

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790613

研究課題名（和文） 血清中エクソソーム内アンチセンス RNA による新たな大腸癌スクリーニング法の開発

研究課題名（英文） The development of novel colorectal cancer screening method using exosomal antisense RNA in serum

研究代表者

千葉 満（CHIBA MITSURU）

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：20583735

研究成果の概要（和文）：

エクソソームは様々な細胞から細胞外へ分泌される小胞である。エクソソーム内の成分は分泌された細胞の種類によって異なることが知られている。この研究で我々は3種類の大腸癌細胞株が分泌するエクソソーム内の mRNA、microRNA、アンチセンス RNA 種を同定した。この研究で、我々は初めてエクソソーム内にアンチセンス RNA が存在することを発見した。現在、血清中に存在する大腸癌特異的アンチセンス RNA の探索を行っている。

研究成果の概要（英文）：

Exosomes are microvesicles that are released from various cells into the extracellular space. It has been reported that the components within exosomes vary according to the type of secreted cell. In the present study, we identified a species of mRNAs, microRNAs, and natural antisense RNAs within the exosomes secreted from the three colorectal cancer (CRC) cell lines. We discovered that their natural antisense RNAs were within exosomes for the first time in the present study. Currently, the searching of exosomal CRC-specific natural antisense RNAs in serum has been performed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：腫瘍検査学、アンチセンス RNA

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は近年特に先進国諸国を中心に増加しており、日本やアメリカにおいて罹患率・死亡率の多くを占めている。大腸癌は一般に早期であれば自覚症状はなく、症状が出たときにはすでに進行している場合が多い。そのため大腸癌を早期に発見し、治療することが患者の予後のために重要である。しかしながら、現在行われている大腸癌のスクリーニング検査である便潜血検査は痔や食事などの影響を受けるため感度・特異度が不十分であり、優れたスクリーニング検査とは言いがたい。また大腸内視鏡検査は一般的なスク

リーニングとしては不向きである。そのため新たな大腸癌スクリーニング法の開発が社会的に急務である。

近年、機能的 non-coding RNA として数多くの microRNA が発見されている。microRNA は約 20～25 塩基の小分子 RNA のことで、mRNA のタンパク質翻訳抑制を行っていることが知られている。一方でヒト・マウスの全ゲノム配列の解明と多数の完全長 cDNA 配列の解析から多くのナチュラル・アンチセンス RNA の存在が確認された。アンチセンス RNA とは遺伝子の遺伝座の反対鎖側の DNA から転写される RNA のことであるため、アンチセンス RNA

は mRNA (センス RNA) の一部と塩基配列に相補性を有するものがある (Kiyosawa et al. *Genome Res.*, 2003.)。一般にアンチセンス RNA の機能は細胞内の局在の違いによって異なることが予想されており、核内に局在するアンチセンス RNA は DNA メチル化制御、転写干渉、スプライシング制御などの機能が知られている。一方で、細胞質内に局在するアンチセンス RNA は mRNA に対する安定性制御などの機能が知られている (Faghihi et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2009.)。近年、microRNA やアンチセンス RNA が大腸癌をはじめとする様々な疾患組織で正常組織とは異なる発現を示すことが明らかとなり、疾患発症の原因のひとつであることが予想されている (Negrini et al. *Curr Opin Cell Biol.*, 2009.; Kohno et al. *Int J Oncol.*, 2010.)。

近年興味深いことに、細胞内の microRNA やタンパク質がエクソソームという粒子に封入されて細胞外に分泌され、血液等の体液中を循環していることが明らかになってきた (Valadi et al. *Nat Cell Biol.*, 2007.)。エクソソームとは生体内および培養液中の細胞から分泌される 40~100 nm の膜小胞で、血液、尿、羊水、腹水などの体液や組織培養液中に存在する。これまで同定されたエクソソーム内の RNA やタンパク質の詳細については、ExoCarta データベース (<http://exocarta.ludwig.edu.au/>) に登録されている。エクソソーム内に含まれる mRNA や microRNA やタンパク質の種類は、分泌した細胞の種類や生理学的状態により異なるため、エクソソーム内の microRNA やタンパク質の分析は、各種疾患に対する新たなバイオマーカーの探索に有用となることが予想される。近年、癌患者の血清中エクソソーム内の mRNA や microRNA やタンパク質を同定する試みが報告されており、癌の早期発見が期待されている (Taylor et al. *Gynecologic Oncol.*, 2008.)。同様にアンチセンス RNA もエクソソーム内に存在している可能性があるが、これまでに報告例はない。我々は以前にアンチセンス RNA の発現を網羅的に開発できるセンス/アンチセンスカスタムマイクロアレイを開発した。このアレイを使用して、ヒト大腸癌組織においてアンチセンス RNA が実際に多く発現しており、正常な大腸組織とは異なった発現パターンを示すことを証明した (Kohno et al. *Int J Oncol.*, 2010.)。そのためこのアレイを使用して血清中エクソソームに存在する癌特異的アンチセンス RNA を同定することで、大腸癌の早期診断に有用な血清中アンチセンス RNA が発見できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず基礎実験として大腸癌細胞

株から分泌されるエクソソームの成分を解析した。次に血清中・培養上清中に存在するエクソソームの単離と微量 RNA 増幅法の検討を行った。将来的に動物モデルやヒト患者血清から大腸癌特異的エクソソーム内在性 RNA バイオマーカーを同定する目的で本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸癌細胞株から分泌されるエクソソームの回収

本研究に使用したヒト大腸癌細胞株 WiDr (JCRB0224) はヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した。またヒト大腸癌細胞株 HCT-15 (CCL-225) と SW480 (CCL-228) は ATCC から購入した。WiDr 細胞は最終濃度 10% ウシ胎児血清 (FBS) とペニシリン-ストレプトマイシン入りの D-MEM 培地 (和光純薬) で培養した。HCT-15 細胞と SW480 細胞は最終濃度 10% FBS とペニシリン-ストレプトマイシン入りの RPMI1640 培地 (和光純薬) で培養した。細胞培養は 37° C、5%CO<sub>2</sub> のインキュベータ内で行った。

大腸癌細胞株から分泌されるエクソソームの回収は培養上清を下記の条件で遠心分離することで行った。大腸癌細胞株 1×10<sup>6</sup> cells を直径 10 cm シャーレに植えて上記の培地で 2 日間培養した。培養後、シャーレを D-PBS(-) で 3 回洗浄してから無血清培地で 3 日間培養した。この培養上清を回収して 4° C、300×G、3 分間遠心し、浮遊細胞等を沈殿させた。この上清を回収して 4° C、2,000×G、15 分間遠心した。さらにこの上清を回収して 4° C、12,000×G、35 分間遠心し、細胞破片などを沈殿させた。これによって得られた上清を 0.22um のフィルタで濾過し、4° C、120,000×G、70 分間超遠心を行ってエクソソームを沈殿させた。最後に、D-PBS(-) でエクソソーム沈殿を洗浄し、再度超遠心によってエクソソームを沈殿させて実験に使用した。

### (2) 大腸癌細胞株から分泌されるエクソソームタンパク質の定量とエクソソームマーカーの検出

上記の超遠心法で回収したエクソソーム沈殿のタンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) を使用して測定した。吸光度測定は Microplate reader Benchmark (Bio-Rad) を使用し、570 nm における吸光度を測定した。

各大腸癌細胞株由来エクソソームタンパク質を 10ug に調整した。このサンプルを用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。SDS-PAGE 終了後のゲルをメンブレンへ転写してウエスタンブロッティングを行った。一次抗体には anti-CD63

rabbit polyclonal antibody (SantaCruz, sc-15363)、anti-CD9 rabbit monoclonal antibody (Abcam, ab92726)、anti-CD81 mouse monoclonal antibody (Abcam, ab79559)を使用した。CD63 および CD9 の二次抗体として anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (GE healthcare)、CD81 の二次抗体として anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (GE healthcare)を使用した。検出は化学発光試薬 ECL Plus (GE healthcare)を使用し、CCD イメージャー (ChemiDoc XRS, Bio-Rad)によってバンドの検出を行った。

