

令和元年6月17日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07189

研究課題名(和文) エクソソーム分泌を制御する因子の同定とその治療応用

研究課題名(英文) Identification of exosome secretion-suppressive miRNAs and its target genes.

研究代表者

吉岡 祐亮(吉岡祐亮)(Yoshioka, Yusuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：60721503

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)：本研究の目的はエクソソームの分泌を制御するマイクロRNA(miRNA)およびその標的遺伝子を明らかにすることで、新規のがん治療へと繋げることである。およそ2000種類のmiRNA mimicが搭載されたmiRNAライブラリと以前、開発したエクソソーム測定技術を用いたスクリーニングを行った。その結果、miR-194がエクソソームの分泌抑制に働いていることを明らかにした。次いで、miR-194の標的遺伝子の探索を行い、最終的にエクソソームの分泌を抑制する遺伝子としてNAPGを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、がん細胞が分泌するエクソソームを介した細胞間コミュニケーションを断つ方法の一つとして、新たながん転移予防薬へと繋がる可能性がある。さらにエクソソームが様々な疾患において、発症、または悪性化に繋がることが報告されてきており、特にアルツハイマー病ではミクログリアがエクソソームを介してタウタンパクを周囲の細胞に伝播し、進行させていることなどが報告されている。そのため、本研究で得られた成果は、がんのみならず、神経疾患や免疫疾患等への応用も視野に入れることができる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes serve as versatile intercellular communication vehicles. Cell-to-cell communication via Exosome cargo contributes to cancer progression in the tumor microenvironment and pre-metastatic niche. Therefore, understanding the critical molecular mechanisms underlying the secretion of exosome in cancer cells is an important issue for developing novel therapeutic strategies. Here, using an original screening system based on ExoScreen assay and a miRNA mimic library containing 2042 miRNAs, exosome secretion-suppressive miRNAs were identified in the breast cancer cell line MDA-MB-231D3H2LN, and the prostate cancer cell line PC-3ML. As a result of the validation, miR-194 was found to inhibit exosome secretion in cancer cells. Moreover, NSF attachment protein gamma (NAPG) which appear to be general components of the intracellular membrane fusion apparatus, was identified as a target gene for miR-194.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：エクソソーム microRNA がん がんの転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、がんは日本人の死因第1位であり、有効な治療法の確立が求められている。死因の最大要因は、がんの浸潤および転移であり、がんの転移を阻害することは重要な課題である。がんの転移については、古くから研究されており、1889年にPagetが「Seed and soil theory」を提唱したように、がん細胞(seed)のみならず、周囲の適切な環境(soil)が転移には重要であると考えられている(Paget S, Lancet, 1889)。すなわち、がん細胞間および、がん細胞とその周囲に存在する免疫細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞などの間質細胞とのコミュニケーションによって転移に必要な環境を整えている。しかし、その詳細は全容解明されておらず、多数のメカニズムが存在していると考えられている。近年、新たな細胞間コミュニケーションツールとして、細胞が分泌する100 nmほどの小胞顆粒エクソソームが注目されている。細胞はエクソソームにmiRNAやタンパク質を内包し、近傍細胞のみならず遠隔地の細胞に対し、機能分子を渡しており、サイトカインやケモカイン、接着分子などの従来の細胞間コミュニケーションツールでは説明が出来なかった現象の解明の糸口になりうる。

申請者は、がん細胞が分泌するエクソソームには血管新生を促すmiRNAが多く含まれており、がん細胞がエクソソームを利用して腫瘍内血管新生を促進し、その結果、転移が促進されることを明らかにした(Kosaka N et al., J Biol Chem, 2013)。他にも、乳がん細胞が分泌する特異的なエクソソームが脳血液関門を破壊することで、脳転移を引き起こすメカニズムを解明した(Tominaga N et al., Nat Commun, 2015)。さらに、大腸がん患者の血液から、がん細胞が分泌した特異的なエクソソームを検出しており、病態を反映したエクソソームが体液中に存在していることも明らかにした(Yoshioka Y et al., Nat Commun, 2014)。以上の結果から、がん細胞が分泌するエクソソームは特異的な分子を含み、体液中を循環し、がんの転移に関与していることが考えられる。国外においてもエクソソームとがん転移に関する報告があり(Peinado H et al., Nat Med, 2012, Le MT et al., J clin Invest, 2014, Fong MY et al., Nat Cell Biol, 2015)、現在、国内外を問わず世界的にエクソソームによる、がん悪性化機構の解明が行われ、その知見は蓄積されつつある。したがって、周囲の細胞もしくは転移巣とがん細胞間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を断つことで、がんの転移を阻害できるという着想に至った。

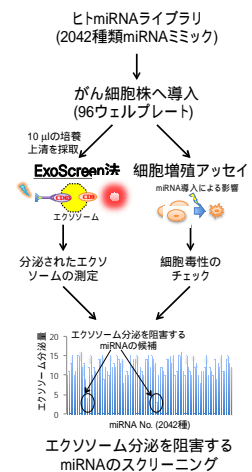
2. 研究の目的

がん細胞が分泌するエクソソームはがん微小環境の形成や転移ニッチ形成に寄与し、がん悪性化に関与している。申請者はこれまで、エクソソームに内包されるマイクロRNA(miRNA)が、がんの転移を促進することを明らかにしてきた。本研究の目的は、エクソソームの分泌を抑制することで、転移を含むがん悪性化を制御する新規がん治療法の開発である。がん細胞は正常細胞と比較して、エクソソーム分泌量が多い傾向があるため(Hannafon BN et al., Int J Mol Sci, 2013)、がん細胞にはエクソソーム分泌を制御する遺伝子の発現が高いか、特異的な分泌経路が存在する可能性がある。そのため、がん細胞特異的に分泌を制御できる可能性がある。エクソソームの分泌経路には複数分子の関与が示唆されており、いくつか関連分子は報告されている(Ostrowski M et al., Nat Cell Biol., 2010)。しかし、それら分子の発現を抑制してもエクソソームの分泌は半分も減少しないことから、分泌経路も複数経路あるという見方もあり、全容解明には至っていない。本研究では、これらを踏まえ、がん細胞のエクソソーム分泌を制御する新たな分子の同定と、それら分子を標的とし、エクソソーム分泌の阻害による新たながん治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) エクソソーム分泌を制御するmiRNAの同定

乳がん細胞株 MDA-MB-231LN と前立腺がん細胞株 PC3ML において、miRNA ライブラリからエクソソームの分泌を制御するmiRNAを網羅的にスクリーニングするため、miRNA ライブラリと以前、申請者が開発したエクソソーム測定法、ExoScreen 法 (Yoshioka Y et al., Nat Commun, 2014) を利用してエクソソームの分泌量を測定した(右図)。ExoScreen 法を用いて 96 ウェルプレートで培養後、miRNA ライブラリを用いて約 2000 種類の miRNA mimic を細胞に導入し、導入後、培養上清 10 μ L からエクソソームの分泌量を定量した。また、培養上清中のエクソソーム量は細胞数に比例すると考えられるため、培養上清 10 μ L を分取した後、MTS アッセイにより各ウェルの細胞数を測定し、補正した。明らかに細胞死が誘導されているウェル(miRNA)は除いた。



(2) エクソソーム分泌を制御するmiRNAの標的遺伝子の同定

miRNAの標的遺伝子を絞り込むため、それぞれ選択したmiRNA mimicを導入した細胞からRNA抽出を行い、mRNAのマイクロアレイ解析を行い、ネガティブコントロールmimicと比較して、発現が減少しているmRNAを標的遺伝子の候補として挙げた。さらに、in silicoデータベースを用いて、選択した候補miRNAの標的遺伝子と予測される遺伝子と一致する遺伝子を絞り込む

だ。同様のサンプル群にて、それら標的遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で確認した。その後、miRNA mimic を導入することで、発現が減少する遺伝子の 3' 非翻訳領域(3' UTR)をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだベクターを作製し、miRNA の翻訳抑制によるルシフェラーゼ活性の減少を評価することで、直接発現を抑制する標的遺伝子であることを証明した。

4. 研究成果

(1) エクソソームの分泌を抑制する miRNA の探索を目的とし、乳がん細胞株 MDA-MB-231LN と前立腺がん細胞株 PC3ML を用いて培養上清中に存在する、エクソソームマーカー CD9 もしくは CD63 が陽性のエクソソーム量を測定した(詳細は方法 1 を参照)。さらに細胞増殖能についても MTS 法により測定を行い、細胞増殖への影響は少ないが、エクソソームの分泌量を低下させる miRNA を候補とした。その結果、複数の候補 miRNA が選定された。これら候補 miRNA について、miRNA mimic を用いて、候補 miRNA を過剰発現させた後、培養上清を回収し、超遠心法にてエクソソームを回収した。回収したエクソソームの粒子数を NanoSight tracking system で解析し、miR-194 がエクソソームの分泌抑制に働いていることを明らかにした。また、乳がん細胞株、乳腺上皮細胞株、前立腺がん細胞株、前立腺上皮細胞株における miR-194 の発現を解析した結果、がん細胞で発現が低下していた。さらに、miR-194 は複数の報告でがん抑制的に働くことが示されており、がん細胞において発現が低下することでエクソソーム分泌を促進し、がん悪性化に働いている可能性が示唆された。

(2) (1)において同定したエクソソーム分泌を抑制する miRNA、miR-194 の標的遺伝子の探索を行った。エクソソーム分泌を抑制する miRNA を乳がん細胞株および前立腺がん細胞株に導入後、RNA を抽出し、mRNA のマイクロアレイを行い、発現が変動する遺伝子を網羅的に解析および、in silico データベースを用いた解析結果から 6 種類の候補標的遺伝子を挙げた。それぞれの遺伝子に対する siRNA を使用して、乳がん細胞と前立腺がん細胞におけるエクソソームの分泌抑制効果を検証した。その結果、エクソソームの分泌を抑制した遺伝子として NAPG に着目した。NAPG が miR-194 の標的遺伝子であるか、3'UTR アッセイによる検証および遺伝子の発現抑制効果を解析した。その結果、NAPG が miR-194 の標的遺伝子であることを明らかにした(右図)。

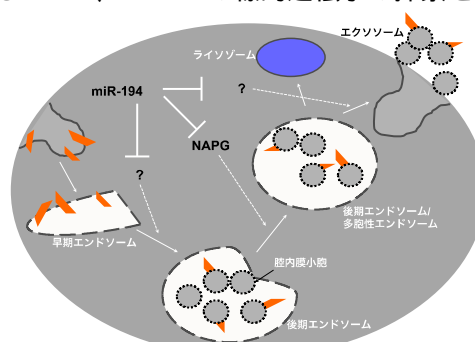


図 本研究で明らかとなった部分

(3) (2)で同定した遺伝子 NAPG の発現解析を行なった。乳がん細胞株、乳腺上皮細胞株、前立腺がん細胞株、前立腺上皮細胞株における NAPG の発現を解析した結果、がん細胞株で NAPG の発現が亢進していた。また、Oncomine データベースを用いて腫瘍組織での NAPG の発現を解析した結果、乳がん、前立腺がんのみならず、各種腫瘍組織で発現が亢進していることが明らかとなった。実際に大腸がん、膵臓がん、メラノーマの細胞株においても NAPG の発現抑制によってエクソソームの分泌が減少した。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 7 件)

- (1) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 落谷孝広. エクソソームを標的とした新規がん治療法の開発 (Development of novel cancer therapeutic methods by targeting extracellular vesicles). 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018.
- (2) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 落谷孝広. 新規エクソソーム分泌制御因子の同定と治療応用. ConBio 2017 (第 40 回日本分子生物学会), 2017.
- (3) Yusuke Yoshioka, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya. MicroRNAs as a regulator of extracellular vesicle secretion in cancer cells. (マイクロ RNA による細胞外小胞の分泌制御とがん悪性化メカニズム). 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017.
- (4) Yusuke Yoshioka, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya. NAPG can regulate tumour-specific EV secretion. 6th International meeting of ISEV, 2017.
- (5) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 落谷孝広. NAPG による細胞外小胞の分泌抑制とがん治療効果の検証 (NAPG regulate EV secretion in breast and prostate cancer cells). 第 4 回細胞外小胞学会, 2017.
- (6) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 富永直臣, 山本雄介, 落谷孝広. エクソソーム分泌を制御するマイクロ RNA と標的遺伝子の同定. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016.
- (7) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 富永直臣, 山本雄介, 落谷孝広. 細胞外小胞エクソソームの分泌を阻害する microRNA およびその標的遺伝子の同定 (Identification of exosome secretion

suppressiv miRNAs and its target genes). 第3回細胞外小胞学会, 2016.

〔図書〕(計 1件)

- (1) 吉岡祐亮, 落谷孝広 編, 化学同人社, 医療を変えるエクソソーム ~生体機能から疾患メカニズム, 臨床応用まで, 2018. 240 ページ

〔その他〕

<http://tokyo-med-mcm.jp>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。