

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870059

研究課題名(和文) 胆嚢癌産生exosome中のmicroRNAによる血管新生制御機構の解明

研究課題名(英文) MicroRNA-containing exosomes derived from human gallbladder cancer cells inhibit HUVEC tube formation

研究代表者

山本 洋平 (Yamamoto, Yohei)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：70400512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胆嚢癌細胞の培養上清から超遠心法により分離したexosome(以下EXと略す)には、血管新生抑制性のmicroRNA(miR-494など)が含まれていたため、HUVEC培養系に胆嚢癌由来のEXを添加する実験を行った。EXの添加は、HUVECの増殖には変化を起さなかったが、HUVEC tube formationが抑制された。次にmicroRNA mimicをHUVEC tube formation assay系に添加したところ、miR-494 mimicに抑制効果が見られた。胆嚢癌細胞由来のmicroRNAが、EXを介して血管内皮細胞に取り込まれ、血管網の構築を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Exosomes were isolated from the culture medium of two human gallbladder carcinoma cell lines by means of ultracentrifugation. Exosomes contained miRNAs. Two independent cell lines shared 87 common exosomal miRNAs including miR-125b, miR-320, miR-494, and miR-638, all of which are considered to be anti-angiogenic. NOZ-derived exosomes affected not proliferation but tube formation of HUVEC. The latter was rather inhibited. HUVEC tube formation was suppressed 1 day after miR-494 mimic transfection. In conclusion, our results have demonstrated that anti-angiogenic miR-494 expressed by human gallbladder cancer NOZ cells is transferred from NOZ cells to HUVECs by the NOZ cell-derived exosomes, and thus suppresses tube formation of HUVECs, suggesting that gallbladder cancer cell-derived exosomes should make pericancerous microenvironment hypoxic to generate a low ROS condition in favor of cell survival and/or to induce cell migration toward normoxic areas.

研究分野：実験病理学

キーワード：exosome microRNA angiogenesis gallbladder carcinoma

## 1. 研究開始当初の背景

近年悪性腫瘍が産生する exosome(分泌小胞)が、腫瘍の増殖・浸潤・転移に有利な微小環境確立のため、細胞間の情報伝達を担うツールとして機能していることを示唆する研究報告が相次いで発表されている。

## 2. 研究の目的

私たちは最近、ヒト胆嚢癌細胞株の培養上清より単離した exosome 中に、選択的に局在する傾向にある microRNA(以下 miRNA と略す)群があることを見出した。興味深いことに、この miRNA 群の中には、miR-125b、miR-320、miR494、miR638 などの angiogenesis を抑制的に制御するものが数多く含まれていた。そこで本研究においては、HUVEC(ヒト臍帯静脈血管内皮細胞)培養系を用いて、胆嚢癌産生 exosome の血管新生に対する抑制作用について、特に exosome 中の miRNA が担う役割について探索した。

## 3. 研究の方法

(1)株化胆嚢癌細胞由来の exosome 単離  
1x10<sup>7</sup>個のヒト胆嚢癌株化細胞(G-415とNOZ)を、ウシ胎仔血清存在下に培養する。血清中のウシ exosome のコンタミネーションを避けるため、培養上清を回収する2日前に、培養細胞を無血清培地に移す。培養上澄から死細胞等のデブリスを除去した後、超遠心(100,000 gで2時間)を行い、ペレットを回収する。ペレットをPBSで洗浄し、再度遠心する。次に、既知の exosome マーカー(CD63等)を利用して、western blottingを行い、exosome 分画が単離されたことを確認する。また exosome に特徴的な形態“cup-shaped”を、透過型電子顕微鏡にて観察する。続いて、Nanoparticle tracking analysis(NTA)により、単離された粒子の大きさと数を定量する。なお、HUVEC 培養系に添加する exosome は、蛍光物質 PKH67(SIGMA)で標識し、HUVEC 細胞内への取り込みを可視化できるようにする(J Biol Chem. 2010 Jun 4;285(23):17442-52.)。

(2)胆嚢癌産生 exosome を添加した際の、培養 HUVEC の機能的または形態的变化の測定  
胆嚢癌産生 exosome が、血管内皮細胞に直接働きかけて、angiogenesis を制御するかどうか検証するために、以下の in vitro 実験を行う。

### (2-1) HUVEC の増殖能の計測

1250個のHUVECをEBM2培地で96穴プレートに培養する。培養12時間後に、胆嚢癌細胞由来の exosome を HUVEC 培養系に添加

する。添加後0.5、1、2、4日後にCell counting kit 8 (DOJINDO)を用いて細胞増殖能を定量し、exosome を添加していないHUVECと比較する。

### (2-2) HUVEC の毛細血管様構造形成能の計測

HUVEC を、Matrigel(Corning)上に播種した後、胆嚢癌細胞 NOZ 由来の exosome を培地に添加する。培養24時間後、倒立顕微鏡で観察し、写真撮影する。得られた画像は、血管新生解析ソフト(KURABO)で解析し、管腔形成部の長さ・分岐の数等を数値化する。

### (3)microRNA mimics 添加後の HUVEC の毛細血管様構造形成能の計測

mirVana miRNA mimics または miRNA negative control が transfection された HUVEC を、Matrigel 上に播種する。24時間後に観察・撮影を行う。得られた画像は、血管新生解析ソフトで解析する。

## 4. 研究成果

(1)胆嚢癌細胞培養上清から exosome が単離された。

G-415 と NOZ 由来の exosome 分画には、CD63 蛋白が検出された(Western blotting)。また G-415 と NOZ 由来の exosome 分画には、exosome の典型的な形態である“cup-shaped”を呈する粒子が観察された(電子顕微鏡による観察)。NOZ の exosome 分画には、直径約80 nmの粒子が多く含まれていた(NTA)。これらの結果を総合し、胆嚢癌細胞培養上清から exosome が単離されたと判断した。

この exosome および exosome 産生細胞から total RNA を抽出し、bioanalyser2100(Agilent)で解析したところ、exosome 中には、microRNA が含まれていることを示唆する結果を得た。そこで、miRNA array analysis を行ったところ、実際に多種類の microRNA が含まれていることがわかった。驚いたことに、G-415 と NOZ 由来の exosome には、87個もの共通 microRNA が存在した。それらの共通 microRNA のうち、豊富に含まれているものの中に、文献的に血管新生抑制能を有する microRNA(miR-125b、miR-320、miR494、miR638 など)が見出された。

(2)NOZ 由来の exosome を添加すると、HUVEC の増殖能には変化が見られないが、毛細血管様構造形成能が抑制される。

(2-1)PKH67 で標識した NOZ 由来の exosome が、培養 HUVEC に取り込まれることを確認

した後、HUVEC 培養系に exosome を添加する実験を行った。最初に、exosome 添加群および非添加群の HUVEC 増殖能を検討した。Exosome 添加後いずれの時間帯(0.5、1、2、4 日後)においても、両群における有意な差は認められなかった。

(2-2)次に、HUVEC を growth factor reduced matrigel 上に播種した直後に、NOZ 由来の exosome を添加して、毛細血管様構造形成能を検討した。添加 1 日後、非添加群と比較して、添加群では毛細血管様構造形成能が有意に低下した(Fig.1)。

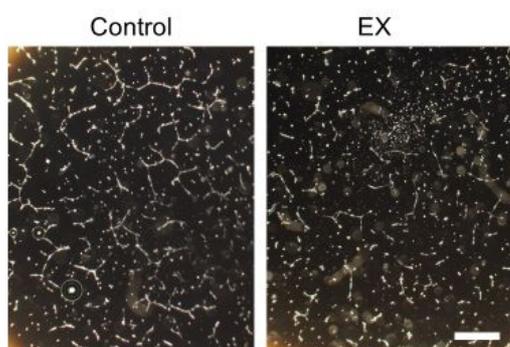


Fig.1 Representative micrographs of Control(exosome 非添加群) and EX(exosome 添加群). The scale bar indicates 0.6 mm.

(3) miRNA 494 mimic 添加後、HUVEC の毛細血管様構造形成能が低下した。

胆嚢癌細胞由来の exosome に含まれている物質のうち、HUVEC の毛細血管様構造形成能を抑制する作用をもつ物質の同定を試みた。Array の結果から、胆嚢癌細胞由来の exosome には、いくつかの血管新生抑制性の miRNA が含まれていることがわかったので、これらの miRNA を抑制因子の候補として実験を進めた。miR-125b、miR-320、miR494、miR638 と同様の機能を有する類似体を、それぞれ HUVEC に transfection して matrigel 上で培養したところ、mi-494 mimic を添加した HUVEC において毛細血管様構造形成能が有意に抑制された。

以上の結果から、胆嚢癌細胞 NOZ 中に発現している血管新生抑制性の miRNA である miR-494 が、exosome によって血管内皮細胞 HUVEC に運搬され、毛細血管様構造形成能を抑制する可能性が示された。

## 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)

- 1) Iikawa, N., Yamamoto, Y., Kawasaki, Y., Yoshioka, T., Nishijima, A., Enomoto, K., Ishikawa, K., Omori, Y. (2015) Intra-golgi connexin26 behaves in a pro-oncogenic manner in head and neck cancer cells. Akita J. Med. 42: 87-94. 査読あり
- 2) Jonson, L., Christiansen, J., Hansen, TV., Vikesa, J., Yamamoto, Y., Nielsen, FC. (2014) IMP3 RNP safe houses prevent miRNA-directed HMGA2 mRNA decay in cancer and development. Cell Rep. 7: 539-551. 査読あり

[学会発表](計 8 件)

第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日, 名古屋市, 山本洋平, 西島亜紀, 吉岡年明, 榎本克彦, 大森泰文 (2015) ヒト胆嚢癌産生 exosome 中の miRNAs が血管新生に与える影響の検討

第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日, 名古屋市, 吉岡年明, 山本洋平, 鈴木麻弥, 西島亜紀, 南條 博, 榎本克彦, 大森泰文 (2015) ヒト前立腺癌幹細胞におけるインテグリン $\alpha$ 4 の役割

第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日, 名古屋市, 鈴木麻弥, 吉岡年明, 山本洋平, 西島亜紀, 佐藤 朗, 大森泰文 (2015) 頭蓋骨の完全欠損を含む多発奇形を伴った羊膜索症候群の一部検例

第 56 回日本神経病理学会総会学術研究会, 6 月 3 日, 福岡市, 鈴木麻弥, 宮田 元, 吉岡年明, 山本洋平, 西島亜紀, 大森泰文 (2015) 頭蓋骨の完全欠損を含む多発奇形を伴った羊膜索症候群の一部検例

第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日, 名古屋市, Yamamoto, Y., Nishijima, A., Enomoto, K., Omori, Y. (2015) Can exosomal miRNAs derived from human gallbladder cancer cells regulate angiogenesis?

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015 年 12 月 4 日, 神戸市, 大森泰文, 川崎洋平, 山本洋平, 西島亜紀, 飯川延子 (2015) 腫瘍を抑制するギャップ結合、腫瘍の進展を促すコネキシン

第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24 日, 広島市, 山本洋平, 吉岡年明, 鈴木麻弥, 大森泰文 (2014) 右血胸から出血性 shock に陥った心臓原発血管肉腫の 1 剖検例

第 73 回日本癌学会学術総会, 2015 年 9 月

25 日, 横浜市, Yoshioka, T., Yamamoto, Y.,  
Nanjo, H., Omori, Y. (2014) beta-4 integrin  
promotes tumorigenesis of human prostate cancer  
by amplifying ErbB2 and c-Met signaling.

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 榎本克彦, 山本洋平 (2014) 多段階発癌.  
一瀬白帝, 鈴木宏治 (編) 図説 分子病態  
学, 中外医学社, 東京, pp.147-151.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

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)

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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 洋平 ( YAMAMOTO, Yohei )

秋田大学・医学部・助教

研究者番号: 70400512

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: