

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461882

研究課題名(和文) エクソソームを利用したマイクロRNAの送達による癌の治療感受性の修飾

研究課題名(英文) Modification of radio-sensitivity of cancer by miRNA delivery taking advantage of the exosome.

研究代表者

小川 良平 (Ogawa, Ryohei)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：60334736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線感受性を増強するmiRNAを標的部位に送達するためのベクターとして細胞から放出されるエクソソーム(Ex)と呼ばれる小胞に着目した。Exの生合成に関与する2種類の遺伝子の過剰発現によりExの分泌の増強が認められた。また、放射線の感受性を増強する複数のmiRNAの開発にも成功した。特定のmiRNA分子のEx中への封入を促進する遺伝子の過剰発現も計画したがクローニングできず、検討できなかった。今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we focus on a small vesicle secreted out of a cell called exosome (Ex) as a vehicle to deliver miRNA molecules to a target tissue in the living body. Overexpression of two genes that is involved in biogenesis of Ex resulted in the increase amount of secreted Ex from the cells. In addition, we already obtained two different miRNA like molecules that increase radio-sensitivity of cells when introduced into cells. However, since we have not been able to clone a key gene that is involved in enclosure of RNA molecules into Ex, we could not examine the function of the gene.

研究分野：放射線生物学

キーワード：エクソソーム miRNA 放射線感受性

1. 研究開始当初の背景

miRNA はタンパクをコードしない短鎖の RNA で、mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する相補配列に相同な配列に結合することで遺伝子発現を制御する。miRNA は、通常一つで多くの標的 mRNA に結合し、それらの翻訳を阻害することで遺伝子発現を制御する。一つ一つの標的遺伝子に対する発現阻害は、多くの場合それほど顕著ではないが、一つの生命現象に関与する多くの遺伝子群を総体として制御することで、細胞全体のトーンを変化させる力がある。

近年、この miRNA が細胞外へ分泌され、血中を循環することが示された。この血中 miRNA は、マイクロベシクルやエクソソーム (Ex) といった脂質膜に囲まれた小粒子中に存在することから、血中で安定的に長期間存在し、これらを構成する分子は近隣のあるいは遠隔の組織・細胞に取り込まれて機能することが示されている ()。

人為的に過剰発現した miRNA は、RNAi を引き起こす遺伝子発現抑制複合体 (RISC) を形成するタンパクが Ex への封入に関与することから、Ex に封入されやすいとされている ()。また、miRNA の細胞からの放出は、Ex の形成や分泌に関与する中性スフィンゴミエリナーゼ 2 (n-SM2) や TSAP6 などに制御を受けており、これら遺伝子の過剰発現により、miRNA の放出が増加する (,)。

本研究計画では、Ex の生合成に関係する遺伝子の過剰発現により多くの Ex を産生する細胞を構築する。また、この細胞に特定の塩基配列を持った miRNA を Ex に導入する過程に関与する遺伝子の過剰発現もおこない特定の miRNA など、目的の分子を多く含む Ex を取得する。これらを培養細胞や腫瘍組織に投与することで、細胞や組織の放射線感受性を制御できると考えている。miRNA の導入による放射線感受性の修飾は一過性であり、放射線に曝露されない細胞には大きな影響はないと思われ、最終的には、副作用の少ない効果の高い新規の放射線治療につながることを期待する。

2. 研究の目的

Ex の生合成や分泌に関しては、関与している遺伝子もいくつか知られており、例えば、n-SM や TSAP6 などについては、過剰発現することで Ex の分泌が増えるとの報告がある。このような遺伝子を組み合わせ、さらに多くの Ex を産生する細胞の作成を目指す。

刺激に対する細胞の感受性を増感する miRNA に関しては、治療刺激ごとに多くの報告がある。これら報告されている治療特異的なものに加えて、我々がこれまでに開発した人工 miRNA、治療抵抗性を示す癌幹細胞維持

を阻害するものなどについて一つずつの増感効果を調べ、高い増感効果を示すもの、多くの癌細胞で働くものを見いだしたい。さらに in vitro でそれらの組み合わせについても検証を行い、治療刺激に対する増感効果の高い組み合わせを見いだす。

Ex は、細胞がタンパクや核酸などの生理活性分子を交換するために利用していることが示唆されている。したがって、Ex は、核酸送達のための理想的なキャリアになる可能性がある。しかも細胞が分泌する天然の粒子であり、安全性も高いと思われる。しかしながら Ex を十分に取得することや内部に目的の分子を効率的に導入することは困難とされている。本研究計画では、内容物を制御した Ex を大量に取得することで、それらの評価や組み合わせを検討することを第一の目的とする。これを通して、細胞の治療感受性を制御した上で、従来の治療法を組み合わせることにより、より安全で効果の高い新規の癌治療法開発の可能性を検討することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子クローニング

60 mm の細胞培養皿に培養した 10^6 個のヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞からキアゲン社の RNeasy Mini キット (RNase free DNase 処理も行なった) を使用して細胞から全 RNA を取得した。取得した RNA は、アジレント社の 2100 バイオアナライザーシステムで確認した。この全 RNA を 1 μ g 取り、タカラバイオ社の PrimeScript RT Reagent Kit を使用して cDNA を合成した。通常は、ランダムヘキサマープライマーとオリゴ dT プライマーの両方を使用して cDNA を合成するが、ここではオリゴ dT プライマーのみでの cDNA 合成も行なった。

取得した cDNA を鋳型にそれぞれの遺伝子配列に合わせて設計したプライマーを使用して PCR を行なった。プライマーにタグとして付加した制限酵素の認識配列で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子全長の長さのバンドを回収した。あるいは、それぞれの遺伝子の配列を元に全長を化学合成した DNA 断片を pUC ベクターにクローニングしたのから、末端に導入した制限酵素認識配列で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子全長と同程度の長さのバンドを回収した。これらの調製したそれぞれの遺伝子を含む DNA 断片をサイトメガロウイルスの極初期プロモーター下にマルチクローニングサイトを搭載した遺伝子発現用ベクター pBKCMV にクローニングし、pBKCMV-nSM2、pBKCMV-TSAP6、pBKCMV-hnRNP をそれぞれ構築した。クローニングした遺伝子の配列は、ダ

イデオキシ法で配列分析を行い確認した。

(2) リアルタイム PCR による転写量解析

上記「遺伝子クローニング」に記述した方法と同等の方法にて HEK293 細胞などから全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に、発現を解析する遺伝子の配列をもとに Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/webif.php>) にて設計したプライマーを使用して、タカラバイオ社製の SYBR Premix Ex Taq II で反応混合液を調製した。ストラタジーン社製定量リアルタイム PCR システム Mx3000P で 90 10 秒、60 40 秒のシャトル PCR でリアルタイム PCR をおこなった。反応後に SYBR Green の放出による乖離温度の同定で反応がうまくいっていることを確認した。遺伝子発現量は、GA3PDH をリファレンスとして相対的に決定した。

(3) Ex の単離とウエスタンブロッティングによる解析

システムバイオサイエンス社製の Ex を除去した牛胎児血清を 10% 含む RPMI1640 培地を使用して、 2×10^6 個の HEK293 細胞を 100 mm の細胞培養用皿で 3 日間培養した。培養液を 2,000 rpm で 5 分間遠心して上清を集め、解析まで -20 で保存した。冷凍した細胞培養上清は、37 のウォーターバスで素早く融解し、再度 2,000 rpm で 5 分間遠心して上清を集めた。この上清を 5 ml 採取し、システムバイオサイエンス社製の ExoQuick-TC を 1 ml 添加してよく混合、その後 4 で一晩培養した。1,500 x g で 30 分遠心後、沈殿を 100 μ l の 2 x SDS Loading バッファーを加えて 97 で 10 分処理後、15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を集めてウエスタンブロッティング用のサンプルとした。

調製したサンプル 30 μ l を SDS-PAGE に供した。電気泳動後、泳動タンパクをニトロセルロース膜に転写し、目的タンパクに対する抗体を供給会社の勧めに応じて使用し、ペルオキシダーゼを標識した二次抗体を反応させた後、GE ヘルスケア社製の ECL Western Blotting Detection Reagents を使用して富士フィルム社製の LAS-4000 でそれらのデジタルイメージを取得した。得られたイメージのバンド濃度を ImageJ で比較した。

