

機関番号: 32666

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2008~2010

課題番号: 20590200

研究課題名(和文) マイクロ RNA の選択的輸送に関する分子解剖学的動態解析とその病態診断への応用

研究課題名(英文) Dynamic analysis of selective microRNA transport and its application to pathological diagnosis

研究代表者

石橋 幸 (ISHIBASHI OSAMU)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70293214

研究成果の概要(和文): マイクロ RNA (miRNA) は、細胞内で遺伝子発現の転写後調節に関わる低分子 RNA であるが、微小小胞である exosome を介して細胞外にも分泌され、血液等の体液に検出されることから、様々な疾患のバイオマーカーとしての期待も高まっている。しかし、その分泌経路も含めて、miRNA の細胞内動態については不明な点も多い。本研究では、miRNA および関連する蛋白質分子の細胞内動態についてバイオイメージング技術を用いて解析するとともに、exosome を介して細胞外に分泌される miRNA の特徴を明らかにすべく、そのプロファイリングを試みた。

研究成果の概要(英文): MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that play a role in post-transcriptional regulation of gene expression. miRNAs are also secreted extracellularly via exosomes and can be detected in body fluids including blood; thus they could be promising biomarkers for various diseases. However, the intracellular dynamics, including a pathway prior to extracellular release, of miRNAs is not well understood. In this study, we performed bio-imaging analyses to examine intracellular dynamics of miRNAs and miRNA-associated proteins. Further, we performed the profiling analysis of miRNAs that are extracellularly secreted via exosomes to characterize them.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 分子解剖学

科研費の分科・細目: 基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード: 機能解剖学

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトの結果、蛋白質をコードする遺伝子の総数は約 22,000 個と見積もられたが、これは当初の予想をかなり下

回るものであった。一方で、ヒトの場合、全ゲノムの 98%にもおよぶ非コード領域が存在し、この領域の約 2/3 から非コード RNA (ncRNA) が転写されていることが明らかに

された。ncRNA のなかで、マイクロ RNA (miRNA) については現在精力的に研究が進められており、これは標的遺伝子の mRNA に結合してそのタンパク質への翻訳を抑制する。本研究開始時点で 700 種以上の miRNA が同定されており、その中のあるものは発癌等の疾患と深く関わるということが報告されていることから、先端医学のテーマとして非常に高い注目を浴びている。

これまでに、miRNA 前駆体の生合成およびその成熟機構については、多くの部分が明らかにされてきた。しかし、成熟型の miRNA の動態については、Argonaute2 (AGO2) や Rck を含む RNA-induced Silencing Complex (RISC) において標的 mRNA に結合し、GW182 など複数のタンパク質から構成される P-body と呼ばれる細胞内構造体に局在して標的遺伝子産物の翻訳を抑制することが報告されているものの、そこに至るまでの細胞内輸送については詳細な解析がなされていなかった。一方で、Valadi ら (1) により、成熟型 miRNA が exosome と呼ばれる微小粒子に包まれ細胞外に放出されることが報告された。Exosome は血漿中にも多く存在することが明らかにされており、これは、PCR により検出可能な miRNA が血漿中に存在するという我々の実験結果ともよく一致する (2)。さらに、Valadi らは exosome に含まれる miRNA のプロファイルは細胞質内 miRNA のそれと異なることも示しており、このことは、各 miRNA が成熟型に変換された後、P-body に輸送される経路と exosome を介して細胞外に放出される経路に振り分けられるという可能性を示唆している。Exosome は他の細胞との間の分子移動を媒介することから、それに含まれる miRNA はいわば細胞間情報伝達因子として機能する可能性がある。この点で、成熟型 miRNA の動態解析は、その機能を追求していく上でも極めて重要であるが、そのような観点からの研究はほとんど行われていなかった。

## 2. 研究の目的

上述の如く、miRNA は AGO2 や GW182 といった miRNA 関連蛋白質と相互作用し細胞内構造体へ局在するのみならず、exosome を介して細胞外へも分泌される。しかしながら、miRNA がどの時点でこれらの経路に振り

分けられるのかなど、その細胞内動態については不明な点も多い。そこで本研究では、miRNA の細胞内分子動態を、分子解剖学的手法 (バイオイメージング技術) を用いて明らかにする。また、分子生物学的手法 (miRNA クローニング解析) を用いて exosome を介して分泌される miRNA と細胞内に局在する miRNA のプロファイリングを行い、それぞれの特徴を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

### (1) miRNA および miRNA 関連蛋白質のバイオイメージングによる細胞内動態解析

miRNA 細胞内動態の分子解剖学的バイオイメージング解析を行うため、miRNA 関連蛋白質である AGO2、GW182、および Rck について、それぞれ蛍光蛋白質 [Phi-Yellow (PhiY) もしくは DsRed] との融合蛋白質として発現させるための発現ベクターを構築した (図 1)。これらを単独、あるいは 2 つを組み合わせ、COS-7 細胞に導入し強制発現させ、各蛋白質の局在について検討した。さらに、miRNA (*hsa-let-7b*) の 3' 末端を Alexa-594 にて蛍光標識した *hsa-let-7b-Alexa594* を合成し、各融合蛋白質の発現と合わせて COS-7 細胞に導入し、各分子の局在について検討した。これらの miRNA および miRNA 関連蛋白質分子の細胞内動態について、全反射型蛍光顕微鏡 (オリンパス

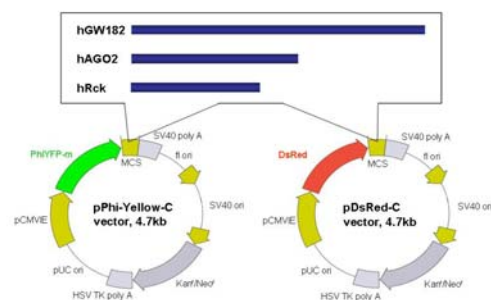


図1 蛍光蛋白質融合miRNA関連蛋白質の発現ベクター

社 IX71-TIRFM-SP) を用いて経時的に観察した。

また、exosome として分泌される miRNA の動態を調べるため、代表的な exosome のマーカーである CD63 を緑色蛍光蛋白質 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) と

の融合蛋白質として発現させるための発現ベクターを同様にして構築した。

さらに、以上の融合蛋白質の発現に関しては、同様の動態観察を他の細胞種でも行うため、および、より安定的な発現を目指すため、アデノウイルス発現ベクターの構築も試みた。

## (2) Exosome に特異的に限局する成熟型 miRNA のプロファイリング解析

本研究を遂行するにあたり、当初の計画では、Valadi ら (1) の報告に基づき実験系に MC9 細胞等を用いる予定であったが、これまでの我々の胎盤に関する研究において多くの使用実績があり (2,3)、培養上製からのエクソソーム回収の手技が確立されている BeWo 細胞 (ヒト胎盤絨毛癌由来細胞) を用いることにした。

BeWo 細胞の培養上清中の exosome を超遠心法により精製した後、これに含まれる RNA を抽出した。続いて、我々が以前に報告した方法 (4) に基づき、低分子 RNA 画分を回収後 cDNA を合成し、クローニングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) miRNA および miRNA 関連蛋白質のバイオイメージングによる細胞内動態解析

PhiY-AGO2 と DsRed-GW182 を同時発現させたところ、両者は P-body と思われる細胞内構造体に共局在することが観察された (図 2)。また、リアルタイム動態解析により、PhiY-AGO2 のみを含む構造体と DsRed-GW182 のみを含む構造体が融合する様子も観察された。さらに、PhiY-AGO2 と *hsa-let-7b-Alexa594* を合わせて導入した場合、両者は微小な構造体の多くに共局在し、さらに PhiY-AGO2 を含む構造体に *hsa-let-7b-Alexa594* が集積していく様子も観察された。

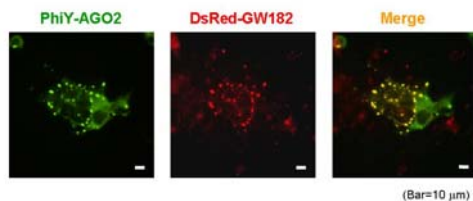


図2 AGO2とGW182の細胞内共局在

DsRed-Rck については細胞質全体に局在を認めるとともに、一部の細胞においてはスポット状に点在していたが、これらは PhiY-AGO2 や DsRed-GW182 の局在とは一致しなかった。一方、蛍光標識 miRNA を合わせて導入した場合、この一部は PhiY-AGO2 と重なって局在した。

一方、EGFP-CD63 を *hsa-let-7b-Alexa594* と同時に強制発現させた場合の、それぞれの動態については、現在、解析を進めている最中である。

なお、miRNA 関連蛋白質のアデノウイルス発現ベクターの構築に関しては、蛋白質の分子量が大きい (100 kDa 以上) こともあり、ウイルスベクターの種類の変更も含め、現在、ウイルスベクターの検討を継続して行っている。

## (2) Exosome に特異的に限局する成熟型 miRNA のプロファイリング解析

Exosome に含まれる低分子 RNA に由来する cDNA をクローニングし、その配列を解析した結果、約半数のクローンが miRNA 由来であった。このように miRNA のクローニング効率が低かったことの原因として、回収された exosome の量が少なく、結果として回収された RNA の量がきわめて少なかったことが考えられる。

今後、細胞培養上清の量を増やし、より多くのエクソソームを回収するとともに、exosome の回収方法についても見直し、クローニング効率の改善を目指す予定である。

## 参考文献

1. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cell. *Nat Cell Biol.* 9: 654-659 (2007)
2. Luo S.S., Ishibashi O., Ishikawa G, Ishikawa T., Katayama A., Mishima T., Takizawa T., Shigihara T., Goto T., Izumi A., Ohkuchi A., Matsubara S., Takeshita T., Takizawa T. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into

maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod.* 81: 717-729 (2009)

3. Ishibashi O., Ali, M.M., Takeshita T., Takizawa T. Abstracts of the 2009th Maruyama Memorial Lectures of the 78th Annual Meeting of the Medical Association of Nippon Medical School: Placental Exosome-Associated MicroRNAs in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *J Nippon Med Sch.* 78: 48-49 (2011)
4. Mishima T, Takizawa T, Luo SS, Ishibashi O, Kawahigashi Y, Mizuguchi Y, Ishikawa T, Mori M, Kanda T, Goto T, Takizawa T. MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. *Reproduction.* 136: 811-822 (2008)

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 2 件)

- ① \*Luo S.S., \*Ishibashi O., \*Ishikawa G, Ishikawa T., Katayama A., Mishima T., Takizawa T., Shigihara T., Goto T., Izumi A., Ohkuchi A., Matsubara S., Takeshita T., Takizawa T. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific micromnas into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod.* 81: 717-729 (2009) 査読有 (\*共筆頭著者)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 石橋 宰. 平成 21 年度丸山記念研究助成金受賞記念講演: 母体血液中の胎盤由来エクソソームを介したT細胞の機能制御と妊娠高血圧症候群における役割の解明. 第 78 回日本医科大学医学会総会. 2010 年 9 月 4 日. 東京
- ② 石橋 宰. マイクロ RNA およびその関連蛋白質分子のリアルタイム動態解析の試み. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2010 年 3 月 30 日. 盛岡 (盛岡)
- ③ 瀧澤 俊広. 胎盤特異的 microRNA は絨毛栄養膜由来でありエクソソームを介して母体血液中に放出される. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2010 年 3 月 28 日. 盛岡 (盛岡)
- ④ 石橋 宰. マイクロ RNA とその関連蛋白質

質分子のバイオイメージング動態解析の試み. 第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2009 年 9 月 26 日. 滋賀 (大津)

- ⑤ 瀧澤 俊広. 胎盤絨毛栄養膜はエクソソームを介して microRNA (miRNA) を母体血液中に放出している: 新しい診断ツールとしての miRNA. 第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会. 2009 年 4 月 28 日. 東京
- ⑥ 石橋 宰. マイクロ RNA とその関連蛋白質分子の動態に関するバイオイメージング解析の試み. 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2009 年 3 月 28 日. 岡山 (岡山)
- ⑦ 石橋 宰. 胎盤絨毛栄養膜は exosome を介してマイクロ RNA を細胞外に放出する. 第 16 回日本胎盤学会学術集会. 2008 年 11 月 13 日. 静岡 (浜松)
- ⑧ 石橋 宰. 胎盤絨毛栄養膜は exosome を介してマイクロ RNA を細胞外に放出する. 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2008 年 10 月 5 日. 長崎 (長崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 宰 (ISHIBASHI OSAMU)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70293214

(2) 研究分担者

瀧澤 俊広 (TAKIZAWA TOSHIHIRO)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90271220

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: