

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460971

研究課題名(和文) 肝癌増殖におけるエキソソームを介した機能性RNA輸送機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) Exosomal transfer of functional RNA in hepatocellular carcinoma cell proliferation

研究代表者

小暮 高之 (Kogure, Takayuki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70400330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム上のultraconserved elementsとその転写産物であるultraconserved RNA (ucRNA)は、生物学的に重要な役割を持つことが強く示唆され、肝細胞癌において、エキソソームを介した輸送されるucRNAの同定と機能解析を試みた。ヒト肝癌細胞株由来エキソソームのucRNA発現の網羅的解析をカスタムPCRアレイプレートを用いて行い、エキソソーム特異的に高発現する複数のucRNAを同定した。ucRNAが肝癌細胞の細胞増殖制御に関与している事が明らかにした。また、ヒト肝癌組織におけるucRNA発現の網羅的解析で、癌部に特異的に高発現を示すucRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：Ultraconserved RNAs are long non-coding RNAs transcribed from ultraconserved elements (UCEs), which are defined as genomic sequences with 100% conservation between human, mouse and rat with length of more than 200 bases and dysregulation of ultraconserved RNAs are reported in many types of cancers. We investigated the exosomal transfer of ultraconserved RNAs in hepatocellular carcinoma. We identified several ultraconserved RNAs up-regulated in exosomes derived from hepatocellular carcinoma cell lines by using a custom PCR array plate and one of the ultraconserved RNAs were involved in the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. We also identified an ultraconserved RNA differentially expressed in human hepatocellular carcinoma tissues.

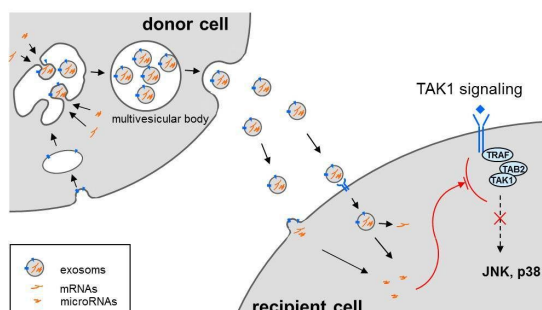
研究分野：肝臓病学

キーワード：肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質をコードしない機能性 RNA の一種である miRNA は、ほとんどのタンパク質の発現制御に関与していると報告され、生物学的機能の調節の中樞を担う重要な分子として認識されている。最終産物であるタンパク質のみを機能分子ととらえた場合に解明が困難であった事象が機能性 RNA により解明される可能性がある。miRNA などの機能性 RNA の発現異常は、癌をはじめとする種々の疾患の原因として報告され、新規バイオマーカーとしてあるいは治療標的として有望視されている。我々は、ヒト肝癌に特異的に高発現する miRNA として miR-221 を見出し、マウス肝癌モデルにおいて miR-221 アンチセンス(miR-221 の阻害剤として働くオリゴ)の静脈投与がその予後を改善することを明らかにし、機能性 RNA を治療標的とした新規治療の可能性を報告した(Park, Kogure et al. Cancer Research 2011)。また、我々は、肝癌の分泌するエクソソームが miRNA を内包して他の細胞へ輸送し、輸送先の細胞で標的遺伝子の発現を調節し得ることを明らかにし、エクソソームを介した miRNA 輸送による細胞間コミュニケーション機構が肝癌増殖の新規のメカニズムであることを報告した(図 1, Kogure et al. Hepatology 2011)。

図1. 肝癌由来エクソソームのmicroRNA輸送を介したTAK1シグナルの抑制



また、血清中に存在する miRNA はエクソソームなどの微小顆粒に内包されて存在することがわかり、近年、癌患者の血清中の miRNA 解析が精力的になされ、これらの発現プロファイルの診断マーカーとしての有用性が報告されている。我々は肝癌の分泌するエクソソーム中に存在する機能性 RNA が肝癌増殖において重要な生物学的機能を担い、更に、患者血清をサンプルとしたバイオマーカーおよび機能性 RNA を標的とした新規治療の開発の可能性を開くであろうとの考えに至った。

2004 年、ヒト、マウス、ラットの三種の間で完全に保存された塩基配列がゲノム上に 481 領域存在することが報告された。これらは三種の共通の祖先が存在した 8000 万年前から保存されていると推定され、ultraconserved elements と名付けられた(Bejerano et al. Science 2004)。Ultraconserved elements はゲノム上にランダムに分布しているわけではなく、その多くはタンパク質をコードしない領域に存在し、かつ、分化・発達に関与する遺伝子および転写因子の近傍に位置することが判明し、生物学的に重要な意味を持つことが強く示唆された。2007 年、ultraconserved elements から RNA が転写されていることが示され、ultraconserved RNAs (ucRNAs)と名付けられた(Callin et al. Cancer Cell 2007)。Callinらにより ucRNAs は白血病・大腸癌において正常と異なる発現プロファイルを示すことが報告された。我々からは、HepG2 細胞に高発現する ucRNA を発見し、TUC338 と名付け、ヒト肝癌組織で高発現し、肝癌の増殖を制御することを報告した。しかしながら、

ucRNA のエキソソームを介した細胞間輸送機構とその肝癌増殖における役割は、まったく明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、肝癌増殖におけるエキソソームを介した機能性 RNA 輸送機構を明らかにし、診断マーカーおよび治療標的の発見を目的とするものである。肝癌細胞の分泌するエキソソームにおいて、近年発見された機能性 RNA である ucRNA の網羅的解析により、エキソソームに高発現する ucRNA を同定し、その機能解析を行った。ヒト肝癌組織において、高発現する ucRNA を同定し、その機能解析を行った。

3. 研究の方法

481 領域の ultraconserved elements から転写される ucRNA のうち、intergenic ultraconserved elements で Chicken, Takifugu とも保存される 95 領域から転写される ucRNA に対してプライマーを設定し、96 穴プレートに分注し、real-time 定量 PCR アレイプレートを作成した (図 2)。TGF-beta 処理した肝癌由来のエキソソームに特異的に高発現する ucRNA を探索した。

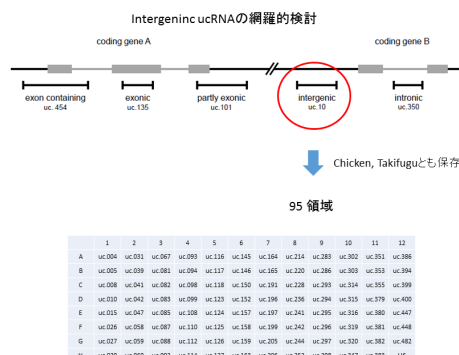


図2. カスタムPCR アレイプレートの作成

同定された uc.83 に対する siRNA を肝癌細胞

に導入し、足場依存性・足場非依存性増殖に対する影響を growth curve assay, ソフトアガーアッセイを施行した。

ヒト肝癌組織 (切除検体) から RNA を抽出し、カスタム PCR アレイプレートを用いて癌部に特異的に発現する ucRNA の探索を行った。

4. 研究成果

肝癌細胞から分泌されたエキソソームは径 40-100 nm の円形を呈していた (図 3)。

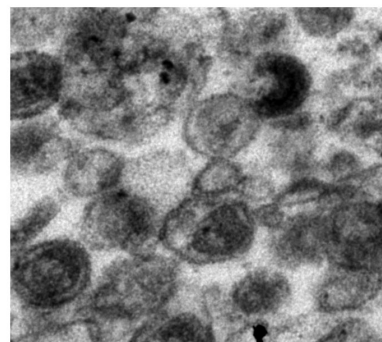


図3. 肝癌細胞由来エキソソームの電顕像

PLC/PRF/5 細胞由来のエキソソーム中の ucRNA 発現プロファイルにおいて、TGF-beta 処理により高発現する ucRNA の一つとして uc.83 が同定された (図 4)。

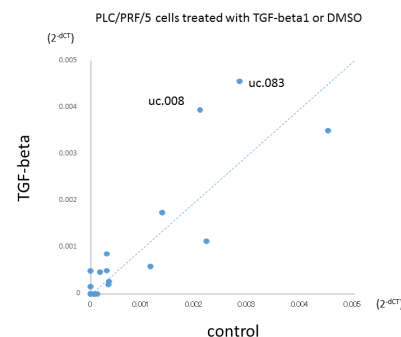


図4. TGF-beta処理したPLC/PRF/5細胞由来エキソソーム中のucRNA発現プロファイル

肝癌細胞(whole)の uc.83 は TGF-beta 処理により発現が増強が確認され、uc.83 に対する

る siRNA にて約 50%の knockdown が可能であった (図 5)。

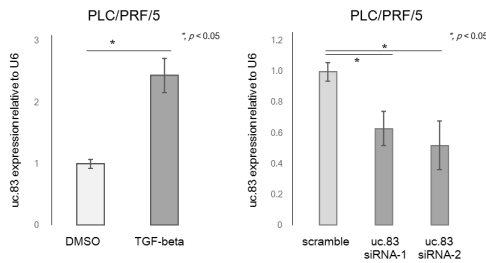


図5. TGF-beta処理したPLC/PRF/5細胞におけるuc.83発現とsiRNAによるknockdown

PLC/PRF/5 細胞において uc.83 を knockdown することにより、足場依存性および足場非依存性細胞増殖の低下を認めた (図 6)。

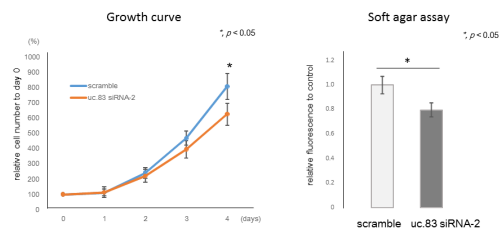


図6. PLC/PRF/5細胞におけるuc.83knockdownの増殖に対する影響

ヒト肝癌組織を用いて ucRNA の発現プロファイルを検討し、背景肝と比較して癌部で高発現する ucRNA の一つとして uc.88 が同定された (図 7)。

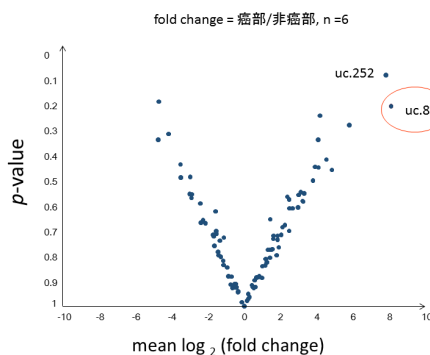


図7. ヒト肝癌組織におけるucRNAの網羅的発現解析

uc.88 は 2 番染色体長腕上に存在する 312

bpの超保存領域であり、この領域に reverse strand から転写される LOC101929512 がオーバーラップして存在することが判明した (図 8)。

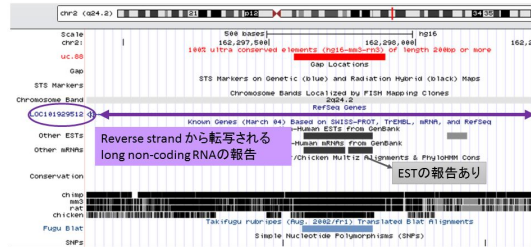


図8. uc.88 (UCSC Genome Browser on Human July 2003 (NCBI34/hg16) Assembly)

TGF-beta でエキソソーム中に発現が誘導される uc.88 を同定し、肝癌細胞の増殖に關与することを示した。また、ヒト肝癌組織に高発現する uc.88 を同定した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小暮高之、近藤泰輝、井上淳、嘉数英二、諸沢樹、藤坂泰之、梅津輝行、高井智、中村拓也、下瀬川徹 肝癌細胞における細胞間コミュニケーションの新規機序 - 細胞外分泌顆粒を介した long non-coding RNA の細胞間輸送 -

第 52 回日本肝臓学会総会 ホテルニューオータニ幕張・東京ベイ幕張ホール 千葉 2016 年 5 月 19 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小暮 高之 (KOGURE, Takayuki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70400330

(2)研究分担者

近藤 泰輝 (KONDO, Yasuteru)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70455822

(3)研究分担者

嘉数 英二 (KAKAZU, Eiji)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教

研究者番号：20509377