(4) 遺伝子導入細胞の構築

100 mm の細胞培養皿に 2×10^6 個の細胞を蒔く、37 インキュベーターで一晩培養した。培地交換後、pBKCMV-nSM2、pBKCMV-TSAP6 などの発現ベクター 2 μ g をキアゲン社製のエフェクテン遺伝子導入試薬と混合して複合体を形成後、細胞に添加した。そのまま 37 で

4-6 時間培養し、再度培地交換をおこなった。37 で 3 日間培養後、500-750 μ g/ml の G418 を含む培地と交換した。さらに 37 で培養して、3 日おきに 500-750 μ g/ml の G418 を含む培地と交換した。細胞が増殖し始めたら安定遺伝子導入細胞として細胞を回収した。

それぞれの安定遺伝子導入細胞を段階希釈して 100 mm の細胞培養皿に蒔いた。その後 37 インキュベーターで 2 週間程度培養し、コロニーを形成した。コロニーをそれぞれ 10 個ずつ単離し、増殖させたのち、リアルタイム PCR で目的の遺伝子の発現量を定量比較した。この中で最も目的の遺伝子の発現量の多い細胞を HEK293/nSM2 および HEK293/TSAP と命名した。

2 遺伝子を導入するための pBKCMV のカナマイシン耐性遺伝子の代わりにハイグロマイシン耐性遺伝子を発現するベクターを構築したが、目的遺伝子のサブクローニングがうまくいっていない。そこで、2 遺伝子を発現する組み換え細胞は、1 つの遺伝子を安定的に発現する細胞 HEK293/TSAP6 に 2 つ目の遺伝子 pBKCMV-nSM2 を一時的に導入して作成した。

(5) shRNA 発現ベクターの構築とレトロウイルスの作成及びそれを使用した組み換え細胞の構築

UHRF1 遺伝子に対する miRNA 様の shRNA を発現するためのベクターは、pSIREN-RetroQ を使用して構築した。100 μ M の shRNA をコードするお互い相補的な合成 DNA を混合した。これを 95 で 2 分熱したのち序冷してアニールし、pSIREN-RetroQ の EcoRI-BamHI 部位にライゲーションで導入した。

作成した発現ベクターをもとに組み換えレトロウイルスを作成した。まずベクター 1 μ g を 10^6 個の AmphiPack293 パッケージ細胞 (タカラバイオ社製) にエフェクテン遺伝子導入試薬で導入し、48 時間 37 で培養する。この上清を集めて、0.45 μ m フィルターを通したのち、最終濃度が 8 μ g/ml になるようにポリブレン水溶液を添加し、60 mm 細胞培養皿に蒔いた 10^6 個の HEK293 細胞に滴下した。3 日間そのまま培養し、その後、2.0 μ g/ml のピューロマイシンを含む培地で培養し、さらに 3-5 日間 37 で培養した。この処理によって生存した細胞を shRNA を発現する組み換えレトロウイルスに感染した遺伝子導入細胞 (HEK293/KDUHRF1) として取得した。

(6) X 線照射とコロニーアッセイによる感受性の評価

60 mm の細胞培養用皿に培養した 10^6 個の細胞に 5 Gy/min で X 線を照射した (MBR-1520-3:

日立メディカル社製)。その後、細胞をトリブシン処理により回収し、血球計算盤を使用して係数し、100 mm 細胞培養皿一枚あたりの細胞数を 10,000 個から 10 倍段階希釈により、それぞれ 3 枚ずつ撒いた。2-3 週間培養してコロニーを形成した。培養皿中のコロニーをカウントして生存率を計算した。

4. 研究成果

(1) 関連遺伝子のクローニング

Ex の分泌量を多くして shRNA などの核酸分子の送達に利用するために Ex の生合成や分泌に関与するとされる遺伝子発現の増強を試みた。まず、細胞からの nSMase2、TSAP6 遺伝子のクローニングをおこなった。抽出した全 RNA をもとに合成した cDNA を鋳型に PCR によりクローニングを試みた。PCR 後のアガロースゲル電気泳動で、目的遺伝子のサイズに近い DNA 断片を単離してクローニングをおこなったところ、多くの少し異なるサイズの DNA 断片がクローニングされたため、制限酵素による切断パターンをもとに正しいと思われる断片を遺伝子ごとに数クローンずつ選択した。これらについて遺伝子配列分析をおこなったところ、nSMase2 では、6 クローン中 1 クロンですべて正しい配列を保持しているものを見出したが、TSAP6 全てのクローンで同じようなところに欠失が見つかり、この方法によるクローニングを断念した。

また、特定の塩基配列を持つ miRNA の Ex 中への封入促進に関与するとされる遺伝子 hnRNPA2B1 についても過剰発現による目的 RNA 分子の Ex 中への封入を促進するためにクローニングを試みた。この遺伝子も合成した cDNA を鋳型にクローニングを試みたが、上記 2 つの遺伝子よりも欠失が顕著で正常にクローニングができなかった。

これらのタンパクをコードする DNA 断片を取得するために外部の業者に化学合成を依頼した。それぞれ pUC ベクターにクローニングされたものを受け取った。nSMase2 と TSAP6 については、このベクターから pBKCMV ベクターの CMV プロモーター下にクローニングし、pBKCMV-nSM2 および pBKCMV-TSAP6 を構築した。しかしながら、hnRNPA2B1 については、pBKCMV ベクターにクローニングしても予想サイズと異なるバンド（おそらくリアレンジメントした断片）がクローニングされるだけであったため、現在中断しており、再度検討予定である。

(2) nSMase2 および TSAP6 遺伝子を強制発現する細胞による Ex の分泌促進

pBKCMV-nSM2 を導入した細胞は、親株である HEK293 と比較して転写レベルで約 80 倍の nSMase2 遺伝子発現増強が認められた。また

pBKCMV-TSAP6 を導入した細胞では、約 10 倍の TSAP6 遺伝子の発現増強が認められた。HEK293/TSAP6 に pBKCMV-nSM2 を一時的に導入して作成した細胞では、約 40 倍の nSMase2 遺伝子と約 8 倍の TSAP6 遺伝子の発現増強が認められた。ウエスタンブロッティングでタンパク発現を調べてみたところ、nSMase2 の発現は HEK293/nSM2 で約 4.5 倍、両遺伝子を導入した細胞でも約 2.0 倍増強していることを見出した。TSAP6 の発現は HEK293/TSAP6 で約 2.2 倍、両遺伝子を導入した細胞で約 2.1 倍と同様の傾向が示された。

それぞれの細胞が分泌する Ex の検出をおこなった。Ex を除去した培養液で 72 時間培養した培養上清中の Ex の相対量を、CD63 をウエスタンブロットのバンドを比較することにより測定した。その結果 HEK293/nSM2 では親株と比較して約 1.8 倍の CD63 を、HEK293/TSAP6 では約 1.5 倍の CD63 を検出した。両遺伝子を過剰に発現する細胞では親株と比較して約 2.2 倍の CD63 を検出した。これらの結果は、Ex の生合成に関係する遺伝子の発現を増強することにより Ex の分泌量を増強することが可能であることを示唆する。ただ、遺伝子発現の増加量ほど Ex の検出量が増加しておらず、両者が必ずしも一致していないことが示されており、より効率良く増加させるための方策を見いだすことが今後の課題である。両遺伝子の発現割合を調整や Ex の分泌や生合成に関係する他の遺伝子の組み合わせなどについて検討の余地がある。

(3) UHRF1 ノックダウンによる細胞の放射線感受性に及ぼす影響

まず作成した 10^6 個の HEK293/KDUHRF1 細胞の UHRF1 遺伝子の発現についてウエスタンブロットにより解析した。UHRF1 のバンドの濃さをもとに発現量を比較したところ、親株の HEK293 細胞と比較して約 78% 発現が減少していた。この細胞に X 線を照射し、これをトリブシンで回収してカウントし、10 ml の細胞培養液の入った 100 mm 細胞培養皿に 10000 個、1000 個、100 個となるように細胞を蒔いた。2 週間後 (+3-4 日の場合もあり) 培養皿に出現したコロニーの数をカウントしたところ、親株の HEK293 と比較してコロニーの数が約 68% 程度まで減少することが示された。

今回得られた結果は、Ex の生合成や分泌を担う遺伝子発現を増強することで Ex の分泌量の増加が見込めるとした計画段階での仮説を裏付ける結果となった。ただ、目的の RNA 分子の Ex への封入を促すために利用する予定であった hnRNPA2B1 遺伝子のクローニングがうまくいかず、検討は未達となった。我々はすでに放射線感受性を増強する RNA 分子を

2種類確保しており、今後は hnRNPA2B1 遺伝子のクローニングに加えさらに別の方法も検討しながら、これらの分子を効率的に Ex に封入する方法について検討していきたい。

<引用文献>

Kosaka, et al. J Biol Chem (2010) 287: 17442.

Yu, et al. Can Res (2006) 66: 4795.

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4件)

Ogawa, R., G. Kagiya, A. Watanabe, A. Morii, Z. G. Cui, T. Kondo. (2017). A simple method for constructing artificial promoters activated in response to ultrasound stimulation. *Methods Mol Biol.* In press. 査読あり.

Jawaid P., M. U. Rehman, M. A. Hassan, Q. L. Zhao, P. Li, Y. Miyamoto, M. Misawa, R. Ogawa, T. Shimizu, T. Kondo. (2016). Effect of platinum nanoparticles on cell death induced by ultrasound in human lymphoma U937 cells. *Ultrason Sonochem.* 31: 206-215. 査読あり.

DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.12.013

Kagiya, G., R. Ogawa, F. Hyodo, K. Yamashita, M. Nakamura, A. Ishii, Y. Sejimo, S. Tominaga, M. Murata, Y. Tanaka, and M. Hatashita. (2016). Development of a real-time imaging system for hypoxic cell apoptosis. *Mol Ther - Method Clin Dev.* 5: article number 16009. 査読あり.

DOI: 10.1038/mtm.2016.9

Doi, N., R. Ogawa, Z. G. Cui, A. Morii, A. Watanabe, S. Kanayama, Y. Yoneda, T. Kondo. (2015). The acquired radioresistance in HeLa cells under conditions mimicking hypoxia was attenuated by decreased expression of HIF subunit genes induced by RNA interference. *Exp Cell Rec.* 333: 249-260. 査読あり.

DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.03.009

[学会発表](計5件)

鍵谷豪、小川良平、他、低酸素領域におけるアポトーシス細胞可視化システムの構築、第54回日本放射線腫瘍学会生物部会、2016年7月16日、I-site なんば(大阪府大阪市)

小川良平、刺激応答性遺伝子発現制御システムの開発、第18回癌治療増感研究シン

ポジウム、2016年2月6日、奈良県文化会館(奈良県奈良市)

Kagiya G, Ogawa R, Hatashita M, Tanaka Y, Yamashita K, Nakamura M, Ishii A, Sejimo Y. Development of non-invasive real-time imaging system of hypoxic cell apoptosis. The 15th International Congress of Radiation Research. 2015年5月29日、京都国際会議場(京都府京都市)

Yoshimura N, Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Rehman MU, Kondo T. Development of a radiation controlled shRNA expression system. The 15th International Congress of Radiation Research. 2015年5月29日、京都国際会議場(京都府京都市)

Ogawa R, Morii A, Watanabe A, Cui ZG, Kagiya G, Yoshimura N, Kondo T. Development of radiation responsive promoters for radiogenetic therapy. The 15th International Congress of Radiation Research. 2015年5月29日、京都国際会議場(京都府京都市)

[図書](計1件)

Ogawa, R., A. Morii, A. Watanabe, Z. G. Cui and T. Kondo. (2016). Bioeffects and therapeutic applications of ultrasound. pp1049-1074. In. Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry. M. Ashokkumar (Ed.), New York: Springer.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 良平(OGAWA, Ryohei)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号: 60334736

(2)研究分担者

鍵谷 豪(KAGIYA, Go)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号: 30524243

(3)連携研究者

渡部 明彦(WATANABE, Akihiko)

富山大学附属病院・講師

研究者番号: 20377253

森井 章裕(MORII, Akihiro)

黒部市民病院・泌尿器科・部長

研究者番号: 20377279

(4)研究協力者

土肥 伸岳 (DOI, Nobutaka)

ニッポンジーン株式会社・研究員