### (3) 大腸癌細胞株から分泌されるエクソソーム内在性 RNA の検出

上記のように回収した大腸癌細胞株由来エクソソームから ISOGEN II (NipponGene)を用いて RNA を抽出した。エクソソームに内在する RNA のサイズを確認するために、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を使用して RNA 電気泳動を行った。

エクソソーム内在性 RNA にどのような RNA 種が存在するか調べるために、mRNA、microRNA、アンチセンス RNA の検出を RT-PCR で行った。mRNA 由来の cDNA を合成するために High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kits (Life Technologies)を使用して cDNA を合成した。PCR 反応は Immolase DNA polymerase (Bioline)を用いて行った。microRNA 由来の cDNA 合成は TaqMan MicroRNA RT Kit (Life Technologies)と TaqMan MicroRNA Assays 5×RT primer (Life Technologies)を使用して行った。PCR 反応は FastStart TaqMan Probe Master (Roche)と TaqMan Gene Expression Assays 20×Probe (Life Technologies)を使用して行った。アンチセンス RNA 由来の cDNA 合成は forward primer と AMV Reverse Transcriptase (Promega)を使用して行った。PCR 反応は Power SYBR GreenMaster Mix (Life Technologies)を使用して行った。

すべての PCR 産物を電気泳動し、バンドの検出はエチジウムブロマイド染色によって行った。

### (4) 血清中・培養上清中の微量 RNA 増幅法の検討と網羅的解析

回収した大腸癌細胞株 SW480 由来のエクソソーム及び血清中エクソソームから RNA を抽出し、Ribo-SPIA 法試薬 Ovation Pico WTA System V2 (NuGEN)によってエクソソーム内の微量 RNA を増幅し、Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent Technologies)を使用して Cy3 標識 cDNA を合成した。方法は説明書に従って実施した。エ

クソソーム内の mRNA 及び antisense RNA の種類を網羅的に調べるために、Cy3 標識 cDNA を human sense/antisense custom-microarray (つくば遺伝子研究所)と 65° C で 24 時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後にスライドを洗浄し、蛍光シグナルは DNA microarray スキャナ (Agilent Technologies)により検出し、Feature Extraction software (Agilent Technologies)を使用して数値化処理を行った。

エクソソーム内の microRNA の種類を網羅的に調べるために、エクソソームから抽出した RNA を miRCURY LNA microRNA Hy5 Power labeling kit (Exiqon)を用いて Hy5 で標識し、TORAY 3D-Gene Human miRNA Oligo chip (東レ)を使用して 32° C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後にスライドを洗浄し、TORAY 3D-Gene Scanner 3000 (東レ)を使用して蛍光シグナルの検出を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸癌細胞株から分泌されるエクソソームの回収マーカーの検出

これまでの報告でエクソソームに存在する様々なタンパク質が同定されてきており、これらのうち特にエクソソーム内に高頻度に検出されるタンパク質としてテトラスパニンファミリーの CD63、CD9、CD81 が知られている。本解析では大腸癌細胞株由来エクソソームから CD63、CD9、CD81 の検出を検討した。

ウエスタンブロッティングによってテトラスパニンファミリーの CD63、CD9、CD81 の検出を行った結果、HCT-15 細胞では CD63、CD9、CD81 がすべて検出され、SW480 細胞では CD9 と CD81 が検出され、WiDr では CD81 のみが検出された。CD81 は 3 種類の大腸癌細胞株すべてから検出された。このことは大腸癌細胞株由来エクソソームの回収マーカーとして CD81 が最も適していることを示唆している。

各細胞株由来エクソソームタンパク質量を比較したとき、テトラスパニンマーカーの発現種類が少ない細胞由来のエクソソームほどエクソソームタンパク質量が多いことが明らかになった。

### (2) 大腸癌細胞株から分泌される RNA 種の同定

エクソソーム内在性 RNA の種類を調べるために、RT-PCR 法によってハウスキーピング遺伝子である *ACTB*、*GAPDH*、*RPL13A*、*HMBS*、*B2M* および *TBP* mRNA の検出を検討した。その結果、HCT-15 および SW480 由来エクソソームから上記の mRNA はすべて検出された。一方、

WiDr 由来エキソソームには *TBP* 以外の上記の mRNA が検出された。この結果は、大腸癌細胞株由来エキソソーム内には mRNA が存在することを意味している。

de Krijger らは大腸癌転移に miR-21、miR34a、miR-143、miR-192、miR-215、miR-221 のような microRNA が関与することを報告した (de Krijger et al. *J Pathol.*, 2011.)。それゆえ大腸癌細胞株由来エキソソーム内にそれらの microRNA が存在するか RT-PCR 法によって調べた。その結果、miR-21、miR-192、miR-221 は 3 種類の大腸癌細胞株由来のエキソソームから検出された。特に SW480 と WiDr 由来のエキソソームには miR-21 が多く存在していた。また miR-34a は WiDr 由来のエキソソーム内にわずかに検出され、miR-215 は HCT-15 由来のエキソソーム内に検出された。一方、miR-143 は 3 種類の大腸癌細胞株由来のエキソソームから検出されなかった。このことはエキソソーム内に含まれている microRNA の種類は、エキソソームを分泌する細胞の種類によって大きく異なることを示唆している。

我々は以前の研究でヒト大腸癌組織において発現変化するアンチセンス RNA を多数同定しており、その中でも *LRRC24* 遺伝子から発現するアンチセンス RNA が大腸癌組織で高発現を示すことを明らかにした (Kohno et al. *Int J Oncol.*, 2010.)。また *MDM2* や *CDKN1A* 遺伝子からアンチセンス RNA が発現することを報告した (Chiba et al. *Mol Med Rep.*, 2012.)。そこで大腸癌細胞株由来のエキソソーム内にそれらのアンチセンス RNA が存在するか RT-PCR 法によって調べた。その結果、3 種類の大腸癌細胞株由来のエキソソーム内には *LRRC24*、*MDM2*、*CDKN1A* 遺伝子から発現するアンチセンス RNA が検出された。

上記の結果から大腸癌細胞株から分泌されるエキソソーム内には多くの mRNA、microRNA、アンチセンス RNA が存在することが明らかになった。

### (3) 血清中・培養上清中の微量 RNA 増幅法の検討

これまでの我々の予備的な研究で、血清中及び培養上清中に存在するエキソソーム内在性 RNA の量は微量であることが明らかになっている。それゆえ、エキソソーム内在性 RNA 種をマイクロアレイのような網羅的な解析法で種類と量を同定することは困難である。そこで Dafforn らによって報告された微量 RNA 増幅法 (Ribo-SPIA 法, Dafforn et al. *Biotechniques*, 2004.) によるエキソソーム内在性 RNA の増幅を行いマイクロアレイ解析への応用を検討した。

Ribo-SPIA 法による微量 RNA 増幅の再現性を確認するために、SW480 由来エキソソーム

内在性 mRNA 及びアンチセンス RNA についてセンス・アンチセンスカスタムマイクロアレイを用いたマイクロアレイ解析を 2 回行い、相関関係を調べた。その結果、Ribo-SPIA 法による RNA 増幅には高い相関関係が示された。Signal intensity が 100 以上のものを選択したとき、エキソソーム内に mRNA は 6142 種類、アンチセンス RNA は 6218 種類検出された。このことから、SW480 由来エキソソーム内には多くの mRNA やアンチセンス RNA が存在することが明らかになった。また、予備的な検討から健常人血清中エキソソーム内にも微量 RNA が存在し、同様に増幅してマイクロアレイが可能であった。これらのデータは現在詳細に解析中である。

Agilent 2100 Bioanalyzer を用いてエキソソーム内在性 RNA の電気泳動を行った結果、エキソソーム内には 25~200 ヌクレオチドの small RNA が多く存在することが明らかになった。エキソソーム内在性の microRNA 種を網羅的に調べるために、SW480 由来エキソソーム内在性 microRNA のマイクロアレイ解析を行った。その結果、エキソソーム内には多くの microRNA が存在することが明らかになった。それらの microRNA のうち、miR-10a、miR-16、miR-21、miR29a、miR-122 のエキソソーム内発現と細胞内発現について RT-PCR 法によって調べた。その結果、大腸癌細胞に発現する miR-10a、miR-16、miR-21、miR29a はエキソソーム内にも発現が確認された。しかし、肝臓特異的 microRNA である miR-122 は細胞内にもエキソソーム内にも検出されなかった。これらの結果は、エキソソーム内における発現パターンは細胞内における発現パターンと類似することが明らかになった。

エキソソームは、後期エンドソームが多胞体 MVB (multivesicular body) へと成熟する際に MVB 内で形成される直径 40~100 nm 程度の膜内小胞のことである (Mathivanan et al. *J Proteomics*, 2010.)。エキソソームは MVB が細胞膜と融合することによって細胞外へ放出されると考えられている。このエキソソーム内には細胞内の様々な成分の一部が含まれており、近年エキソソーム内在性成分の解析が盛んに行われてきている (Mathivanan et al. *Proteomics*, 2009.; Simpson et al. *Proteomics*, 2008.)。エキソソームに内在する成分は由来する細胞の種類によって異なるため、それぞれの細胞株から分泌されるエキソソーム内にどのような成分が存在するか明らかではない。本研究ではまず大腸癌細胞株由来エキソソームの回収マーカーとして有用なテトラスパニンファミリー (CD63、CD9、CD81) の検出をウエ

スタンブロットングで行い、エキソソーム内在性 RNA の検出を RT-PCR 法によって行った。また大腸癌細胞が分泌するエキソソームに内在する微量 RNA を増幅し、マイクロアレイによるプロファイリングを検討した。

ウエスタンブロットングによってテトラスパニンファミリーの検出を検討した結果、CD81 がすべての大腸癌細胞株由来エキソソームから検出された。このことから CD81 が大腸癌細胞株由来エキソソームマーカーとして最も有用であると言える。HCT-15 では CD63、CD9、CD81 のすべてのマーカーが検出され、SW480 では CD9 および CD81、WiDr では CD81 のみが検出された。この結果を超遠心法によるエキソソーム回収量の結果と比較すると、マーカーの発現種類が少ない細胞ほどエキソソームの回収量が多い結果が得られた。Petersen らは B リンパ芽球系細胞の CD63 をノックダウンするとエキソソームの分泌量が増加することを報告した (Petersen et al. *Eur J Immunol.*, 2011.)。Petersen らの報告と我々の結果からも、発現しているテトラスパニンの種類や量がエキソソームの分泌量に關与している可能性が考えられる。

エキソソームから抽出された RNA を用いて RT-PCR 法を行ったところ、エキソソーム内には mRNA、microRNA、アンチセンス RNA が存在することが確認できた。さらにマイクロアレイ解析によって多くの種類の mRNA、microRNA、アンチセンス RNA を同定しており、今後論文報告及び Gene Expression Omnibus ヘデータの登録を行く予定である。特にエキソソーム内にアンチセンス RNA が存在することは今回我々がはじめて報告しており (発表論文 Chiba et al. *Oncol Rep.*, 2012.)、今後バイオマーカーとしての候補や有用性の検討をしていきたい。

本研究によって大腸癌細胞株から分泌されるエキソソーム内には mRNA、microRNA、アンチセンス RNA など様々な RNA 種が存在することが明らかになった。また、血清中・培養上清中に存在するエキソソーム内在性 RNA を増幅し、アンチセンス RNA の網羅的発現解析を行うことに成功した。今後は、これらのデータや技術を応用して大腸癌誘導モデル動物やヒト大腸癌患者の血清を使用して大腸癌特異的な血清中アンチセンス RNA バイオマーカーの同定の研究を行う予定である。

## 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 2 件)

1. Chiba M, Asari S, Kimura M, Nakamura T: An efficient method for high-fidelity messenger RNA amplification from a

small amount of total RNA. *Biomed Rep* 1:105-110, 2013. (査読有)

DOI: 10.3892/br.2012.15

2. Chiba M, Kimura M, Asari S: Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell line. *Oncol Rep* 28:1551-1558, 2012. (査読有)

DOI: 10.3892/or.2012.1967.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千葉 満 (CHIBA MITSURU)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号: 20583735

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: