

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15496

研究課題名(和文) がん微小環境におけるエクソソーム由来分泌型非コードRNAの機能とその臨床応用

研究課題名(英文) Functional analysis and clinical application of secreted long noncoding RNAs derived from extracellular vesicles that modulate cancer microenvironment

研究代表者

堀江 公仁子 (HORIE, KUNIKO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：90261982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外小胞(エクソソーム)に含まれる分泌型分子として、免疫関連分子EBAG9によるがん悪性化の仕組みを解析した。EBAG9過剰発現の前立腺がん細胞から細胞外小胞を分離し他のがん細胞に取り込ませると細胞移動能は上昇した。がん由来細胞外小胞をTリンパ球系細胞に取り込ませるとがん細胞への細胞障害性が低下し、EBAG9中和抗体によって回復した。がん細胞外小胞のEBAG9は微小環境を調節してがん増悪に関与することが示された。

子宮内膜がんで高発現のマイクロRNAを低分子RNAシーケンス解析で探索し、がん細胞増殖性を上げる分子に着目して、その候補標的遺伝子をin silico解析と機能実験により同定した。

研究成果の概要(英文)：The role of immune-related factor EBAG9 in cancer microenvironment was analyzed in terms of a secreted molecule mediated from cancer extracellular vesicles, or exosomes. Exosomes were isolated from EBAG9-overexpressing prostate cancer cells and transferred into another prostate cancer cells, leading to an increase in cell motility. Exosomes from EBAG9-overexpressing cancer cells further repressed the cytotoxicity of T lymphocytes against prostate cancer cells. The suppression of T-cell cytotoxicity was recovered by anti-EBAG9 neutralizing antibody. Overall, the study shows that EBAG9 mediated from cancer exosomes will contribute to cancer progression by modulating the microenvironment.

Small RNA sequencing for several endometrial cancer cells identified common microRNAs abundantly expressed in the cells. Among them, one microRNA was further analyzed as it promotes cancer cell proliferation, and its target gene was identified based on in silico and functional analyses.

研究分野：内分泌学

キーワード：エクソソーム 非コードRNA がん微小環境 ホルモン依存性がん

## 1. 研究開始当初の背景

細胞から分泌されるエクソソーム

(exosome) と呼ばれる小胞には、RNAや蛋白質をはじめ様々な分子が含まれており、細胞間の情報伝達におけるツールとしての役割が注目されている。がんにおいては、exosomeが転移に先行して遠隔組織に取り込まれ、exosome中の分子によって転移に適した環境に地ならしを行い、がん微小環境を調節するという仮説が提唱されている。近年、特に、非コードRNAのエピゲノム作用が注目されている。短鎖非コードRNAとして、がん促進的または抑制的なマイクロRNA (miRNA) の存在が知られ、長鎖非コードRNAとして、*HOTAIR*のように転写複合体と協調してエピゲノム作用を担う機能分子の存在が明らかになってきた。ゲノム情報と発現解析に基づきがん特異的非コードRNAを探索する試みが行われているものの、性ホルモン受容体の転写制御機構と関連する非コードRNAについては未だ不明点が多い。がんでは体液中に循環する細胞フリーの核酸の存在が知られ、非コードRNAのうち、短鎖非コードRNAであるマイクロRNAはがん診断マーカーへの応用されつつある。細胞フリーのRNAは、主にナノサイズの細胞外小胞のexosomeに内包された形で分泌され、蛋白分解酵素が含まれる血液中でも安定的に作用する。分泌型RNAはがんの病態によってその種類や量が変化し、がん転移に先行してexosomeががんの飛び道具として遠隔組織に作用し、組織特異的ながん微小環境へ調節する作用が注目されている。

研究開始当初の背景として、研究代表者および研究分担者らの研究グループは、乳がんと前立腺がんを中心にホルモン依存性がんの分子生物学的研究を進めており、がんの治療抵抗性獲得に関連する非コードRNAの作用に注目してきた。乳がんでは短鎖非コードRNAの1つとしてマイクロRNAであるmiR-378a-3pが発現低下し、その標的遺伝子GOLT1Aの過剰発現が予後不良に関連することを報告した (Ikeda, Horie-Inoue et al., *Sci Rep* 5: 13170, 2015)。前立腺がんでは、miR-29 (Takayama et al., *Nat Commun* 6: 8219, 2015) やmiR-216a (Miyazaki, Horie-Inoue et al., *J Clin Med* 4: 1853, 2015)が治療抵抗性に相関して発現上昇し、miR-29ではDNAヒドロキシメチル化を担う酵素TET2を標的にしてがんを進行させる作用機構を明らかにしてきた。前立腺がんの進行と関わる長鎖非コードRNAとして*CTBP1-AS*を発見し (Takayama, Horie-Inoue et al., *EMBO J* 32: 1665, 2013)、RNA結合蛋白質PSF

を介してCTBP1ならびにがん抑制遺伝子にゲノムワイドに転写抑制に働きがん増殖をもたらす新しいエピゲノム作用メカニズムを解明した。研究代表者らは乳がんにおけるホルモン依存性長鎖非コードRNAも複数同定して機能解析を進め、核酸治療の標的分子として臨床応用できる可能性について検討を進めていた。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、本研究は、がん微小環境におけるexosome由来分泌型非コードRNAやその他の分子の機能に着目する。ホルモン依存性がん細胞から分泌される短鎖非コードRNAのマイクロRNAと長鎖非コードRNAのプロファイルを解析して、がん病態の悪化に関連する分泌型非コードRNAや分子を同定することを目的とした。特に分泌型非コードRNAや分子による内分泌メカニズムを明らかにし、exosome由来の非コードRNAや分子を分子標的としたがん診断・治療への応用を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

[前立腺がんにおけるexosome由来EBAG9作用の解析]

前立腺がんを増悪させる可能性が以前から注目されてきたがん免疫関連因子であるEBAG9に注目し、exosomeを介して分泌型因子としてがん微小環境に作用するメカニズムについての解析を行うこととした。個体におけるがん微小環境下でEBAG9の作用検討のため、前立腺がん発症モデルTRAMPマウスを使用し、これを研究代表者らのグループで確立した*Ebag9*遺伝子欠損マウスと交配して、*Ebag9*KO;TRAMP(+)マウスを作製した。コントロールとして、*Ebag9*遺伝子が正常マウスをTRAMPマウスと交配させた*Ebag9*WT;TRAMP(+)マウスを作製し、*Ebag9*KO;TRAMP(+)マウスと*Ebag9*WT;TRAMP(+)マウスにおける前立腺がんの発症の程度について比較検討を行った。前立腺がん細胞におけるEBAG9の発現を抑制するため、*EBAG9*遺伝子に対するsiRNA製剤 (RNAi社) とRNAiMAX試薬 (Life Technologies社) を用いて、ヒト前立腺がんLNCaP細胞におけるEBAG9の発現を抑制し、遺伝子発現性を定量的RT-PCR法により検討した。細胞移動能の評価は、8.0マイクロメートルの孔サイズをもつPETフィルター (Becton Dickinson社) を通過した細胞をギムザ染色し、顕微鏡5視野におけるフィルター下部の細胞数の平均値で検討した。EBAG9結合分子とし

て研究代表者らのグループが独自に同定したTM9SF1について、がん細胞での発現を調節することにより細胞移動能への影響を検討した。前立腺がん細胞におけるEBAG9の作用を増強したモデル系として、LNCaP細胞にEBAG9を安定的に過剰発現させた細胞と、発現ベクターのみを安定的に発現させたコントロールのLNCaP細胞を作製した。これらのLNCaP細胞からexosomeを超速心を用いて分離し、その中に含まれるEBAG9蛋白質の発現をEBAG9特異的抗体を用いて、Westernブロットにより検出した。さらに、EBAG9過剰発現がん細胞およびコントロールがん細胞からのexosomeを低毒性の蛍光ラベルの上、別集団のLNCaP細胞培養系に添加し、顕微鏡下でがん細胞へのexosomeの取り込みを観察した。exosomeの取り込みによるがん細胞の移動能に対する影響を検討した。またはLNCaP細胞由来のexosomeをEBAG9中和抗体もしくはコントロールIgGにて4℃で2時間前処理した後に、Tリンパ球のモデル細胞となるMOLT4細胞に2日間反応させ、MOLT4細胞を洗ってからLNCaP細胞と2日間培養し、培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 量をCyto Tox 96細胞傷害性アッセイキット (Promega社) により評価した。

#### [子宮内膜がんの病態に関わる短鎖非コードRNAの解析]

子宮内膜がんの悪性化に関わる短鎖非コードRNAとして、数種の子宮内膜がん細胞株を用いて、Illumina社のHiSeq高速シーケンサーによるマイクロRNAの発現プロファイルを解析した。このうち、子宮内膜がん細胞で共通に高い発現性が認められるマイクロRNAを抽出し、それらに対する発現抑制用または過剰発現用の核酸製剤を子宮内膜がん細胞株に導入し、細胞増殖性をWST-8アッセイで評価した。発現抑制により細胞増殖が起き、過剰発現により細胞増殖が亢進するRNA分子の1つ(miRNA-Xとする)について、その標的遺伝子の候補をマイクロRNAデータベース4種を用いて探索した。miRNA-Xによる候補標的遺伝子のうち、エピゲノム制御に関わる遺伝子に注目し、miR-Xの発現調節によるこの候補標的遺伝子の発現性を定量的RT-PCR法により解析した。候補標的遺伝子の3'-非翻訳領域に存在するmiRNA-X結合部位と考えられる配列をクローニングし、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に組み込んで、ルシフェラーゼアッセイに基づくmiRNA-Xの発現制御の有無を検討した。

#### 4. 研究成果

[前立腺がんにおけるexosome由来EBAG9作用の解析]

前立腺がん発症モデルTRAMPマウスをEbag9欠損マウスと交配したEbag9KO;TRAMP(+)マウスは、TRAMPマウスをEbag9遺伝子が正常マウスと交配させたコントロール動物のEbag9WT;TRAMP(+)マウスと比較して、生後1年で泌尿器系臓器の重量は有意に少ないことから、個体におけるEbag9欠損は前立腺がんの発症を抑制することが示された。また、各マウスの前立腺腫瘍における細胞傷害性Tリンパ球の浸潤を示す指標として、Cd8 mRNAの発現性を定量的RT-PCRで検討したところ、Ebag9KO;TRAMP(+)マウスにおいて有意に発現上昇しており、EBAG9発現はがん微小環境によるがん増殖性を増強する可能性が示唆された。

次に、ヒト前立腺がんLNCaP細胞におけるEBAG9の発現を特異的siRNAを用いて抑制したところ、がん細胞移動能は有意に低下し、細胞移動能に関与するVIMやSNAI1等の上皮間葉移行を促進する遺伝子の発現が抑制された。EBAG9と結合性が確認されたTM9SF1について、LNCaP細胞において特異的siRNAを用いて発現抑制したところ、細胞移動能が有意に低下し、上皮間葉移行を促進する遺伝子の発現も抑制され、EBAG9とTM9SF1の協調的作用が示唆された。EBAG9過剰発現LNCaP細胞とコントロールLNCaP細胞からexosomeを超速心を用いて分離し、westernブロットによる解析により、exosome中にEBAG9蛋白質が分泌されていることが示された。exosomeを別集団のLNCaP細胞培養系に添加したところ、EBAG9過剰発現がん細胞由来のexosomeを反応させたほうがLNCaP細胞の移動能が有意に上昇した。さらに、LNCaP細胞由来のexosomeをEBAG9中和抗体と反応させてからTリンパ球系のMOLT4細胞に作用させると、このMOLT4細胞のがん細胞傷害性が有意に上昇することがLDH放出アッセイにより示された。EBAG9過剰発現がん細胞由来のexosomeは、MOLT4細胞における細胞傷害性関連遺伝子の発現性を抑制させることも示された。以上から、がん細胞由来のexosomeががんそのものと微小環境中の免疫担当細胞に作用してがん増悪を進行させるメカニズムが示され、その中でexosomeに含まれるEBAG9が分泌型因子として重要な役割を担うことが明らかになった。

