

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861701

研究課題名(和文) エキソソームによるmicroRNAの細胞間輸送システムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the intercellular transportation system of microRNA by exosomes in oral cancer

研究代表者

大和地 正信 (YAMATOJI, Masanobu)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70451747

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)：エキソソームの脂質二重層内にはタンパク質やmicroRNAなどの核酸が含まれ、細胞間の情報伝達を担っている。液性中のエキソソーム由来microRNAを抽出し、有意な発現変化のみられたmiR-205-5p, miR-200c-3pに注目した。miR-205-5p, miR-200c-3pは転移性の口腔がん由来細胞株の細胞内で発現低下を示したが、エキソソーム中では発現亢進を示した。健常者と比較し、口腔がん患者の唾液中ではmiR-205-5pは有意に発現亢進がみられた。以上より、がん細胞由来エキソソームは周囲のがん細胞に影響を与え、転移しやすい環境をつくる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the lipid bilayer of exosomes, proteins or nucleic acids such as microRNA are included and take intercellular signaling. We extracted microRNAs derived from exosomes in fluid and analyzed the expression of miR-205-5p and miR-200c-3p. In comparison with the cell line derived from metastatic oral cancer, miR-205-5p and miR-200c-3p showed a decreased expression in the cells, but showed an increased expression in the exosomes. In comparison with the healthy controls, the expression of miR-205-5p was significantly down-regulated in the saliva of oral cancer. In summary, exosomes derived from these cancer cells affected the neighboring cancer cells, and likelihood to make the environment that was easy to metastasize are suggested.

研究分野：口腔がん

キーワード：exosome microRNA 口腔がん

1. 研究開始当初の背景

microRNA の主な機能は、mRNA の分解もしくは翻訳阻害である。この作用は microRNA と、標的とする mRNA 配列との相同性に依存し、ひとつの microRNA 配列は、複数の mRNA を標的としている。そのため、多くの遺伝子発現の制御を担う microRNA は、多様な生物学的機能を発揮し、発生過程や細胞分化、細胞増殖の制御など多岐にわたっている。microRNA は、遺伝子の脆弱部位に存在し、特にがんでの microRNA の変異や異常調節が報告されている。さらに、腫瘍増殖とがん化のシグナル伝達においても、microRNA は深く関わっている。がん細胞は、アポトーシスを回避しながら遺伝的変異やエピジェネティックな変異を蓄積し、増殖を繰り返すといった複雑なネットワークを構成しており、現在のところ、miR-15 や mir-16、let-7 などの発現異常が、特定のがん細胞で報告され、遺伝子と microRNA 間の相互作用ががん細胞では重要な役割を果たしていることが示唆されている。

microRNA は血清、血漿中に非常に安定な状態で存在し(PNAS 2008 July 29; 105(30): 10513-10518)、各種がんや急性心筋梗塞などの疾患で microRNA のレベルが変化することが報告されている(BBRC 2010 Jan 1;391(1):73-7)。エクソソームは nm サイズの小胞として細胞から放出され、細胞間の輸送ツールとして機能すると考えられている。がん細胞においても microRNA は分泌され、がん細胞と免疫細胞との間で microRNA の細胞間輸送があることが示唆されている(Mol Cell. 2010 Jul 9;39(1):133-44)。

2. 研究の目的

エクソソームを介した microRNA の細胞間輸送システムに着目し、特異的発現変動のみられる microRNA を探索し、細胞内在型とエクソソーム在中とで発現変動を示す microRNA

の意義を明らかにする。さらにエクソソームの生物学的特性を利用した細胞間輸送システムによる口腔がんの新規の早期診断法や治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

正常上皮細胞株、口腔がん由来細胞株の培養液および健常者、口腔がん担癌患者の唾液を用いて以下の実験を行った。

(1) 細胞培養液中のエクソソームの単離

正常上皮細胞株としてヒト表皮ケラチノサイト(HaCaT)を、口腔扁平上皮がん(oral squamous cell carcinoma, OSCC)由来細胞株として非転移性株(SAT, HO-1-u-1, SAS)、転移性株(HSC-3, HSC-3-M-3, OSC-19, KON)を用いた。

HaCaT, OSCC 由来細胞株の培養液からエクソソームを単離した。

(2) エクソソームに含まれる microRNA の抽出

QIAGEN 社製の miRNeasy Mini Kit を用いてエクソソームに含まれる microRNA を抽出した。抽出精度を確認し、同社製 miScript II RT Kit を用いて mature な microRNA の逆転写を行った。

(3) PCR Array による網羅的発現解析

既知の microRNA が搭載された QIAGEN 社製の miScript miRNA PCR Array を用いて発現解析を行った。QIAGEN 社製 miScript miRNA PCR Array Human Cancer Pathway Finder を用い、抽出/逆転写した HaCaT, OSCC 由来細胞株の培養液中のエクソソームに含まれる microRNA について PCR Array を行った。

(4) 臨床検体を用いた発現解析

唾液中のエクソソームに含まれる microRNA について上記(1)~(3)により有意な発現変動のみられた microRNA について single assay を行い、発現状態を比較した。

(5) 有意な発現変化が認められた microRNA についてデータベースをもとに制

御する遺伝子を探索し、その発現を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞培養液中のエキソソームの単離および microRNA の抽出/逆転写

HaCaT および 7 種類の OSCC 由来細胞株の培養液からエキソソームを単離し、その中に含まれる microRNA を抽出し、mature な microRNA を逆転写した。

(2) PCR Array による網羅的発現解析

主要な既知の microRNA Primer が搭載された PCR Array を 7 種類の OSCC 由来細胞株について行った結果、図 1 および図 2 のようになった。

図 1

OSCC 由来細胞株の培養液中のエキソソームに含まれる microRNA の発現状態 (Clustergram)

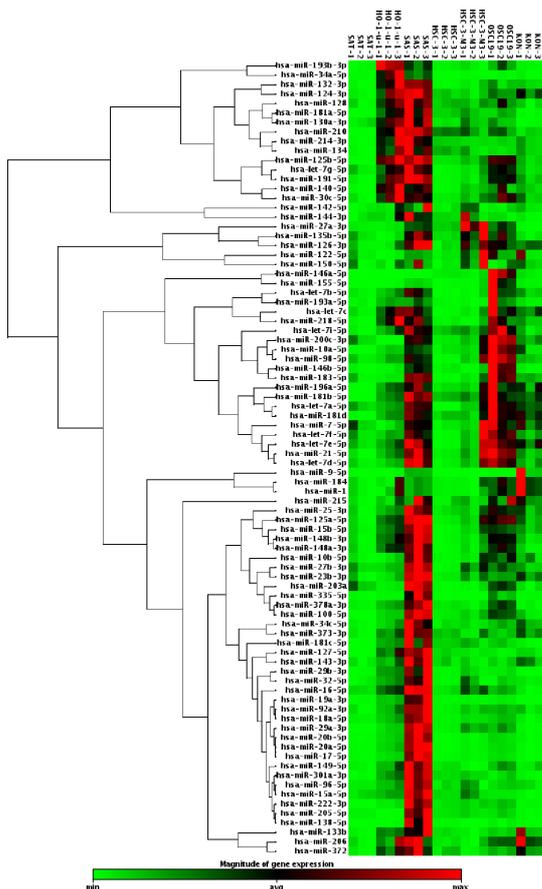
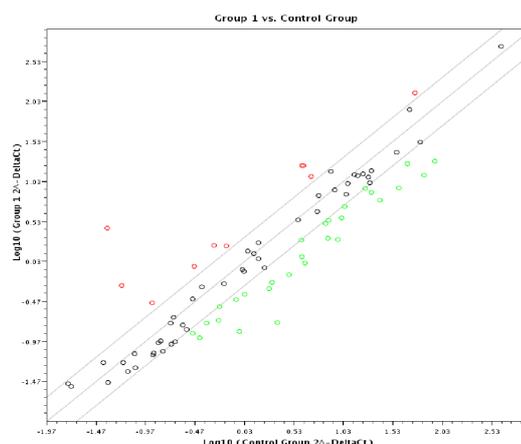


図 2

OSCC 由来細胞株の培養液中のエキソソームに含まれる microRNA の発現状態 (Scatter Plot)



以上より非転移性株 (SAT, HO-1-u-1, SAS) と転移性株 (HSC-3, HSC-3-M-3, OSC-19, KON) では、数種類の microRNA で発現差がみられた。

(3)

非転移性株 (SAT, HO-1-u-1, SAS) と転移性株 (HSC-3, HSC-3-M-3, OSC-19, KON) で比較したところ、転移性細胞株由来で発現亢進を示す microRNA は、表 1 のようになった。

表 1

転移性細胞株で発現亢進を示す microRNA

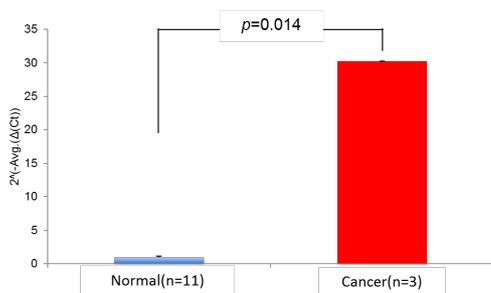
Mature ID	Fold Regulation
miR-146a-5p	64.8
miR-155-5p	8.74
miR-200c-3p	4.10
miR-181b-5p	4.02
miR-181d	3.21
miR-196a-5p	2.80
miR-10a-5p	2.62
miR-205-5p	2.44
miR-222-3p	2.43
miR-122-5p	2.37

これをもとに以前行った OSCC 由来細胞から抽出した microRNA の発現解析の結果と比較

した。その結果, miR-205-5p と miR-200c-3p は, 転移性株の細胞内では発現低下を示していた。

(4) 臨床検体を用いた発現解析
健常者と口腔がん担癌患者の唾液中での miR-205-5p の発現状態を比較したところ, 図3のようになった。

図3 唾液中 miR-205-5p の発現状態の比較



これから, 口腔がん担癌患者の唾液中では miR-205-5p の有意な発現亢進がみられた。

(5) miR-205-5p の制御する遺伝子検索データベース (TargetScanHuman) をもとに, miR-205-5p の制御する遺伝子を探索したところ 416 個の target gene がピックアップされた。miR-205-5p は, がん種によっては Onco miRNA と Tumor Suppressor miRNA としての報告があった。この中に有用と思われる遺伝子 (gene X) があった。miR-205-5p は, いずれも正常と比較し, 細胞内での発現が低下し, 逆に細胞外では発現が亢進していた。このことは, がん細胞由来のエキソソームが周囲の組織に対し, 転移形成を容易にする環境を整えている可能性が示唆された。現在, この gene X の発現解析を行い, 標的遺伝子としての有用性を検討している。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和地 正信 (YAMATOJI, Masanobu)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 70451747

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: