

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640095

研究課題名(和文) miRNA - エクソソーム輸送複合体の同定とがん病態誘発との関連

研究課題名(英文) Identification of protein factors regulating secretion of specific miRNAs

研究代表者

土屋 直人 (Tsuchiya, Naoto)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30322712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞外へとmiRNAを分泌する複合体様式を解析し、その分泌メカニズムを明らかにすることを目的とした。がん細胞株由来のエクソソーム画分を調製し、密度勾配遠心やゲルろ過を組み合わせて、miRNA分泌複合体の特性を解析した。エクソソームに内包されて分泌されるmiRNAの種類は少なく、タンパク質複合体として分泌されているものが多い事が強く示唆された。その分泌に関連する候補タンパク質を質量分析によって複数同定した。これらのノックダウンにより、細胞外へと分泌されるmiRNAが細胞内に蓄積することも明らかにした。今後は、詳細な分子メカニズムの解析を行う。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA (miRNA), a class of small non-coding RNAs, have been attracting major interest in the field of cancer research to analyze molecular pathways that are deeply involved in cancer progression. In addition to their important cellular functions, secreted miRNAs (extra-cellular miRNA, ex-miRNAs) mediated by exosomes have also been considered to contribute the connection of inter-cellular networks. Although the increasing a body of evidences indicates important biological functions of ex-miRNAs, the mechanism how specific miRNAs transported into exosomes is still unknown. We, here, conducted the detailed analysis of biochemical properties for miRNA complexes, which are detectable in exosome-enriched fraction, and found that considerable number of ex-miRNAs is secreted by unknown protein complex. Furthermore, 14 proteins were identified as candidates of a novel complex, whose knockdown was suggested to regulates secretion of specific miRNAs from cancer cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞外マイクロRNA 分泌複合体

1. 研究開始当初の背景

内在性 small non-coding RNA の一つであるマイクロ RNA は、細胞内で遺伝子発現制御因子として機能し、生命活動の恒常性維持に大きく貢献している。その発現異常は、がんをはじめとしたヒト疾患の病態誘発と深く関連している。ヒトゲノム中には、2000 を超える miRNA 遺伝子がコードされており、その発現は組織特異的である。この組織特異的発現パターンは、組織の発生や細胞分化の制御に必須である。近年、miRNA が細胞外へと分泌され、受け手細胞へと取り込まれることで、細胞間のコミュニケーションツールとして機能していることが報告された。miRNA は複数の分泌経路を経て、細胞外へと到達すると考えられている。中でも、エクソソームと呼ばれる脂質膜小胞に内包されて分泌されることが注目されている。エクソソームは、細胞間の情報伝達を担う重要な細胞外小胞である。がん細胞が分泌するエクソソームは、自身の増殖に有利な微小環境を作り出し、例えば、がん細胞の転移の成立に深く関連することが報告されている。この機能には、エクソソーム膜上に存在するタンパク質に加えて、エクソソームに内包されるタンパク質や核酸、特に mRNA や miRNA の機能が重要であると考えられている。しかしながら、がん細胞内でどのように特定 miRNA がエクソソームへと輸送されるのかその制御機構はわかっていない。

当研究室では、様々ながん細胞及び非がん細胞の細胞内及びエクソソーム画分の miRNA のプロファイリングを行った。興味深いことに、非がん細胞株でも増殖能力を有する細胞の内在性 miRNA 発現プロファイルは、がん細胞株と類似しており、細胞内 miRNA の発現は細胞増殖の制御に極めて重要であることが確認できた。一方で、エクソソーム画分の miRNA プロファイルは、上記非がん細胞株とがん細胞株では著しく異なっており、細胞外への miRNA 分泌ががん細胞の特性の一つ、即ち、がん細胞を規定する機能の一つであると考えられる。エクソソームに内包される miRNA は、がん細胞特異的であると考えられることから、この特性を利用して、がん早期診断マーカーとしての応用も期待されている。事実、大腸がん患者由来血清エクソソーム画分に存在する miRNA を網羅的に解析することで、複数の miRNA が診断バイオマーカーとして有用であることを見出した。しかしながら、これらの miRNA が真にエクソソームを介して分泌されているか、現時点では明らかではなく、がん細胞の特性理解のためには、miRNA の細胞外分泌機構を詳細に検討し、分子メカニズムを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、エクソソームへ特定 miRNA を輸送するメカニズムを明らかにすることを目的とする。そのため、エクソソ-

ム画分で検出される miRNA の特性と生化学的特徴を検討し、細胞内での輸送メカニズムにアプローチする。さらに、細胞内の輸送関連分子を同定し、そのメカニズムを分子レベルで理解することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 細胞外 miRNA 分泌複合体の生化学的性質の検討

培養細胞株の培養上清から、エクソソーム画分を分画し、そこに含まれる miRNA 複合体に関して、1) 熱処理 + RNase 処理、2) タンパク質分解酵素処理 + RNase、3) 界面活性剤処理 + タンパク質分解酵素処理 + RNase の各処理を行い、さら超遠心法によってエクソソーム画分を分画し、そこに含まれる miRNA の解析を行った。

2. miRNA 分泌複合体の単離

上記、1の解析から、少なくとも細胞株レベルで細胞外へと分泌される miRNA の上位 20 種類の中には、エクソソームに内包されて分泌される miRNA は miR-21 のみであり、その他の miRNA に関しては、熱処理で構造維持ができない、おそらくはタンパク質複合体をメインとする分泌機構と、タンパク質分解酵素に高感受性を示す分泌機構が存在することが示唆された。それらを詳細に解析するために、ショ糖密度勾配遠心法によってエクソソームを密度依存的に分離し、エクソソーム miRNA の代表である miR-21 とそれ以外の複合体を介して分泌される miR-1246 を RT-PCR 法で検出し、複合体画分を同定した。

miRNA 複合体の分子サイズを利用し、ゲルろ過クロマトグラフィーによって、複合体を分離し、miR-1246 及び miR-21 の局在を検討した。

3. miRNA 分泌複合体の構成因子の同定

分泌複合体の指標となる miR-1246 の局在をもとにして、密度勾配遠心ならびに、ゲルろ過法で複合体を分離し、当該画分に局在するタンパク質を質量分析によって網羅的に解析した。

4. 候補タンパク質のノックダウンによる効果の検証

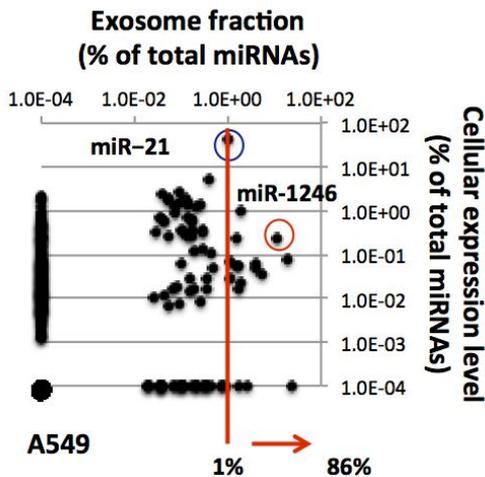
miRNA 分泌に関与すると考えられる候補分子(上記で同定)に関しては、当該分子を siRNA でノックダウンし、細胞外への miRNA 分泌等を検討する。

4. 研究成果

1. miRNA の多くはエクソソームに内包されていない

培養細胞上清からエクソソーム画分を調製し、その画分に存在する miRNA のプロファイルを作成した。内在性の発現プロファイルも同時に取得し、それらの相関を検討した。肺がん細胞株の A549 細胞の miRNA 発現量をプロットすると、細胞内の発現量によらず、細胞外へと分泌される miRNA が多いことがわかった(図)。興味深いことに、細胞外 RNA のトップ 20 で細胞外 miRNA の 86% に及ぶことがわかった。したがって、これら上位の細胞

外 miRNA 分泌様式を検討することで、その詳細なメカニズムが解明できると考えられた。そこで、A549 細胞の細胞上清から、エクソソームを濃縮し、それらを 4 つに分け、それぞれ



れ、1) 未処理、2) 熱処理 + RNase、3) タンパク質分解酵素 + RNase、4) 界面活性剤 + タンパク質分解酵素 + RNase の処理を行い、さらに超遠心によってエクソソーム画分を調製し、そこに存在する miRNA をマイクロアレイで解析した。興味深いことに、細胞外トップ 20 miRNA のうち、脂質膜小胞に内包されている miRNA は、miR-21 と miR-451 のみであり、その他の miRNA は未知の複合体を介している可能性を見出した。そこで、未知の複合体を介して分泌される可能性のある miR-1246 とエクソソーム miRNA である miR-21 を指標として、複合体の分離を試みた。ショ糖密度勾配遠心法によって、超遠心で取得したエクソソーム画分をさらに詳細に分画すると、miR-21 は既知のエクソソームマーカーである CD81 や CD9 のピークと一致して検出された。一方、miR-1246 のピークはエクソソームのピークとは異なることがわかった。miR-1246 のピークは、エクソソーム画分を熱処理と RNase 処理することで、構造体が維持できず、分解されることがわかった(下図)。このことから、miR-1246 の分泌に関連する複合体は、エクソソームと極めて近い分子密度を有していると考えられる。そこで、エクソソーム画分をゲルろ過クロマトグラフィーによって分離すると、エクソソームと

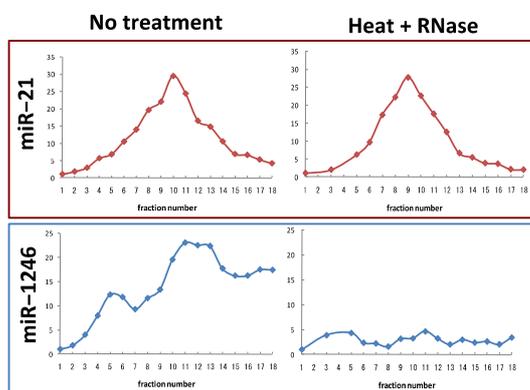


図) 熱処理とRNaseによるmiR-1246の分解

miR-1246 は分離することができた。miR-1246 画分を濃縮し、電気泳動をすると当該画分に特異的なタンパク質が存在している可能性が示唆された。したがって、質量分析によりその画分のペプチド断片を全て解析し、14 種類の分子を複合体構成因子の候補として同定した。

2. 候補因子は miRNA 分泌及びエクソソーム分泌に関連している

上記で同定した因子の中には、ゴルジ体小胞輸送関連因子や、細胞膜タンパク質、GTPase や核酸結合ドメインを有する分子が含まれていた。これら候補に対する siRNA ライブラリーを作成し、当該分子のノックダウンと miRNA 及びエクソソームの分泌の関連を検討した。興味深いことに、ゴルジ体タンパク質 (A とする)、細胞膜タンパク質 (B)、Arf-GAP ファミリータンパク質 (C) の各々のノックダウンによって、細胞外の miR-1246 が減少し、細胞内への当該 miRNA の蓄積が認められた。さらに、細胞外粒子の検出を nanosight で行なったところ、候補分子のノックダウンによって、細胞外エクソソーム様粒子が増えていることがわかった。候補分子の中には、これまでに miRNA の分泌や生合成と関連すると報告されている分子が含まれていないことから、新規の miRNA 分泌複合体である可能性が高いことがわかった。現在、複合体全容を解明すべく、詳細な検討を進めている。

3. 本研究のまとめ

本研究では、miRNA の細胞外分泌に関して、細胞株を用いて検討を行った。驚くべきことに、肺がん細胞株の A549 から分泌されている miRNA のトップ 20 については、エクソソームを介して分泌されると考えられるものは miR-21 のみであると考えられる。その他の miRNA に関しては、未知の複合体・分泌経路を経て細胞外へと到達している可能性を見出した。そのうちのひとつ miR-1246 の細胞外分泌に関連すると考えられるタンパク質 14 種類を分泌複合体候補因子として同定した。これらのいくつかをノックダウンすることで、miR-1246 の細胞外濃度が減少し、細胞内への蓄積が認められた。興味深いことに、ノックダウン細胞ではエクソソーム様の細胞外粒子の増加が認められ、新規 miRNA 分泌複合体とエクソソームを含む細胞外小胞の分泌経路が関連していると考えられた。

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)

1. Robles AI, Kanai Y., Mathé E, Okayama H, Schetter A, Brown D, Petersen D, Bowman ED, Noro R, Welsh J, Edelman D, Stevenson H, Tsuchiya N, Kohno T, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Meltzer

- P, Yokota J and Harris CC* An Integrated Prognostic Classifier for Stage I Lung Adenocarcinoma based on mRNA, microRNA and Methylation Biomarkers. *J. Thoracic Oncol.* 10:1037-1048, 2015
- Amornwichee N, Oike T*, Shibata A, Ogiwara H, Tsuchiya N, Yamauchi M, Saitoh Y, Sekine R, Isono M, Yoshida Y, Ohno T, Kohno T, Nakano T Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe. *PLoS One.* 9(12):e115121. 2014
 - Saito M., Shiraishi K., Matsumoto K., Schetter AJ., Ogata-Kawata H., Tsuchiya N., Kunitoh H., Nokihara H., Watanabe S., Tsuta K., Kumamoto K., Takenoshita S., Yokota J., Harris CC., Kohno T*. A three-microRNA signature predicts responses to platinum-based doublet chemotherapy in patients with lung adenocarcinoma. *Clin. Can. Res.* 20, 4784-4793, 2014
 - Kurioka D., Takeshita F., Tsuta K., Sakamoto H., Watanabe S., Matsumoto K., Watanabe M., Nakagama H., Ochiya T., Yokota J., Kohno T., Tsuchiya N*. NEK9-dependent proliferation of cancer cells lacking functional p53. *Sci Rep.* 4, 6111. 2014
 - Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N*. Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *PLoS ONE* 9: e92921. 2014
 - 土屋直人(2016)マイクロRNAの特性を利用した“がん医療構築戦略” *バイオエクスプレス* p8-13

〔学会発表〕(計14件)

招待講演

- 土屋直人 エクソソームマイクロRNAのがん診断マーカーとしての重要性 第54回日本癌治療学会学術集会 2016年10月20日~22日 横浜
- Naoto Tsuchiya MicroRNAs in colon carcinogenesis ~ basic research to clinical applications ~ 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日~10日 名古屋
- 土屋直人 マイクロRNA ~ 発がん機構の理解と Translational Research ~ 総合研究機構RNA科学総合研究センター公開シンポジウム「RNA科学のこれから その可能性と展望」 2014年12月22日 東京理科大学 東京
- 土屋直人 “大腸がん診断マーカーと

してのエクソソームマイクロRNAの有用性” 第69回大腸肛門病学会学術集会 2014年11月7日~8日 神奈川県横浜市

- Naoto Tsuchiya Extra-cellular microRNAs - Basic research to clinical application - Seminar in Laboratory of Human Carcinogenesis, NCI. NIH Bethesda, MD, USA 24 April, 2015

学会発表(国内)

- Tsuchiya N. Nucleolar stress-specified molecular connection of miR-101 and p53 as a novel circuitry in an intrinsic tumor-suppressor network. (2016) 第76回日本癌学会総会 横浜市
- Fujiwara Y, Kohno T, Tsuchiya N. Fine-tuning of p53-dependent nucleolar stress response by miR-101 (2016) 第39回日本分子生物学会年会 横浜市
- 田辺 芽衣、Weis, Melody、村上 康文、河野 隆志、土屋直人 がん細胞生存関連因子 SND1 複合体の機能解析 (2015) 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 兵庫県神戸市
- 藤原優子、河野隆志、土屋直人 miR-101による p53 依存性核小体ストレス応答反応の制御機構 (2015) 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 兵庫県神戸市
- Yuko Fujiwara, Takashi Kohno and Naoto Tsuchiya Regulation of p53-dependent G2 arrest and apoptosis by miR-101 through the regulation of EG5 - p53 pathway. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日~27日 横浜
- Naoto Tsuchiya NEK9-dependent cell cycle progression of cancer cells inactivated p53. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日~27日 横浜
- Daisuke Kurioka, Masatoshi Watanabe, Takashi Kohno, Naoto Tsuchiya MicroRNA target screen identifies NEK9 as a crucial component of cell cycle network in p53-inactivated cancer cells. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日~27日 横浜
- Naoto Tsuchiya EG5-p53 axis, a novel pathway to control cell cycle and apoptosis, is regulated by miR-101. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日~27日 横浜

学会発表(国外)

- Tsuchiya N. MicroRNA target screen identifies NEK9 pathway as a crucial

component regulating proliferation
of cancer cells lacking functional
p53. AACR Annual Meeting 2015
Philadelphia PA USA 2015. 4.17-4.22

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕

<http://www.nccri.ncc.go.jp/jimu/030/040/20151209115128.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 直人 (TSUCHIYA, Naoto)

国立研究開発法人国立がん研究センター研
究所・ゲノム生物学研究分野・ユニット長

研究者番号：
30322712

(2) 研究分担者

該当なし()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

吉松 有紀 (YOSHIMATSU, Yuki)