

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650645

研究課題名(和文) 体液循環miRNA輸送機構を用いたがん特異的新規DDSの開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer specific DDS utilizing circulating microRNA-derived mechanism

研究代表者

田原 栄俊 (Tahara, Hidetoshi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00271065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームによるDDSの取り込み効率を評価する評価系の構築ためにエクソソームを高分泌する細胞系のスクリーニングをおこないマクロファージでの分泌能が高いことを明らかにした。これらの細胞を用いてエクソソームマーカーであるCD63にGFPを融合したCD63-GFPレンチウイルスを作成しCD63-GFPを発現した細胞を樹立しGFPラベルされたCD63を含むエクソソームが分泌されていることを確認した。CD63-GFPを含むエクソソームを培養細胞から精製して、他の細部に添加したところ高効率にGFPが伝播さえることを確認できたことから、エクソソームはDDSとして用いられる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that macrophage is highly secreted exosome like particle with exosome marker such as CD63 and CD9 and Alix. We made CD63-GFP fusion protein and cloned into lenti-virus vector. CD63-GFP lenti-virus is infected to cancer and macrophage and established cell line stably expressing CD63-GFP fusion protein. We isolated exosome from these cell lines and purified by ultra-centrifugation, and found that these purified exosome is successfully derived to recipient cells. These results suggest that exosome can be a tools for novel DDS of microRNAs.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：がん マイクロRNA 核酸医薬 ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

miRNA は、ゲノムから転写される 20-25 塩基の非常に短い non-coding RNA の一つであり、動植物に広く存在し、細胞の発生、分化、増殖などの様々な生物現象に重要な役割を果たしている。転写後は、一部ギャップを持つ二本鎖 RNA で存在するが、成熟した miRNA は一本鎖で RISC と呼ばれる複合体と結合して、mRNA の翻訳や転写を阻害する (図 1)。miRNA は、siRNA と異なり一つの miRNA で約 100 以上もの遺伝子の翻訳調節 (翻訳阻害) や転写抑制を行うことができ、細胞内の遺伝子調節の新機構として近年世界中で注目されている (*Nature* 455, 64-67, 2008)。

miRNA は、種々の疾患発症などに寄与しており、miRNA を利用した診断や治療が世界中の製薬会社、Alnylam 社を中心としたベンチャーで進んでいる。武田などの製薬会社がライセンス契約を結んだことでもニュースになった。しかし、miRNA を臨床に用いるためには、miRNA デリバリーシステムの問題は全く解決されておらず、これらを打破するブレークスルーが期待されている。

2. 研究の目的

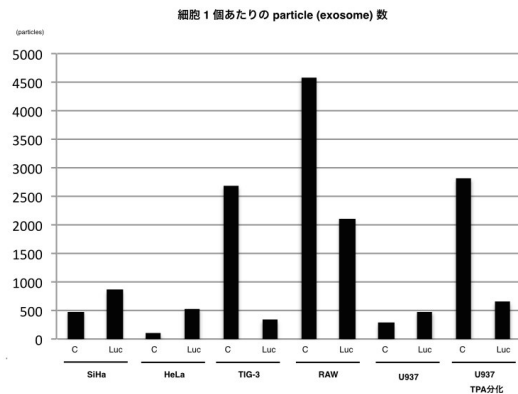
マイクロ RNA (microRNA, miRNA) は、次世代の天然型核酸医薬品として注目されている。しかし、siRNA の核酸医薬化でも問題となっているドラッグデリバリーシステム (DDS) の問題をクリアできないと十分な効果を示さないことが懸念されている。近年、マイクロ RNA は、脂質二重膜構造したエクソソーム (exosome) に包まれて、血清、母乳、唾液などの体液に分泌されていることが明らかになった。分泌された miRNA は、他の組織の細胞に取り込まれることからエクソソーム構造が DDS のキーとなることが考えられる。そこで、本研究では、細胞が作り出すエクソソームを利用した DDS システムを作ることで、次世代核酸医薬の DDS 問題を克服できる技術革新を目的として行う。

3. 研究の方法

miRNA の DDS の効率化を行うためには、まずエクソソームによる DDS の取り込み効率を評価できる評価系の構築が重要である。そこで、分泌されるエクソソームを可視化する系の構築を目指す。つぎに、DDS の評価に用いる特異的な miRNA を細胞に導入して、それらが細胞外に蛍光で可視化されたエクソソームで分泌される系を構築する。可視化したエクソソームを用いて、細胞選択性、臓器特異性が見いだせるかどうかを評価する。最後に、臓器の特異性が見いだされたものは、マウスなどの動物を用いて *in vivo* で評価し、*in vivo* での有用性を実証する。

