

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19489

研究課題名(和文)分泌マイクロRNAの分泌様式と機能による分類

研究課題名(英文)Classification of extracellular miRNAs by function and routes of their secretion

研究代表者

土屋 直人(Tschiya, Naoto)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30322712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織が形成する特異な微小環境、いわゆる腫瘍微小環境(TME)の形成はがん細胞と非腫瘍細胞の細胞間情報伝達で成立する。本研究では、当研究室で単離したmiRNA分泌制御因子(タンパク質X)の機能解析を主として、miRNA分泌様式を理解し、miRNAの機能と合わせて細胞外miRNAの分類をすることを目的とした。肉腫細胞株が分泌するmiRNAを網羅的に解析し、単球細胞のマクロファージへの分化を誘導するmiRNAsを見出した。タンパク質Xはエクソソームとは異なる構造体として細胞外へと分泌され、miRNA複合体の細胞内輸送と細胞外分泌を制御することが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外へと分泌されるmiRNAの機能が様々なヒト疾患の病態誘発に重要な役割を有することは疑いない事実であるが、分泌機能の詳細とそれらの機能、特に腫瘍微小環境中に存在する非腫瘍細胞への影響は不明な点が多い。本研究の成果は、疾患誘発の分子機構について、ゲノム解析等では理解困難な問題を解き明かすことに有用となり、新たな作用機序に基づく治療・診断法の開発に向けた科学的根拠を提示する。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles are regulators of miRNA-mediated intercellular communications to maintain malignant properties of cancer cells. However, detailed mechanisms of how specific miRNAs selected and secreted from cancer cells are not fully understood. We aimed to understand the mechanism of miRNA secretion and to classify extracellular miRNAs by their functions. We found secretion of a similar subset of miRNAs from sarcoma cells. Two of them were found to induce the differentiation of monocyte to macrophage. Protein X was suggested to be secreted as vesicles (or complexes), which are distinct from exosomes. The RNA processing proteins and specific miRNAs were enriched in the protein X fraction. Secretion of these miRNAs were not affected by an exosome inhibitor. Screening intracellular molecules indicated the binding of the protein X with Exportins and RAB family proteins. These results suggest that the protein X is regulator for the intracellular protein and miRNA trafficking.

研究分野：分子細胞性bつ学

キーワード：細胞外miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんの発生・悪性化の過程では、複雑でダイナミックな周囲の環境変化が生じており、がん細胞の増殖や浸潤・転移能の維持に必須である。所謂、がん微小環境の維持には、がん細胞から分泌されるサイトカインや成長因子などが重要であるが、細胞外小胞( Extracellular vesicles: EVs )や分泌マイクロ RNA ( miRNAs ) の機能も極めて重要であることが解ってきた。がん細胞から分泌される miRNAs は、受け手細胞の遺伝子発現プロファイルのリプログラミングを可能とし、細胞特性を大きく変化させることに貢献している。しかしながら、がん細胞が如何にして特定 miRNA を選別し、どのような分泌様式で細胞外へと分泌しているのかその詳細は不明な点が多い。エクソソームを含む EVs は、miRNA の細胞外分泌の主要な担体であると考えられている。当研究グループは、特定 miRNA のエクソソームへの取り込み機構に関する研究を行ってきた。肺がん、膵臓がん、大腸がん細胞株のエクソソーム画分に濃縮される miRNA プロファイルを取得し、これらの細胞内発現量の相関を検討すると、2種類のメカニズムで miRNA が分泌されている可能性が考えられた。一つは、細胞内発現量と正の相関を示す細胞外 miRNA であり、内在性の発現量が分泌量を規定していると推察される。一方、細胞内での発現が低いにもかかわらず、細胞外の存在量が多い miRNA も存在する。細胞外への miRNA 分泌機構の詳細は不明である。本研究では、miRNA 分泌様式を網羅的、且つ、詳細に検討し、分泌 miRNA の機能を付加した細胞外 miRNA の分類とカタログ化を実施し、それらの発がんにおける意義を明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究は、miRNA 分泌機構に関して、当研究室で見出した新規複合体 ( X 複合体 ) による分泌様式の詳細な検討と、分泌される miRNA の機能解析を通じて、分泌様式と機能により細胞外 miRNA を分類し、カタログ化することを最終目的とする。

### 3. 研究の方法

細胞外 miRNA の網羅的解析：培養細胞の培養液を回収し、超遠心法によって膜画分を濃縮する。さらに、ショ糖もしくは Optiprep 密度勾配遠心法によって、さらに分画する。当研究室で見出したタンパク質 X とエクソソームマーカーである CD81 もしくは CD9 を指標としてエクソソームと標的画分の濃縮画分を調製し、miRNA シークエンスおよび質量分析を実施した。

細胞内輸送経路の解析：タンパク質 X のリコンビナントを恒常的に発現する細胞株を作成し、タグに対する抗体で免疫沈降し、X と複合体を形成する細胞内因子を質量分析により同定する。免疫染色や生化学的手法を用いて、相互作用の詳細を検討する。また、その分泌経路が細胞内のどのような物質輸送に関連するかも検討する。

細胞外 miRNA の機能解析：肉腫細胞株から細胞外へと分泌される miRNA の網羅的解析を実施する。エクソソーム等の膜複合体によって分泌される miRNA を選択するために、培養細胞の培養上清から直接調製した RNA と、超遠心によって調製した膜画分から調製した RNA をマイクロアレイ解析し、膜画分に濃縮される miRNA 分子を選択した、5 種類の肉腫細胞株を用いて、平均して細胞外への存在量が多い miRNA を選択した。候補 miRNAs をレンチウイルスベクターに組み込み、発現コンストラクトを作成した。それらを肉腫細胞株および血球細胞株へと導入し、表現型の解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### 4-1) 肉腫細胞が分泌する細胞外 miRNA の機能

当研究室では、肉腫の患者血清由来 miRNA を利用した悪性骨軟部腫瘍の層別化マーカー開発を通じて、肉腫細胞が分泌する miRNA は極めて特徴的であること、上皮由来の悪性腫瘍とはそのパターンが異なることを見出した。従って、肉腫の悪性形質維持のために、特徴的な miRNA を分泌すると考え、肉腫細胞由来の細胞外 miRNA の網羅的解析を実施した。また、患者由来肉腫細胞株の細胞外 miRNA も解析し、共通する miRNA が多く分泌されることを見出した。その中でも、top20 miRNA の中から、ランダムに複数の miRNA を選別し、レンチウイルス発現ベクターを構築して、機能解析を実施した。これら miRNA の中には、血清中の発現がすでに確認されている miRNA から、機能未知の miR-X と miR-Y を含んでいる。興味深いことに、miR-X と miR-Y を肉腫細胞に発現させても、増殖や生存になら影響を与えなかったが、単球細胞株である THP-1 に導入すると、顕著に細胞増殖能が亢進することがわかった。即ち、分泌細胞自身が取り込んで、表現型には影響を与えず、微小環境中の非腫瘍細胞への影響が大きいと推察される。他の miRNA の中には、単球細胞の増殖を極めて強く抑制するものがあり、予想通り、細胞外へと分泌される miRNA は多様であると考えられる。miR-X と miR-Y の機能を解析するために、単球細胞へと当該 miRNA の各々を発現させたのち、マイクロアレイ解析により遺伝子発現プロファイルを作成した。細胞内ネットワークの解析から、miR-X と miR-Y は単球細胞のマクロファージへの分化を刺激なしに誘導できること、M1 マクロファージ様の表現型を誘導する可能性が示唆された。また、両 miRNA

は単球細胞に対して類似のネットワークの活性化を誘導するが、標的遺伝子は異なっていた。これらの結果から、肉腫細胞が分泌する miRNAs が腫瘍微小環境中の非腫瘍細胞の表現型を制御することを示している。

#### 4-2 細胞外 miRNA の分類

当研究室で同定したタンパク質 X は、細胞膜と細胞質にドット上に局在する。超解像顕微鏡による解析と細胞外画分の解析から、細胞外へと分泌されるタンパク質であることを見出したが、その機能はほとんどわかっていない。タンパク質 X は、肉腫細胞から分泌される miRNA の標的として同定されたが、その miRNA の細胞外分泌への関連が示唆されていた。その機能の詳細を解析するために、タンパク質 X を siRNA でノックダウン (KD) した後に、遺伝子発現プロファイルを作成した。興味深いことに、タンパク質 X の KD は、膜レセプターからのシグナル伝達系が広範に抑制されること、特定 miRNA の細胞内活性の上昇が示唆された。即ち、細胞膜へのシグナル分子の供給に関連すると考えられる。特定 miRNA の細胞内活性の亢進は、膜レセプターシグナリングの低下に起因するか、タンパク質 X による細胞外への分泌制御異常が原因か、詳細な解析を実施している。細胞株の培養上清から超遠心法により細胞外小胞画分を調製し、さらに密度勾配遠心を実施して、詳細に細胞外画分を分画してイムノプロットで濃縮画分の同定を実施した。その結果、タンパク質 X はエクソソームマーカーである CD81 とは異なる画分にピークがあることがわかった。タンパク質 X が濃縮される画分に同様に濃縮される分子を網羅的に解析するために、質量分析を実施した。予想されたとおり、CD81 濃縮画分では、エクソソーム関連の分子群が濃縮されてくることがわかった。一方、タンパク質 X 濃縮画分には、RNA プロセッシング因子や RNA 結合タンパク質、さらには細胞外基質の制御因子が多いことがわかった。これらの分泌はタンパク質 X の KD によって低下することもわかった。当該画分の miRNA シークエンス解析を実施した結果、エクソソーム画分に濃縮される miRNA とタンパク質 X 濃縮画分に濃縮される miRNAs に大別されることが示唆された。興味深いことに、タンパク質 X 画分に濃縮される miRNAs は、エクソソーム阻害剤によって分泌が抑制されないことがわかり異なる分泌経路であることが示唆された。さらに、細胞内小胞輸送の阻害剤処理によって、細胞外への分泌が上昇する可能性があることが示唆され、新たな分泌経路の存在が示唆された。同条件で、細胞外へのタンパク質 X の分泌は上昇し、RNA 結合タンパク質の細胞外レベルも上昇することがわかった。これらの結果から、タンパク質 X は、特定 miRNAs の細胞内輸送と細胞外分泌経路の制御に加えて、分泌タンパク質の細胞内輸送の制御にも関連する可能性が考えられる。

#### 4-3 タンパク質 X が関連する細胞内輸送経路の解析

これまでの解析結果から、タンパク質 X は細胞内のタンパク質と核酸の輸送を制御する因子であることが強く示唆されるため、細胞内相互作用因子の探索を実施した。EGFP タグを導入したリコンビナントタンパク質 X を恒常的に発現する細胞株を樹立した。EGFP-X は細胞膜への局在と細胞質にドット状の構造体として局在することがわかった。エンドソーム、リソソームと多胞体 (MVB) のマーカータンパク質とは共局在を示さなかった。一方、リサイクリングエンドソームとは部分的に共局在が観察された。さらに、ゴルジ体マーカーとも共局在する可能性が示され、タンパク質 X は細胞内では細胞膜へと向かって物質を輸送する経路に参与することが強く示唆された。そこで、抗 GFP 抗体を用いて、タンパク質 X 複合体を免疫沈降により濃縮し、質量分析により相互作用する細胞内因子の網羅的解析を実施した。コントロールとして EGFP のみを発現する細胞株も樹立し、抗 EGFP 抗体による免疫沈降と質量分析に供した。得られたデータからコントロールに比して濃縮される分子を選択した。さらに、タンパク質 X の KD によって得られた遺伝子発現プロファイルデータと統合的に解析し、候補となる 10 のタンパク質を選別した。これまでの検討から予測されたように、タンパク質 X はエンドサイトーシス等の取り込み経路に関連する因子との相互作用は認められなかった。さらに、リサイクリングエンドソーム制御に関連する Rab 等の因子とは相互作用していることが示唆された。興味深いことに、タンパク質 X と miRNA の核外輸送に関連する Exportin-5 とそのファミリーと相互作用すると考えられた。一方、タンパク質 X は、細胞膜ラフト形成に重要なタンパク質の細胞内輸送や分泌タンパク質の輸送に関連することがわかり、タンパク質 X KD による広範なシグナル伝達抑制の作用機序として説明可能である。

本研究課題は、細胞外へと分泌される miRNA の機能と分泌様式による分類を目的として実施した。研究期間中に新たな miRNA 分泌経路の存在を強く示唆するデータを得た。この分泌経路は、エクソソームや ARF6 小胞とは異なることがわかった。さらに、細胞外 miRNA が、分泌細胞自身というよりはむしろ周辺細胞へ取り込まれた際に強い表現型を誘導する可能性を見出した。細胞外 miRNA の機能全容を理解することは、様々な疾患生物学を理解する上でも極めて重要であり、本研究の成果を足掛かりとして更なる進展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Asano N., Matsuzaki J., Ichikawa M., Kawauchi J., Takizawa S., Aoki Y., Sakamoto H., Yoshida A., Kobayashi E., Tanzawa Y., Nakayama R., Morioka H., Matsumoto M., Nakamura M., Kondo T., Kato K., Tsuchiya N., Kawai A., Ochiya T	4. 巻 10
2. 論文標題 A serum microRNA classifier for the diagnosis of bone and soft tissue sarcomas of various histological subtypes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09143-8.	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 -

1. 著者名 土屋 直人	4. 巻 296
2. 論文標題 野生型・変異型p53とマイクロRNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 390-396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano N, Matsuzaki J, Ichikawa M, Kawauchi J, Takizawa S, Aoki Y, Sakamoto H, Yoshida A, Kobayashi E, Tanzawa Y, Nakayama R, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Kondo T, Kato K, Tsuchiya N, Kawai A, Ochiya T	4. 巻 10
2. 論文標題 A serum microRNA classifier for the diagnosis of sarcomas of various histological subtypes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09143-8	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 -

1. 著者名 Fujiwara Y, Saito M, Robles AI, Nishida M, Takeshita F, Watanabe M, Ochiya T, Yokota J, Kohno T, Harris CC, Tsuchiya N.	4. 巻 33
2. 論文標題 A Nucleolar Stress-Specific p53-miR-101 Molecular Circuit Functions as an Intrinsic Tumor-Suppressor Network.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 33-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.06.031.	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 -

1. 著者名 1. Tsuchiya R, Yoshimatsu Y, Tsuchiya N, Ohtori S, Kawai A, Kondo T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Comprehensive miRNA expression analysis for histological subtypes of soft tissue sarcoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 13-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 西山郵子、浅野尚文、土屋直人
2. 発表標題 miR-451a - CMTM6経路は肉腫の悪性化に関与する
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishiyama Y, Asano N, Tsuchiya N
2. 発表標題 CMTM6-mediated maintenance for the malignancy of sarcomas.
3. 学会等名 ACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野末悠真、土屋直人
2. 発表標題 p53変異がん細胞の細胞周期制御におけるNEK9の機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Nishiyama, Naofumi Asano, Tadashi Kondo, Naoto Tsuchiya.
2. 発表標題 CMTM6 is a potential metastasis regulator of EWS cells.
3. 学会等名 AACR annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naofumi Asano, Juntaro Matsuzaki, Junpei Kawauchi, Satoko Takizawa, Eisuke Kobayashi, Robert Nakayama, Masaya Nakamura, Morio Matsumoto, Tadashi Kondo, Ken Kato, Naoto Tsuchiya, Akira Kawai, Takahiro Ochiya
2. 発表標題 Development of diagnostic method for bone and soft tissue sarcomas of various histological subtypes using serum microRNA profiles.
3. 学会等名 ASCO annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山郵子、浅野尚文、近藤格、土屋直人
2. 発表標題 肉腫におけるCMTM6による転移発症の分子ネットワークの解析
3. 学会等名 第77回日本がん学会学術総会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------