

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月12日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590816

研究課題名（和文） 腫瘍由来エクソゾーム中のマイクロ RNA の機能解析と消化器癌診断への応用

研究課題名（英文） Functional analysis and clinical application of micro RNAs in gastrointestinal tumor-derived exosomes

研究代表者

馬場 英司 (BABA EISHI)

九州大学病院・血液・腫瘍内科

研究者番号：00315475

研究成果の概要（和文）：

ヒト消化器癌細胞が細胞外に放出する小胞であるエクソゾームには、腫瘍特異的マイクロ RNA が含まれているが、その機能や診断的意義は不明であった。本研究では、大腸癌患者血清中のエクソゾームに含まれる腫瘍特異的マイクロ RNA を網羅的解析により同定し、これらが多くの大腸癌患者血清エクソゾームに検出されること、大腸癌組織に特異的に発現している事を見いだした。さらにこの腫瘍由来マイクロ RNA を含むエクソゾームは、腫瘍近傍の細胞内に取り込まれて、そこで遺伝子の翻訳制御に働くことを示した。本研究で腫瘍由来エクソゾームの機能と、診断的意義が示された。

研究成果の概要（英文）：

Exosome is a nanovesicle, which is secreted by human gastrointestinal cancer cells, possesses tumor-specific micro RNA. Function and clinical application of the micro RNA in the exosome remained unclear. The present study identified colorectal cancer specific micro RNA in the exosome of sera by microarray analysis. These micro RNAs were detected most of colorectal cancer patients' sera and cancer tissues. In addition, tumor-derived exosome-containing micro RNAs were absorbed by surrounding cells and regulate gene expression in the recipient cells. These findings indicated the function of tumor-derived exosomes and their diagnostic value.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化器癌、エクソゾーム、マイクロ RNA、末梢血、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

ヒト消化管上皮細胞や血球細胞など多くの細胞から、細胞外にエクソゾームと呼ばれる小胞が放出されている。これは細胞内小器官 MVB 内に形成される径 50-90nm の小胞であり、エネルギー依存性に細胞内や膜上の蛋白質が小胞内に積み込まれ放出されるため、産生細胞外においては近傍の細胞との相互作用を行っている。このエクソゾーム産生の調節機構として、カルシウム依存性シグナルや、*rab11* が関与するなどの報告が散見されていたが、その詳細は明らかではなかった。我々はヒト B 細胞からのエクソゾーム産生調整には、B 細胞レセプターや CD40 分子を介した古典的 NF- κ B 経路が重要である事を明らかにした (Arita et al. Eur J Immunol 2008)。またヒト肺癌細胞株からのエクソゾーム産生を調節する機序として、近年 STEAP3 分子の高発現が関与することが報告された。そのためこの現象が、他の系統の腫瘍細胞においても認められるかを検討することは重要な問題点と考えられ、我々は様々な腫瘍細胞を用いて検証を行った。

一方、エクソゾーム内には核酸、特に mRNA やマイクロ RNA が濃縮されて含まれている事が明らかになった (Lotvall et al. Nat Cell Biol 2007)。しかし、本研究開始の時点では、その生理的、病理学的意義はほとんど不明であった。また核酸含有のエクソゾーム産生の分子機序も示されていなかった。

本研究では、まずヒト細胞から放出されるエクソゾームに mRNA やマイクロ RNA が濃縮されていることを確認し、その mRNA やマイクロ RNA を含むエクソゾームが他の細胞に取り込まれると、その受け手細胞中で当該 RNA が機能を発現することが予想された。研究開始時点ではこれを明確に示す研究は乏しい状況であった。この現象は核酸の新たな水平拡散機序として位置づけられ、*C. Elegans* など一部の例を除くと、多細胞生物における細胞間相互作用の全く新しいコンセプトと考えられた。

2. 研究の目的

消化器癌患者においても、腫瘍細胞が放出するエクソゾームの病的意義や、その生体内での機能は知られていないことから、これらを

解明して病態解明や診断方法の開発に役立てる事が、本研究の目的であった。

3. 研究の方法

我々はこの研究期間中に、まずヒト血清中のエクソゾームおよびこれに含まれる mRNA とマイクロ RNA を安定して抽出する方法を確立した。

複数の大腸癌患者、健常人の血清由来エクソゾーム中のマイクロ RNA を調整し、アレイ法により比較し、大腸癌患者血清エクソゾームに特異的に高発現するマイクロ RNA を、1146 プローブ中、19 種同定した。このうち、腫瘍組織において高発現が報告されているマイクロ RNA 4 種 (miR-137 など) について、さらに多数の患者・健常人検体の血清エクソゾーム中での当該マイクロ RNA の発現量を Real-time PCR 法により測定した。一方、大腸癌手術検体の癌組織と近傍の正常粘膜における当該マイクロ RNA 群の発現を、同じく Real-time PRC 法により測定した。

腫瘍特異的マイクロ RNA 含有エクソゾームが、腫瘍の微小環境を形成する様々な細胞 (免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など) に取り込まれるかどうか、蛍光ラベルしたエクソゾームを用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。受け手細胞内での機能発現は、当該マイクロ RNA の標的遺伝子の蛋白発現量の変化をウエスタンブロッティング法により測定した。またマイクロ RNA が特異的に標的遺伝子 mRNA の 3' UTR に結合するかどうかは、ルシフェラーゼ法により測定した。

一方、腫瘍由来エクソゾームに含まれる mRNA の機能解析を行うために、細胞内アダプター蛋白 CIN85 を過剰発現するヒト腫瘍細胞株を樹立し、これの放出するエクソゾームを調整した。このエクソゾーム内には、CIN85 mRNA が濃縮されているかを Real-time PCR 法により測定した。このエクソゾームを様々な受け手細胞に添加し、その細胞内で mRNA が発現するかを、ウエスタンブロッティング法により測定した。

核酸を含むエクソゾームの産生量を増強する因子として以前報告された膜蛋白 STEAP3 の機能を解析し、RNA 含有エクソゾームの生理的意義を検討するため、腫瘍細胞に STEAP3 mRNA の遺伝子導入を行った。STEAP3

導入細胞株とこれから放出されるエクソゾーム内での、STEAP3 mRNA は real-time PCR 法により、また蛋白はウエスタンブロッティングと FACS により測定した。細胞から放出されるエクソゾームの量と、積み荷蛋白のプロファイルは、ELISA 法とウエスタンブロッティング法により測定した。

4. 研究成果

大腸癌患者血清中エクソゾーム内に含まれる 19 種のマイクロ RNA が、健常人に比較して高発現することをアレイ解析により見いだした。このうち腫瘍組織に高発現する 4 種を選択した。これらの高発現は、手術検体において癌組織に特異的に認められ、また多数の大腸癌患者血清エクソゾーム中でも確認されたことから、大腸癌診療におけるバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

血清中エクソゾームに加え、培養腫瘍細胞から放出されたエクソゾームにも、腫瘍細胞由来のタンパク質 (テトラスパン蛋白群、HLA 分子、接着分子等) が選別されて積み込まれていることを確認した。またこれらには上記で示したマイクロ RNA が濃縮されていた。このエクソゾームは in vitro で、HUVEC や線維芽細胞、樹状細胞などに効率よく取り込まれた。腫瘍由来エクソゾームを取り込んだ、受け手細胞内には、腫瘍由来 mRNA および腫瘍由来マイクロ RNA が移動していることを、real-time PCR にて確認した。腫瘍由来 mRNA (STEAP3, CIN85) を取り込んだ HUVEC では、これらの蛋白発現が増強した。また腫瘍由来マイクロ RNA を取り込んだ細胞では、標的遺伝子の 3' UTR 配列を用いたルシフェラーゼ法により、そのマイクロ RNA が結合してルシフェラーゼ発現を低下させることを示した。

一方、腫瘍細胞からのエクソゾーム産生を増加すると報告されていた STEAP3 蛋白は、様々な腫瘍細胞において、エクソゾーム産生量に影響を与えないことが、ELISA、ウエスタンブロッティング法により明らかとなった。本研究では、STEAP3 分子は、鉄還元酵素としての活性が、低鉄環境における腫瘍細胞の生存に寄与していることを証明した。

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 Taichi Isobe, Eishi Baba, Koichi Akashi et al. Human STEAP3 maintains tumor growth under hypoferric condition. *Exp Cell Res* 317:2582-91, 2011 査読有

② Hiroaki Niino, Eishi Baba, Koichi Akashi et al. CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood* 2012 in press 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① Isobe T, Baba E, Akashi K et al. TSAP6 regulating intracellular iron content maintains tumor cell survival in iron-depleted condition. AACR 100th meeting, USA, 2009. 4. 21

② Isobe T, Baba E, Akashi K et al. STEAP3 maintains tumor cell proliferation and survival by regulating intracellular iron storage. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日

③ 薦田正人、馬場英司、赤司浩一他. Exosome を介した細胞間 small RNA 輸送. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日

④ Isobe T, Baba E, Akashi K et al. The uptake of iron, crucial for cellular proliferation and survival, maintained by STEAP3 expression in cancer. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日

⑤ 薦田正人、馬場英司、赤司浩一他. 癌患者末梢血エクソゾームに含まれる miRNA の検出と機能解析. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 24 日

⑥ Komoda M, Baba E, Akashi K, et al. Detection and functional analysis of miRNA in peripheral blood exosomes from cancer patients. 35th European Society of Medical Oncology Congress. Italy, 2010. 10. 11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 英司 (BABA EISHI)

九州大学・病院・講師

研究者番号：00315475

(2) 研究分担者

赤司 浩一 (AKASHI KOICHI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80380385

新納 宏昭 (NIIRO HIROAKI)

九州大学・病院・助教

研究者番号：20380636

7. 研究内容を記載したホームページ

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed1/oncology/>