4. 研究成果

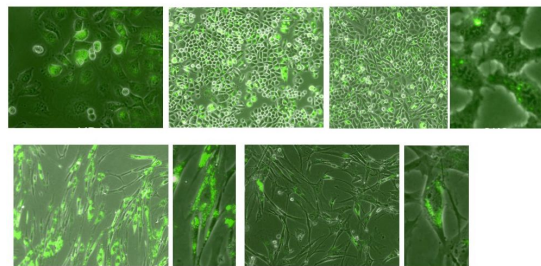
分泌型 miRNA 輸送体として細胞外小胞であるエクソソームを用いるために、細胞外小胞 (EV) を高分泌する細胞系のスクリーニングを実施した。線維芽細胞、上皮系細胞、がん細胞、マイクロファージなどを用いて培養上清に存在する EV の量をナノパーティクル計測器 qNANO を用いて、粒子径分布、細胞あたりの EV 分泌量を計測したところ、マイクロファージが他の細胞に比較して高分泌していることを見いだした。



マイクロファージや線維芽細胞から回収した EV を可視化するためにエクソソームマーカーの一つである CD63 に GFP を融合した CD63-GFP ベクターを細胞内に導入して、CD63 陽性の EV が GFP により可視化できる系を構築した。

これらの細胞の培養上清から回収し、乳癌細胞

Establishment of GFP-CD63 expressing cells



We established five GFP-CD63 expressing cells, MDA231MA-CD63GFP, HeLa-CD63GFP, SiHa-CD63GFP, MRC5-CD63GFP and TIG3-CD63GFP cells

細胞、膀胱がん細胞に添加したところ高効率に標的細胞に GFP が検出された。また、*in vivo* の実験では、ルシフェラーゼ遺伝子を高発現した乳癌高転移がん細胞を膀胱に移植し、膀胱に腫瘍を形成して膀胱でのルシフェラーゼの蛍光を確認した。このマウスに、リポソームに封入したルシフェラーゼに対する siRNA を腹腔内に投与し、膀胱がんでのルシフェラーゼ遺伝子の発現を RT-PCR により確認した。その結果、マウス腹腔内にルシフェラーゼに対する siRNA を導入して、ルシフェラーゼに対する siRNA を腹腔内に投与したマウスの膀胱においてルシフェラーゼの発現の減弱が確認された。また、腹腔内マイクロファージを活性化させるためにグリセロール

を同時に投与すると、その効果が促進された。以上の結果から、in vivo において、細胞外小胞を DDS を応用した核酸医薬のデリバリーにマクロファージ誘導性のエクソソーム DDS が有望であり可能性が示唆された。

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 6 件)

Miyagi T, Shiotani B, Miyoshi R, Yamamoto T, Oka T, Umezawa K, Ochiya T, Takano M, Tahara H., DSE-FRET: A new anticancer drug screening assay for DNA binding proteins., *Cancer Sci.*, 査読有、in press、2014、in press
10.1111/cas.12420.

Shiotani B, Nguyen HD, Hakansson P, Marechal A, Tse A, Tahara H, Zou L. Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1., *Cell Rep.*, 査読有、3(5)、2013、1651-62、
10.1016/j.celrep.2013.04.018

Mikihiisa Takano, Chieko Yamamoto, Keisuke Sambuichi, Keisuke Oda, Junya Nagai, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, and Ryoko Yumoto Introduction of a Single Transporter Gene ABCA3 Directs RLE-6TN to More Type II-like Alveolar Epithelial Cells, *EMBRANE*, 査読有、Vol.38 (5) 2013、246-253

Sato, M., Shin-ya, K., Lee, J.I., Ishihara, M., Nagai, T., Kaneshiro, N., Mitani, G., Tahara, H. & Mochida, J. Human telomerase reverse transcriptase and glucose-regulated protein 78 increase the life span of articular chondrocytes and their repair potential., *BMC Musculoskeletal Disorders*, 査読有、13、2012、1-10、
10.1186/1471-2474-13-51

D. Xu, H. Tahara The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 査読有、65(3)、2012、368-375、
10.1016/j.addr.2012.07.010.

Zhang X, Horibata K, Saijo M, Ishigami C, Ukai A, Kanno S, Tahara H, Neilan EG, Honma M, Nohmi T, Yasui A, Tanaka K. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair, *Nature Genetics*, 査読有、44、2012、593-597、
10.1038/ng.2228.

[学会発表](計 16 件)

1. Hidetoshi Tahara Proteomic analysis of EV in senescence and cancer.

ISEV Workshop on EV Proteomics and Lipidomics (招待講演) 2014年 02月 04日
~ 2014年 02月 04日 Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, University of Melbourne, Australia.

2. 岡田恵、田原 栄俊 老化細胞由来エクソソームの生物学的意義とがん微小環境への影響、がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム 2014年 01月 31日 ~ 2014年 01月 31日 一橋講堂(学術総合センター 2F)

3. 石原えりか、竹下文隆、小坂展慶、高橋陵宇、藏元達谷、塩谷文章、嶋本顕、落谷孝広、田原栄俊 マクロファージ細胞を用いた新規 small RNAデリバリーモデルの構築への試み、第 36回分子生物学会年会 2013年 12月 05日 ~ 2013年 12月 05日 神戸国際展示場

4. 岡田恵, 中村亜由美, 宗岡美紗, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊 老化細胞由来 exosomeの分泌メカニズムと生物学的意義の探索、第 36回分子生物学会年会 2013年 12月 05日 ~ 2013年 12月 05日 神戸国際展示場

5. 岡田恵、中村亜由美、宗岡美紗、藤田知信、河上裕、田原栄俊 細胞老化によって増加する exosome分泌の機能とメカニズム解析、第 5 回日本 RNAi研究会 2013年 08月 29日 ~ 2013年 08月 29日 グランドプリンスホテル広島

6. 田原栄俊 老化を誘導する核酸抗がん剤にむけた exosome DDSの開発、第 29回日本 DDS学会学術集会(招待講演) 2013年 07月 05日 ~ 2013年 07月 05日 京都テルサ

7. M. Okada, A. Nakamura, M. Muneoka and H. Tahara Characterization Of Exosomes Secreted From Senescent Fibroblasts. ISEV 2013 2013年 04月 17日 ~ 2013年 04月 17日 Park Plaza Hotel, Boston, MA USA

8. H. Tahara, M. Okada, M. Muneoka and A. Nakamura Secretory mechanism and functions of senescence-associated exosomes ISEV 2013 (招待講演) 2013年 04月 17日 ~ 2013年 04月 17日 Park Plaza Hotel, Boston, MA USA

9. Hidetoshi Tahara Senescence-associated microRNAs, a novel approach to tumor suppression 9th AACR-JCA Joint Conference (招待講演) 2013年 02月 22日 ~ 2013年 02月 22日 Hyatt Regency Maui (アメリカ)

10. 岡田恵、中村亜由美、宗岡美紗、田原栄俊 細胞老化によって増加する exosome分泌のメカニズム解析 第 35回日本分子生物学会年会 2012年 12月 11日 ~ 2012年 12月 11日 マリンメッセ福岡

11. Hidetoshi Tahara Senescence associated microRNAs and exosomes coordinately regulate cellular senescence and tumor microenvironment, CSH Asia / ICMS (The International Cancer Microenvironment Society) Joint Conference on Tumor Microenvironment (招待講演) 2012年 11月 14日 ~ 2012年 11月 14日 Suzhou Dushu Lake Conference Center (中国)

12. Hidetoshi Tahara Purification and characterization of exosome from blood plasma.

ISEV Research Seminar: Analysis and function of RNA extracellular vesicles (evRNA) (招待講演) 2012年 10月 01日 ~ 2012年 10月 01日 Proskauer office at Eleven Times Square (アメリカ)

13. 岡田恵、中村亜由美、宗岡美紗、田原栄俊 老化細胞由来 exosomeの機能解析, 第4回日本 RNAi研究会 2012年 08月 31日 ~ 2012年 09月 01日 グランドプリンスホテル 広島

14. Hidetoshi Tahara Senescence-associated miRNA and Extracellular Vesicles in Aging and Cancer The 22nd HCS / 4th JARI Joint Symposium (招待講演) 2012年 08月 30日 ~ 2012年 08月 30日 グランドプリンスホテル広島

15. 田原 栄俊 体液中を泳ぐ小さな RNAが変える未来の次世代診断・治療 第 19回日本癌学会市民公開講座(招待講演) 2012年 06月 09日 ~ 2012年 06月 09日 アステールプラザ (広島市)

16. Ayumi Nakamura, Megumi Okada, Nobuyuki Kosaka, Takahiro Ochiya and Hidetoshi Tahara. Role of aging associated exosomes in vitro and in vivo, ISEV meeting 2012 (招待講演) 2012年 04月 21日 ~ 2012年 04月 21日 Conference Center Wallenberg (スウェーデン)

〔産業財産権〕
〔その他〕
ホームページ等
<http://cell.pharm.hiroshima-u.ac.jp>

6. 研究組織
(1)研究代表者
田原 栄俊 (TAHARA HIDETOSHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00271065

(2)研究分担者

落谷 孝広 (OCHIYA TAKAHIRO)

国立がん研究センター研究所・分子細胞治

療研究分野・分野長

研究者番号：60192530