

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462388

研究課題名(和文)腫瘍血管内皮細胞由来exosomal-miRNA の癌診断治療への応用

研究課題名(英文)Application of tumor endothelial derived exosomal-miRNA for cancer diagnosis and therapy.

研究代表者

土屋 邦彦 (Tsuchiya, Kunihiko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50374442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん細胞由来miRNAs がexosome を介して血管内皮細胞に輸送されることで発現が変動し、さらに癌の浸潤転移を誘導する腫瘍血管内皮miRNAの同定を試みた。ヒト正常腎組織及び腎がん組織から血管内皮細胞を分離・培養し、miRNA の発現を解析し、公開されているデータベースを用いて腫瘍血管内皮細胞miRNA の標的遺伝子をピックアップした。これらのmiRNAの中にがん細胞の浸潤転移を促進するものが認められた。腫瘍血管はmiRNAを介してがん細胞に働きかけその悪性化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have tried to identify tumor endothelial miRNAs which are exported by tumor exosome and induce cancer invasion and metastasis. Normal and tumor endothelial cells were isolated from human normal renal tissue and renal tumor tissue respectively. miRNAs were isolated from each endothelial cells and compared to each other by miRNA array. miRNA target genes were identified using public data base. Among miRNA which were picked up, we identified miRNA that induce cancer invasion and metastasis. These results suggested that tumor blood vessel affect cancer cell phenotype via miRNAs.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎癌 miRNA

1. 研究開始当初の背景

進行性腎癌に対する治療に分子標的薬が次々に登場してきているが、その有効性は十分なものではなく、重篤な副作用も報告されている。また、治療効果を予測するバイオマーカーも未だ確立されたものがなく、有用なバイオマーカーの探索が期待される。

がんのバイオマーカーとして血液や尿、唾液など簡便・迅速に採取できる体液サンプルが注目されており、がん細胞由来と考えられる特定のタンパクや断片化した DNA、mRNA・miRNA がバイオマーカーとして報告されている。一方で、高塩濃度・高タンパクや各種酵素の存在から検出が困難であること、精度や再現性の低さから臨床応用には至っていないのが現状である。

近年、申請者らの研究グループでは腫瘍組織から分離・培養した血管内皮細胞(腫瘍血管内皮細胞)が正常な血管内皮細胞と異なる形質を示すことを報告してきた。こうした病理的な血管内皮では分泌タンパクの発現が亢進することも分かっており、現在臨床診断への応用展開を進めている。このような結果から、これまでがん細胞に起因すると考えられていた診断マーカーが、腫瘍間質に存在する血管内皮細胞由来である可能性が考えられる。

体液中に分泌され得る腫瘍血管内皮細胞由来の物質として、本研究では exosome へ着目した。Exosome とは様々な細胞が分泌し、細胞の膜脂質由来である直径 30-200 nm 程度の小胞である。また、exosome は熱・強酸・高塩濃度などの環境へ耐性があり、前述した体液においても安定に存在することから、バイオマーカーとしての注目を集めている。しかしながら、がん細胞だけではなく血管内皮細胞や血小板などの正常細胞も exosome を分泌することから、病理的な exosome の組成物を区別して検出する必要がある。Exosome には miRNA と呼ばれる約 20 塩基程度の短鎖 RNA が含まれることが知られている。miRNA は相補的な配列を標的として数百の遺伝子発現を制御することから、バイオマーカーとしてだけでなく生理的意義に関しても関心を集めている生理活性物質である。申請者らの研究においても、がん細胞由来の exosome に高発現する miRNA を同定することに成功している。そこで本研究においては、腫瘍血管内皮細胞が分泌する exosome にも特定の miRNA が含まれる、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

腫瘍血管内皮細胞由来 exosome へ特異的に含まれる miRNA を同定し、がん患者の血漿に含まれる exosome からの検出を試みる。さらに臨床情報と比較することで、がんの早期診断・治療方針への応用が可能な新規バイオマーカーとしての有用性検討を目標とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト血管内皮細胞由来 exosome の単離

ヒト正常腎組織及び腎がん組織から血管内皮細胞を分離・培養し、培養上清から超遠心法及び免疫沈降法を用いて exosome を単離する。免疫沈降における exosome の標識には、exosome の膜抗原として知られ

る CD9、CD63 の抗体を用いる。

(2) Exosome 中の miRNA 解析

申請者らはマイクロアレイを用いた解析によって、がん細胞由来 exosome に miR-1246 が高発現することを報告した。同様の方法で正常/腫瘍血管内皮細胞由来 exosome から miRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて miRNA の組成を解析する。特に腫瘍血管内皮細胞由来 exosome で高発現する miRNA を選別し、Taqman-qPCR 法で再現性を確認する。

(3) 腎がん臨床血液検体由来 exosome 中における腫瘍血管内皮細胞由来 miRNA の検出

申請者らはこれまで肺がん患者血液検体から超遠心法を用いて exosome を単離し、がん細胞由来 exosome で高発現する miR-1246 の発現を検討している。同様の手法で腎がん患者血液検体 exosome から miRNA を抽出し、Taqman-qPCR 法で腫瘍血管内皮細胞由来 exosomal-miRNA の発現を解析する。腎がん血中 exosomal-miRNA の発現量と臨床情報との比較

(4) 血中 exosomal-miRNA の発現量とがん患者の臨床情報との比較をし、がんの進行度・悪性度と有意に相関するかを検討する。マウス腫瘍移植モデルを用いた 3)、4) の検証動物実験においても 1) - 3) の現象を再現できるかどうかを下記 2 項目について解析することで、腫瘍の進展度合い並びに悪性度との相関を検証する。腫瘍生着後から経時的に採血を行い、血中から exosome を単離する。Exosomal-miRNA の発現を qPCR で解析し、移植後日数・腫瘍径との相関を比較する。メラノーマ細胞株から樹立された高転移能を有するメラノーマ細胞株を用いて、腫瘍血管内皮細胞の特性解析をおこなってきた。同様の系を用いることで、転移能の高低が腫瘍血管内皮細胞由来 exosomal-miRNA の血中発現に影響するかどうかを検討する。

(5) データベースを用いた腫瘍血管内皮細胞由来 exosomal-miRNA のパスウェイ解析

公表されているデータベース(Target scan, miRanda 等)を用いて腫瘍血管内皮細胞由来 exosomal-miRNA の標的遺伝子をピックアップする。ピックアップした遺伝子群の変動にどのような生理的意義があるかを検討するため、パスウェイ解析ソフトウェア(Ingenuity Pathway Analysis)を用いた解析をおこなう。本解析によって、腫瘍血管内皮細胞由来 exosomal-miRNA ががんの進展・転移に関与するかどうかのみならず、腎原性肝障害(Staffer 症候群)、高 Ca 血症、赤血球増多症(多血症)や貧血といった腎がんの合併症等にも関与し得るかを検討することができる。

(6) 腫瘍血管内皮細胞由来 exosomal-miRNA のがん細胞に対する作用の検討

申請者らはこれまで腫瘍血管内皮細胞の培養上清は、がん細胞の増殖・運動を亢進させることを見出している。近年、分泌された exosome が他の細胞へ輸送されることを示唆する結果が報告されており、申請者らの研究においてはがん細胞由来 exosome が血管内皮細胞へ輸送されることを報告した。これらの結果から、腫瘍血管内皮細胞由来 miRNA が exosome を介してがん細胞へ輸送されることで、がんの増殖・運動を亢進させる可能

性が考えられる。この仮説を検証するため、exosome 分泌阻害剤である GW4869 で処理した腫瘍血管内皮細胞の培養上清では、がん細胞の増殖・運動亢進をキャンセルできるかどうかを検討する。腫瘍血管内皮細胞由来 miRNA と同じ配列を有する人工 RNA (mimic nucleotide) をがん細胞へ transient transfection し、増殖・運動能を検討する。

なお、増殖能の検討には MTS assay 法を、運動能の検討には boyden ' s chamber 法を用いる。

4. 研究成果

ヒト腫瘍のヌードマウス皮下移植モデルから腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞を分離培養した。さらに、ヒト正常腎組織及び腎癌組織から血管内皮細胞を分離・培養し、皮下移植モデル同様腎癌由来の血管内皮細胞が有意に染色体異常を認めることがわかった。また、がん細胞由来 exosome に miR-X が高発現すること、腫瘍血管内皮細胞の培養上清は、がん細胞の増殖・運動を亢進させることを見出した。近年、分泌された exosome が他の細胞へ輸送されることを示唆する結果が報告されているだけでなく、我々もがん細胞由来 exosome が血管内皮細胞へ輸送されることを確認した。これらの結果から、腫瘍血管内皮細胞由来 miRNA が exosome を介してがん細胞へ輸送されることで、がんの増殖・運動を亢進させる可能性が考えられた。マウス・ヒトの異なるがん種から分離した腫瘍血管内皮細胞内で、共通して発現の変動する mRNA 及び miRNA が存在することもわかった。ヒト正常腎組織及び腎がん組織から血管内皮細胞を分離・培養し、培養上清から超遠心法及び免疫沈降法を用いて exosome を単離し miRNA を抽出した。免疫沈降における exosome の標識には、exosome の膜抗原として知られる CD9, CD63 の抗体を用いたマイクロアレイを用いて miRNA の組成を解析するとともに腫瘍血管内皮細胞由来 exosome で高発現する miRNA を検討中である。なお、癌患者血液検体から超遠心法を用いて exosome を単離し miRNA を抽出し解析中である。これまで腫瘍血管内皮培養上清は、がん細胞の増殖・運動を亢進させることを見出している。高転移性のがん細胞由来 exosome に特定の miR が高発現していること、さらにその miR を正常血管内皮細胞にトランスフェクションするとこれまで見出してきた腫瘍血管内皮マーカーの発現の一部 (Biglycan など) が誘導されることがわかった。さらに腫瘍血管内皮由来 miRNA の関与を証明するために、exosome 分泌阻害剤である GW4869 で処理した腫瘍血管内皮細胞の培養上清を用いてがん細胞の形質の変化を検討したところ、腫瘍細胞の浸潤能の低下を認めた。このことからがん細胞由来 miRNAs が exosome を介して血管内皮細胞に輸送されることで、がんの増殖・運動を亢進させる可能性が考えられる。このようにがん細胞からの影響を受けて発現が変動しさらに癌の浸潤転移を誘導することが予想される分子の制御に関わる腫瘍血管内皮 miRNA について解析を進めた。ヒト正常腎組織及び腎がん組織から血管内皮細胞を分離・培養し、miRNA の発現を解析した。公表されているデータベース

(Target scan, miRanda 等) を用いて腫瘍血管内皮細胞 miRNA の標的遺伝子をピックアップした。ピックアップした遺伝子群の変動にどのような生理的意義があるかを検討するため、パスウェイ解析ソフトウェア (Ingenuity Pathway Analysis) を用いた解析をおこなった。

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 10 件)

Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Sato Y., *Hida K. Vasohibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 37, 1219-1226, 2017 査読あり

doi: 10.21873/anticancer.11437

Hida K., Maishi N., Dorcas Akuba-Muhyia Annan, Kondoh M., Hojo T., Umma Habiba, Ohga N., Ishikawa K, Sato M., Torii C., Yanagiya M., Morimoto M., Hida Y., Shindoh M. Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1. *J Oral Biosci*, 59(2017), 50-54, 2017. 査読あり doi.org/10.1016/j.job.2016.10.004

Hida K., Maishi N., Kawamoto T., Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Yamada K., Hojo T., Kikuchi H., Sato M., Torii C., Shinohara N., Shindoh M. Tumor endothelial cells express high pentraxin 3 levels. *Pathol Int*. 66(12), 687-694, 2016. 査読あり

DOI: 10.1111/pin.12474

Hida K., Maishi N., Torii C., Yanagiya M., Annan Akuba-Muhyia Dorcas., Morimoto M., Alam Mohammad Towfik. Comparison of characteristics of mouse immortalized normal endothelial cells, MS1 and primary cultured endothelial cells. *Hokkaido J. Dent. Sci*. 37:40-48, 2016. 査読あり

hdl.handle.net/2115/63416

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Yamamoto K., Kawamoto T., Inoue N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., *Hida K. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic

dysregulation of biglycan. *Sci Rep.* 6, 28039, 2016. 査読あり

doi: 10.1038/srep28039

Yamada K., Maishi N., Akiyama K., Alam Mohammad Towfik, Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A. and *Hida K.: CXCL 12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, *Int J Cancer*, 137(12), 2825-2836 2015 査読あり

DOI: 10.1002/ijc.29655

Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Ohmura H., Yamada K., Torii C., Shindoh M. and *Hida K.: Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel, *Am J Pathol*, 185(2), 572-580, 2015 査読あり

DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017

Ohmura-Kakutani H., Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Iida J., Shindoh M., Tsuchiya K., Shinohara N., *Hida K.: Identification of Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity and a Highly Angiogenic Phenotype, *PLoS ONE*, 9(12):e113910, 2014 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0113910.

Alam Mohammad Towfik, Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y. and *Hida K.: Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker, *Cancer Sci*, 105(12), 1533-1540, 2014 査読あり

DOI: 10.1111/cas.12549.

Otsubo T., Hida Y., Ohga N., Sato H., Kai T., Matsuki Y., Takasu H., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Nonomura K., *Hida K.: Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing the Gene Expressions of Tumor and Normal Endothelial Cells, *Cancer Sci*, 105(5), 560-567, 2014 査読あり

DOI: 10.1111/cas.12394

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y. Hida K.: Tumor endothelial cells in high metastatic tumors promote metastasis via biglycan, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11.2, (Sheraton Boston Hotel, Boston, Massachusetts, USA) (国際学会)

間石奈湖, 樋田京子: 第75回日本癌学会学術総会特別シンポジウム2「癌研究における女性研究者」, “腫瘍血管内皮細胞によるがん転移促進”, 2016.10.7(パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)招待講演
間石 奈湖, 樋田 京子: 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会シンポジウム「酸化ストレスと発がん～最新の知見～」, “活性酸素が腫瘍血管内皮細胞に及ぼす影響”, 2016.8.31(仙台国際センター(宮城県仙台市)招待講演

Maishi N.: Tumor Endothelial Cells Promote Metastasis via Biglycan, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology(国際学会)2016.3.30 (Breckenridge, Colorado, USA)

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K.: Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, Tenth AACR-JCA Joint Conference “Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics”(国際学会)2016.2.17 (Maui, Hawaii, USA)

Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., Hida K.: Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, The European Cancer Congress 2015 (国際学会) 2015.9.27 (Vienna, Austria)

間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本宗子, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞は biglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第 26 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

Maishi N., Hida K.: Tumor endothelial cells instigate metastasis of indolent tumors, Spring Special Symposium of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization (招待講演)(国際学会)2015.5.13 大阪大学

[学会発表](計12件)

微生物病研究所谷口記念講堂（大阪府・吹田市）

間石奈湖，樋田京子：第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会，“腫瘍血管内皮のがん転移促進機構”（招待講演）2015.1.30 奈良県新公会堂（奈良県・奈良市）

Maishi N., Hida K. : The 17th HU-SNU JOINT SYMPOSIUM “Characterization of tumor endothelial cells for development of new anti-angiogenic therapy”，（招待講演）（国際学会）2014.11.28 北海道大学（北海道・札幌市）

間石奈湖，進藤正信，樋田京子：腫瘍血管内皮細胞と腫瘍細胞の相互作用，第56回歯科基礎医学会学術大会・総会，2014.9.26 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

Maishi N., Hida K. : 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, “Characterization of tumor endothelial cells for development of new anticancer drugs”（招待講演）（国際学会）2014.5.26（Istanbul, Turkey）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 邦彦（TSUCHIYA, kunihiko）
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：50374442

(2) 研究分担者

樋田 泰浩（HIDA, Yasuhiro）
北海道大学・大学病院・准教授
研究者番号：30399919

間石 奈湖（MAISHI, Nako）
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：00632423

篠原 信雄（SHINOHARA, nobuo）
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号：90250422