腫瘍細胞株を低酸素インキュベーター (37°C, CO₂ 5%, O₂ 1%, MCO-5M, Sanyo) 内で長期間 (3 カ月以上) 培養し、「低酸素耐性株」を樹立した。その対象として腫瘍細胞を 24 時間低酸素暴露した実験系 (急性的な低酸素暴露) も行った。低酸素耐性細胞株は、多発性骨髄腫由来細胞株 (RPMI8226, KMS-11, U266, IM9) および慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562 を用いて樹立した。

また、これらの低酸素暴露した株細胞に

において、低酸素応答性の指標として hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) の発現をウエスタンブロッティングにて検出した。

さらに、低酸素条件で培養した腫瘍細胞由来のエクソソームを採取し、ナノ粒子トラッキング解析 (NanoSight, Quantum Design Japan) を用いてそのサイズと放出量を測定し、低酸素耐性細胞由来エクソソームの特性化を行った。

(2) TaqMan Low-Density Array (ABI) を用いてエクソソーム含有 miRNA を網羅的に解析し、各腫瘍細胞株に共通して低酸素・低栄養ストレスで発現変化する miRNA 群を抽出した。

一方で、細胞内で産生された成熟型 miRNA が選択的にエクソソームに含有されて細胞外へと放出されている場合は、細胞内 miRNA プロファイルとエクソソーム含有 miRNA プロファイルが解離すると予想されたため、各腫瘍細胞株における細胞内 miRNA とエクソソーム含有 miRNA を発現量でランキング化し、その発現パターンを比較検討した。

(3) 腫瘍細胞由来エクソソーム含有 miRNA の腫瘍細胞—血管内皮細胞間移行の可視化を以下に示すように行った。LabelIT miRNA labeling kit (Mirus Bio) を用いて Pre-miR miRNA precursor (2 本鎖 miRNA, Ambion) を Cy3 標識し、これらを腫瘍細胞株に HiPerFect transfection reagent (Qiagen) を用いて導入した。その Cy3 標識 miRNA 導入細胞株の培養上清から Exoquick-TC (System Biosciences) を用いてエクソソーム分画を採取し、血管内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) の培養系に添加し、蛍光タイムラプス顕微鏡 (BZ-8000, Keyence) で観察した。

一方、腫瘍細胞由来エクソソームによる血管新生の誘導能の評価をおこなうために、HUVECs をマトリゲル (BD) 上に播種し、上記と同様に採取したエクソソーム分画を添加した。24 時間後にマトリゲル上の HUVECs をカルセイン AM (BD) で染色し、管腔形成 (tube formation) を蛍光顕微鏡で撮影して画像化および数値化を行った。

(4) 低酸素耐性株由来エクソソームによる生体内での血管新生誘導能の解析には Matrigel plug assay を用いた。マトリゲル (BD) に腫瘍細胞由来エクソソームを混合し、ヌードマウスの皮下に移植し、3 週間後にそのマトリゲルプラグを摘出して 4% ホルマリンで固定した。マトリゲルプラグを切片化後、血管内皮マーカーである CD31

で免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で撮影して画像化および数値化して血管新生誘導能の指標とした。

4. 研究成果

(1) われわれは、これまでの研究において腫瘍細胞特有の miRNA (miR-92a) がエクソソームに包まれて細胞外に放出され、血管内皮細胞がそのエクソソームを取り込んでしまうことにより血管新生が誘導されることを明らかにしてきた (Umezumi et al. *Oncogene* 2013)。この成果を得る過程で確立した技術を本研究では応用している。

本研究では、低酸素に曝されたがん細胞内で特異的に発現上昇する miRNA (Hypoxia-inducible miR) が、エクソソームを介して血管内皮細胞の血管新生能に影響を与える現象も発見した (Tadokoro et al. *JBC* 2013)。慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562 を用いて、24 時間の急性的な低酸素環境に暴露した結果、その K562 細胞が放出するエクソソームの「量」には変化がなかったものの、その内容物、特に miRNA のプロファイルが変化していた。24 時間の低酸素暴露によりもっとも発現変動の大きかったエクソソーム内 miRNA は「miR-210」であった。この miR-210 は Hypoxia-inducible miR と知られており、HIF-1 α の下流で制御されている miRNA の一つである。この miR-210 が豊富に含まれたエクソソームを血管内皮細胞 (HUVECs) の培養系に添加するとその血管新生能が亢進されることが明らかになった。さらに、この K562 細胞由来の miR-210 がエクソソームを介して血管内皮細胞に取り込まれることを蛍光標識した miR-210 を用いて可視化した。また、血管内皮細胞内では miR-210 が内在性の Ephrin-A3 (EFNA3) を標的として発現を制御していることをレポーターアッセイによって証明した。

(2) 多発性骨髄腫は骨髄内で悪性化形質細胞が異常増殖する疾患であり、悪性度が高まれば骨髄内が低酸素環境に陥る。本研究では、急性的な低酸素応答に対して、より骨髄内に近い低酸素環境モデルを確立することを目的として、骨髄腫由来細胞株 (RPMI8226、U266、KMS-11、IM9) を低酸素インキュベーター (1% O₂) 内で 6 ヶ月以上継代培養し、低酸素耐性を有する亜株 (RPMI8226-HR、U266-HR、KMS-11-HR、IM9-HR) を樹立した。得られた低酸素耐性細胞株の培養上清からエクソソームを抽出し、ナノ粒子トラッキング解析 (NTA) および PCR アレイを用いてエクソソームに含有されている miRNA (exosomal miRNA) の

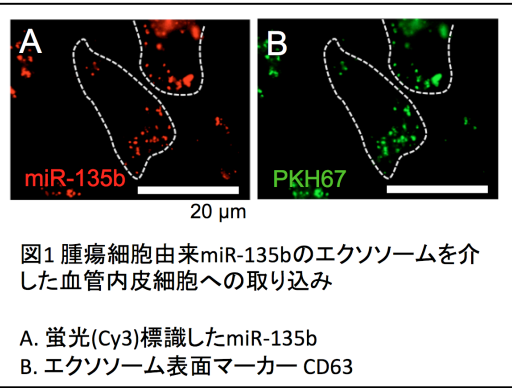


図1 腫瘍細胞由来miR-135bのエクソソームを介した血管内皮細胞への取り込み

A. 蛍光(Cy3)標識したmiR-135b
B. エクソソーム表面マーカー CD63

プロファイリングを行い、低酸素耐性細胞由来エクソソームの「量」「質」「機能」の解析を行った。その結果、低酸素耐性細胞から放出されるエクソソーム量は通常と比較して2倍に増加していることが分かった。また、Exosomal miRNA プロファイリングの結果、3種の低酸素耐性細胞(RPMI8226-HR、KMS-11-HR、IM9-HR)由来エクソソームにおいて、miR-135bが共通して発現上昇していた。この低酸素耐性株由来miR-135bはエクソソームを介して血管内皮細胞に取り込まれることを、上記と同様の手法で可視化して証明した(図1)。さらに、低酸素耐性細胞由来エクソソームをマトリゲル上で培養した血管内皮細胞に添加するとtube formationが2倍以上促進された(図2)。

これらのエクソソームはヌードマウス皮下に移植したマトリゲルplug内でも血管新生を顕著に促進させた。さらに、われわれはこの低酸素耐性細胞由来エクソソームに特有のmiR-135bがどのように血管内皮

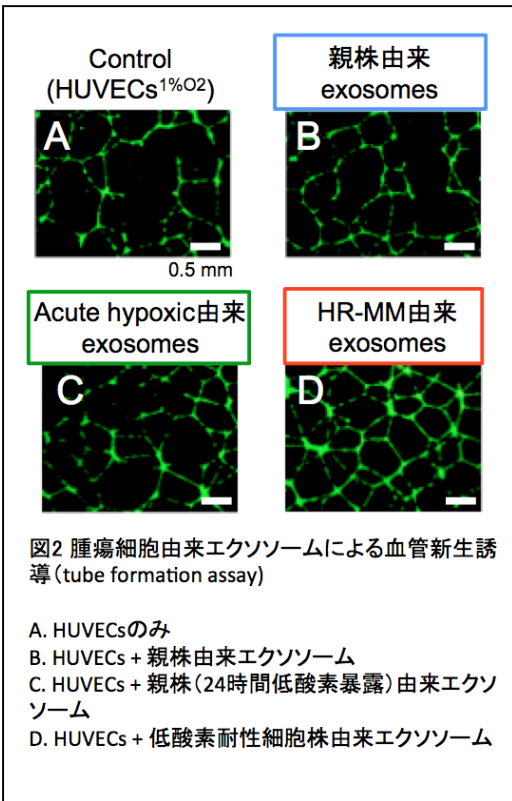


図2 腫瘍細胞由来エクソソームによる血管新生誘導 (tube formation assay)

A. HUVECsのみ
B. HUVECs + 親株由来エクソソーム
C. HUVECs + 親株(24時間低酸素暴露)由来エクソソーム
D. HUVECs + 低酸素耐性細胞株由来エクソソーム

細胞の血管新生能に影響を与えているかを解析した。miRNAのターゲット予測データベースであるTargetScanを用いてmiR-135bの標的因子を検索したところ、低酸素応答関連因子としてFIH-1 (Factor inhibiting-HIF1)が候補として抽出された。実際に低酸素耐性細胞由来エクソソームmiR-135bを豊富に含むエクソソームを、miR-135bのターゲット配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを導入したHUVECsに添加したところ、エクソソームを介してmiR-135bが血管内皮細胞に取り込まれて、血管内皮細胞内でFIH-1の発現を直接的に抑制していることが明らかとなった。

(3) *in vitro* モデル系で確認されたエクソソーム内miR-135bによる血管新生の亢進が、生体内でも同様の現象が生じるか確認するためにMatrigel plug assayを行った。miR-135bを豊富に含む低酸素耐性細胞由来エクソソームをマトリゲルに混合し、ヌードマウスの皮下に移植して3週間後に観察したところ、CD31陽性細胞の比率がコントロール(PBSを混合したマトリゲル)と比較して顕著に増加していた。このことから生体内でもエクソソームを介した血管新生が誘導されることが示され、*in vivo*でのエクソソームの挙動を解析するモデル系と

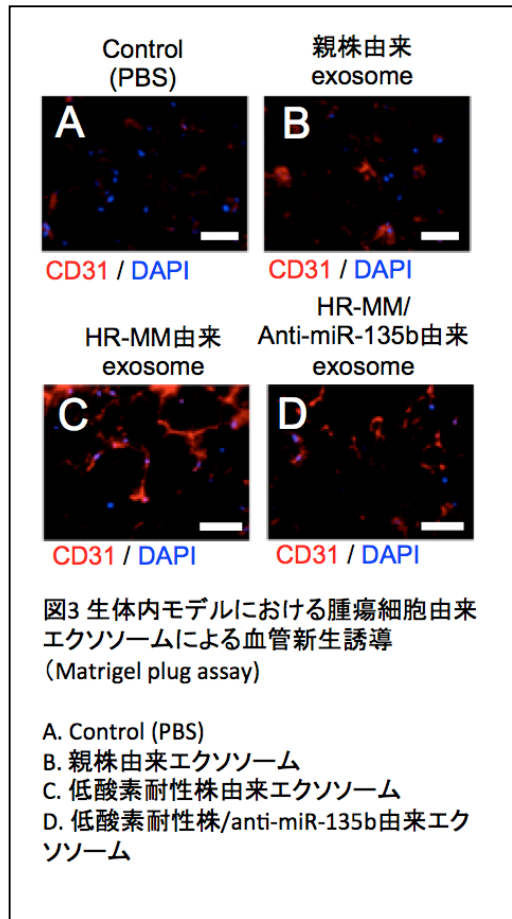


図3 生体内モデルにおける腫瘍細胞由来エクソソームによる血管新生誘導 (Matrigel plug assay)

A. Control (PBS)
B. 親株由来エクソソーム
C. 低酸素耐性株由来エクソソーム
D. 低酸素耐性株/anti-miR-135b由来エクソソーム

して用いることが可能である。また、この低酸素耐性細胞由来エクソソームによる *in vivo* での血管新生誘導は、miR-135b のアンタゴニスト (anti-miR-135b) により miR=135b の機能を阻害すると抑制された (図 3)。

エクソソーム内には miRNA 以外の因子 (タンパクを含む) が多量含有しているが、その中で miR-135b が血管新生誘導の一部を担っていることが示唆された。このエクソソーム内 miR-135b を制御することにより腫瘍血管新生をターゲットとした治療法に応用できる可能性も考えられる。

<引用文献>

- ① Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*. 2013;32(22):2747-2755.
- ② Sanderson MP, Keller S, Alonso A, Riedle S, Dempsey PJ, Altevogt P. *J Cell Biochem*. 2008;103(6):1783-1797.
- ③ Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Yakeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17442-17452.

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 4 件)

- ① Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*. 2014;124(25):3748-3757. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2014-05-576116.
- ② Ohyashiki JH, Ohtsuki K, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, Umezu T, Ohyashiki K. Downregulated microRNA-148b in circulating PBMCs in chronic myeloid leukemia patients with undetectable minimal residual disease: a possible biomarker to discontinue imatinib safely. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:1151-1159. 査読有 DOI: 10.2147/DDDT.S66812.
- ③ Tadokoro H, Umezu T, Ohyashiki K, Hirano T, Ohyashiki JH. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2013;288(48):34343-34351. 査読有 DOI: 10.1074/jbc.MI13.480822.
- ④ Soeda S, Ohyashiki JH, Ohtsuki K, Umezu T, Setoguchi Y, Ohyashiki K. Clinical relevance of plasma miR-106b levels in patients with chronic obstructive

pulmonary disease. *Int J Mol Med*. 2013;31(3):533-539. 査読有 DOI: 10.3892/ijmm.2013.1251.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 梅津知宏、田所弘子、大屋敷一馬、大屋敷純子「がん微小環境を制御するエクソソーム含有 miRNA ; 長期低酸素暴露した骨髄腫細胞由来 exosomal miR-135b の機能解析」第 73 回日本癌学会学術会議、2014 年 9 月 25 日～2014 年 9 月 27 日、横浜
- ② 梅津知宏、田所弘子、大屋敷一馬、大屋敷純子「がん微小環境ネットワークにおけるエクソソーム含有 miRNA の機能解析」第 8 回日本エビジェネティクス研究会、2014 年 5 月 25 日～2014 年 5 月 27 日、東京
- ③ Umezu T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Hypoxia enhances angiogenesis via exosomal miR-135b derived from multiple myeloma cells. International Society for Extracellular vesicles (ISEV) 2014. 2014 年 4 月 11 日～2014 年 4 月 13 日、Rotterdam, Netherland.
- ④ 梅津知宏、田所弘子、大屋敷一馬、大屋敷純子「hypoxic myeloma cell modulates its microenvironment via exosomes」第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日～2013 年 10 月 5 日、横浜
- ⑤ Umezu T, Tadokoro H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Hypoxia modulates tumor exosomes, which function as mediators of angiogenesis. AACR Annual Meeting 2013. 2013 年 4 月 6 日～2013 年 4 月 10 日、Washington, DC, U. S. A.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://team.tokyo-med.ac.jp/ims_onc/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅津 知宏 (UMEZU, Tomohiro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 40385547