[子宮内膜がんの病態に関わる短鎖非コードRNAの解析]

子宮内膜がんの悪性化に関わる短鎖非コードRNAとして、数種の子宮内膜がん細胞株を用いて、マイクロRNAの発現プロファイルを解析し、共通で高い発現性が認められるマイクロRNAを抽出した。そのうち、核酸製剤により発現抑制すると子宮内膜がん細胞株の増殖性を低下させ、過剰発現すると増殖性が上昇させるmiRNA-Xについて、マイクロRNAのターゲット探索データベース4種類を用いた*in silico*解析からエピゲノム制御に関わる候補標的遺伝子に着目した。この遺伝子の発現は、子宮内膜がん細胞において、miRNA-Xに対するアンチmiRNA核酸製剤により上昇し、miRNA-X核酸製剤により低下した。また、このmiRNA-X候補標的遺伝子の3'非翻訳領域において、miRNA-X結合部位と考えられる配列周辺を含むルシフェラーゼレポーター遺伝子を作製したところ、miRNA-X核酸製剤によりルシフェラーゼ活性が低下し、miRNA-X結合部位を除いた周辺配列だけを含むレポーター遺伝子ではmiRNA-X核酸製剤によるルシフェラーゼ活性の低下は認められなかった。さらに、子宮内膜がん細胞においてmiRNA-Xの発現低下により抑制された細胞増殖性は、このmiRNA-X候補標的遺伝子のノックダウンにより有意に回復することが認められた。以上より、miRNA-X候補標的遺伝子はmiRNA-Xにより転写レベルで発現が制御されており、miRNA-Xおよびその候補標的遺伝子が子宮内膜がんの増殖に関与する可能性が示された。今後はmiRNA-X候補標的遺伝子のエピゲノム制御作用に着目し、miRNA-Xおよびその候補標的遺伝子のシグナルを介する子宮内膜がんの病態メカニズムを明らかにし、これら分子の臨床応用を目指して解析を進めている。

#### 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4件)

①Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Inoue S. Extracellular vesicle-mediated EBAG9 transfer from cancer cells to tumor microenvironment promotes immune escape and tumor progression. *Oncogenesis* 2018;7(1):7. doi: 10.1038/s41389-017-0022-6. 査読有.

②Mitobe Y, Takayama KI, Horie-Inoue K, Inoue S. Prostate cancer-associated lncRNAs. *Cancer Lett* 2018;418:159-166. doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.012. 査読有.

③Okumura T, Ikeda K, Ujihira T, Okamoto K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Proteasome 26S subunit PSMD1 regulates breast cancer cell growth through p53 protein degradation. *J Biochem* 2018;163(1):19-29. doi: 10.1093/jb/mvx053. 査読有.

④Kawabata H, Azuma K, Ikeda K, Sugitani I, Kinowaki K, Fujii T, Osaki A, Saeki T, Horie-Inoue K, Inoue S. TRIM44 Is a Poor Prognostic Factor for Breast Cancer Patients as a Modulator of NF- $\kappa$ B Signaling. *Int J Mol Sci* 2017;18(9). pii: E1931. doi: 10.3390/ijms18091931. 査読有.

[学会発表] (計3件)

①Kuniko Horie-Inoue, Kazuhiro Ikeda, Yuichi Mitobe, Satoshi Inoue. An Estrogen-Regulated Long Noncoding RNA That Modulates Breast Cancer Growth. ENDO 2018 (米国内分泌学会2018年会) 2018年.

②堀江公仁子、水戸部悠一、池田和博、井上聡. エストロゲン受容体シグナルに関連し治療的抵抗性乳がんの病態に関わる長鎖非コードRNA. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (招待講演) 2017年.

③堀江公仁子. 治療抵抗性乳がんの病態に関わる分子ネットワーク解明への取り組み. 第76回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2017年.

[図書] (計0件)

[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

[http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02\\_G](http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02_GRST/index.html)

[RST/index.html](http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02_GRST/index.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

堀江 公仁子 (HORIE KUNIKO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：90261982

### (2)研究分担者

高山 賢一 (TAKAYAMA KENICHI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：50508075

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )