

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07676

研究課題名(和文) エクソソームの細胞特異性を利用した新規放射線増感剤の開発

研究課題名(英文) Development of a new radiosensitizer utilizing the cell specificity of exosomes

研究代表者

犬伏 祥子 (Inubushi, Sachiko)

神戸大学・医学研究科・特命講師

研究者番号：60585959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：放射線に暴露されたがん細胞の細胞間コミュニケーションのメカニズムはこれまで不明であった。そこで我々エクソソームに着目し、照射および未照射の細胞から分泌されるエクソソーム内に含まれるmiRNAの比較検討を実施した。結果いくつかのmiRNAに変化が見られた。さらに、miR-6823-5pがSOD1 (Superoxide dismutase)を阻害し、それに伴い細胞内ROSの発現上昇およびDNA損傷を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はエクソソームを利用した放射線増感剤の開発のための基礎研究である。これまで放射線増感剤の研究は多くなされてきたが、臓器ターゲティング効果という点で多くの問題があった。本研究により、エクソソームを利用した新たな放射線増感剤の開発に向けた大きな一歩となり得ると言える。

研究成果の概要(英文)：The precise mechanism of intercellular communication between cancer cells following radiation exposure is unclear. The present study aimed to identify novel roles of exosomes released from irradiated cells to neighboring cancer cells. Further analysis using miRNA mimics and reverse transcription-quantitative PCR identified miR-6823-5p as a potential candidate to inhibit SOD1, leading to increased intracellular ROS levels and DNA damage. The present study is the first to demonstrate that irradiated exosomes enhance the radiation effect via increasing intracellular ROS levels in cancer cells.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：エクソソーム 放射線 miRNA 細胞外小胞体

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

日本の死亡率1位はがんで全死亡率の30%を上回っている。さらに高齢化が急激に進んでいることも影響し、より低侵襲で治癒率の高い治療法の開発が望まれている。放射線治療は低侵襲な治療の代表であり、その優れた治療精度のために次世代のがんの治療の筆頭となっている。しかし、膵がんなどの放射線感受性が高い消化管に囲まれた臓器では、投与できる線量が他部位のがんに比べて圧倒的に低いことや、間質が多いことなどから化学療法による十分な放射線効果も得難い。近年、がんの治療において、マイクロRNAを用いた核酸療法の開発が行われている。マイクロRNAとは、わずか20-24塩基程度の、タンパク質をコードしないRNAで、細胞内でのタンパク質発現の調整に大きな役割を担っている。このマイクロRNAを用いた核酸療法の臨床応用に向けてはドラッグデリバリーという大きな課題がある。そこで、申請者らはエクソソームの細胞特異性に着目した放射線増感剤の開発について検討を行っている。エクソソームとは、脂質二重膜を有するわずか100nm程度の細胞外小胞で、エンドソームに由来して細胞外に放出される、細胞間コミュニケーション分子として知られ、この数年で爆発的に研究が進んでいる。放射線照射後の細胞から分泌されるエクソソーム内のマイクロRNAの変化に着目し、その機能を詳細に解析することが、本研究の目的である。

2. 研究の目的

放射線照射後に分泌されるエクソソーム(IR-exo)が内包するマイクロRNAの動態とその役割について明らかにする。IR-exoを取り込んだ未照射のレシピエント細胞の生細胞数が減少すること、がん細胞株に放射線を照射後に分泌されたエクソソーム内のいくらかのマイクロRNAの発現が変動することを見出している。このマイクロRNAを含むエクソソームを取り込んだレシピエント細胞の細胞死誘導機構を明らかにし機能解析することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

膵がん培養細胞であるMIAPaCa-2細胞を用いて、放射線照射後に分泌されるエクソソーム(IR-exo)と未照射の細胞から分泌されるエクソソーム(cont-exo)を単離し、それぞれの実験に使用し、以下の項目について検討を行った。

放射線照によって放出したエクソソーム(IR-exo)の取り込みについての検討

未照射のがん細胞および正常細胞へのIR-exoの取り込み量と生細胞数について、経時的に観察し、免疫蛍光染色を用いて観察し、デジタルマイクロスコープで機械的に測定解析を行う。

IR-exo内のマイクロRNAの解析

3D-gene(東レ)を用いたマイクロアレイ解析を実施する。

マイクロRNAの阻害もしくは過剰発現による細胞死誘導についての解析

の結果から得られた結果をもとに、IR-exoを取り込んだ細胞を模擬するため、miRNAを阻害もしくは過剰発現し、その影響について検討を行う。

4. 研究成果

放射線照によって放出したエクソソーム(IR-exo)の取り込みについての検討

IR-exoおよびcont-exoをそれぞれ単離したのちに、PKH-67でラベリングし、未照射細胞に添加し、取り込みについて蛍光顕微鏡で観察したところ、IR-exoがcont-exoよりより多く取り込まれることを確認した。さらに、IR-exoによる細胞増殖への影響を確認するためにコロニーアッセイを実施したところ、IR-exoは細胞増殖を抑制していることが明らかとなった(図1)。

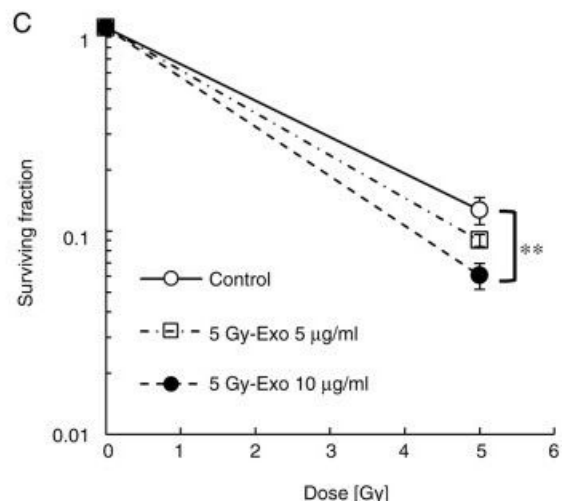
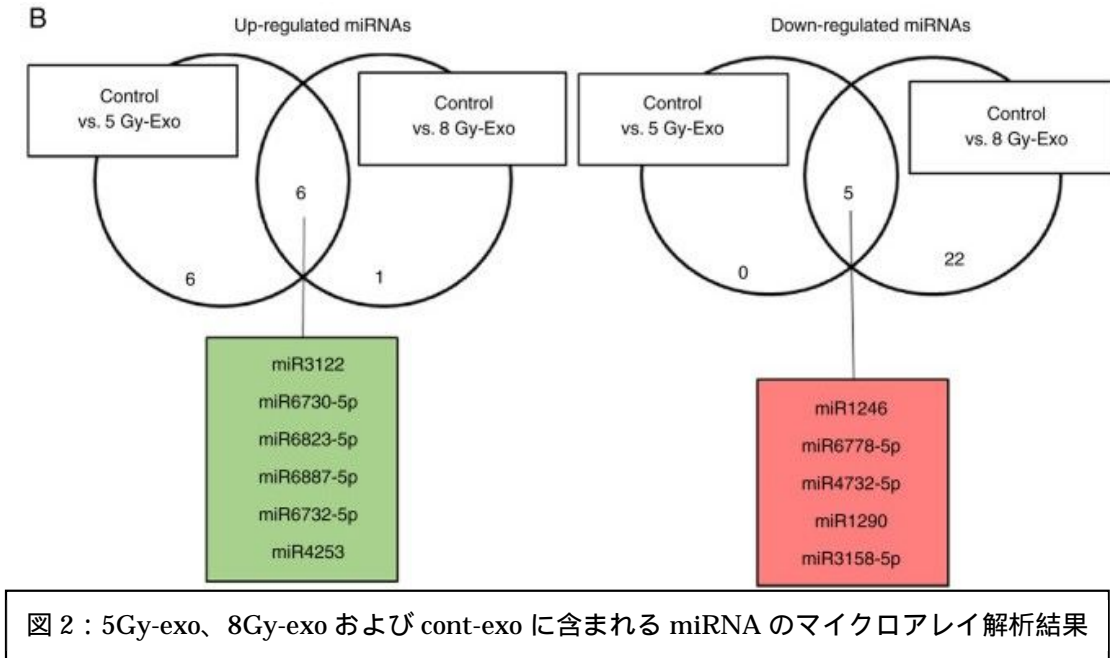


図1：放射線照射後に得られたエクソソーム(IR-exo)による細胞増殖への影響

IR-exo 内のマイクロ RNA の解析

IR-exo (5Gy-exo, 8Gy-exo) および cont-exo の miRNA を単離し、東レの 3D-Gene を用いてマイクロアレイ解析を実施した。その結果、5Gy-Exo と 8Gy-exo の両方において変化が見られたマイクロ RNA があつた (図 2)。これらの結果をもとに、Target Scan など複数個のデータベースを利用し、細胞増殖と関連のあるマイクロ RNA である miR-6823-5p に着目し、その配列から SOD1 に着目した。



マイクロ RNA の阻害もしくは過剰発現による細胞死誘導についての解析

の結果から、miR-6823-5p を過剰発現した場合、SOD1 が抑制されることを明らかにした。さらに miR-6823-5p 過剰発現により、H2AX が増加し、DNA ダメージが誘導されたことを明らかにした。

これらの結果から、IR-exo は細胞に取り込まれやすく、またその細胞内において miR-6823-5p を介した SOD1 の抑制に伴い細胞増殖抑制および DNA ダメージが誘導されていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakaoka Ai, Nakahana Makiko, Inubushi Sachiko, Akasaka Hiroaki, Salah Mohammed, Fujita Yoshiko, Kubota Hikaru, Hassan Mennaallah, Nishikawa Ryo, Mukumoto Naritoshi, Ishihara Takeaki, Miyawaki Daisuke, Sasayama Takashi, Sasaki Ryohei	4. 巻 45
2. 論文標題 Exosome-mediated radiosensitizing effect on neighboring cancer cells via increase in intracellular levels of reactive oxygen species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2021.7964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sachiko Inubushi, Yoshiko Fujita, Sasaki Ryohei
2. 発表標題 Bystander effect of exosomes derived from cervical adenocarcinoma cells in response to irradiation
3. 学会等名 ISEV2018 - International Society for Extracellular Vesicles (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 犬伏祥子、藤田佳子、佐々木良平
2. 発表標題 放射線照射によって分泌された子宮頸部腺がん細胞由来エクソソームのBystander効果の検討
3. 学会等名 第10回日本RNAi研究会 第5回日本細胞外小胞学会JSEV
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 良平 (Sasaki Ryohei) (30346267)	神戸大学・医学部附属病院・教授 (14501)	
研究分担者	宮脇 大輔 (Miyawaki Daisuke) (30546502)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授 (14501)	
研究分担者	吉田 賢史 (Yoshida Kenji) (80351906)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授 (14501)	
研究分担者	下野 洋平 (Shimono yohei) (90594630)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関