

がん特異的 microRNA の細胞外小胞内包メカニズム

愛知県がんセンター研究所

腫瘍制御学分野 リサーチレジデント 董 悦

腫瘍制御学分野 分野長 小根山千歳

1. 研究の背景・目的

細胞外小胞 (Extracellular Vesicles, EVs) は、エクソソームやマイクロベシクルなど、細胞が分泌する多様な脂質膜小胞の総称であり、様々な体液中に広く存在する。EV は細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしており、内包されたタンパク質、RNA (mRNA、microRNA など)、DNA および脂質など多様な生体分子を受容細胞へと送達することで、その機能調節を担う (文献 1)。この特性により、EV は発がん、悪性化、および治療に対する応答において鍵となる役割を果たすと考えられている。

私たちは様々ながん種において活性化している Src とがん進展との関係について多角的に研究してきた。その過程で、Src に依存してがん化した細胞が分泌する EV に含まれる 200 種類以上の microRNA (miRNA) を分析した。その結果、40 種類の miRNA の EV 内包が Src 活性と関連していることがわかった。中でも Src の活性化により EV 中に選択的に内包される miRNA (Src-EVmiR) について、Src 活性に依存する未知の miRNA 積込み機構が存在することが示唆された。その機構を明らかにすべく、これら miRNA に結合する因子をプロテオーム解析により探索し、RNA 結合タンパク質 (RNABP) を同定した。

Src-EVmiR は代表的ながん関連 miRNA (oncomir) であり、様々ながん種での発現増加が報告されている (文献 2-3)。同定した RNABP は、多種多様な組織で発現し、特に脳内でのその機能異常は、がんをはじめ、神経発達障害など多くの疾患状態と関連することが知られている。また、本 RNABP は RNA の安定性と翻訳調節に関与し、細胞増殖、分化、および神経発達などの機能が知られる一方で、EV 形成とその内包 RNA の制御における役割は全く知られていない。

私たちは細胞外小胞 (EV) の生物学的重要性とがんにおけるその役割を探索し、がん治療に新たな視野を開くことを目的としている。上述した私たちの知見は、が

ん進展に重要な微小環境構築において重要な役割を果たしているにも関わらず、その機構に不明な点が多いがん EV 内包 miRNA の制御において、新たな分子機序の発見へと発展する可能性がある。

本研究においては特に、Src-EVmiR と RNABP との相互作用や、Src がんシグナルに依存したその活性制御機構を解析することとした。それらを明らかにすることで、がん特異的な EV 産生やその miRNA 内包に関わる分子機構の本体が解明され、がん微小環境の構築の阻害に向けた新たながん治療標的の同定と新規介入戦略の開発や神経発達障害とがんリスクに関する知見に貢献することが期待される。

2. 研究の対象ならびに方法

本研究では、Src-EVmiR と RNABP の相互作用、がん特異的な EV 産生やその miRNA 内包に関わる分子機構を解析するため、Src 活性の高いがん細胞（膀胱癌細胞株 PANC-1、前立腺癌細胞株 PC3）を用いた。

1) Src-EVmiR と RNABP との相互作用についての検証

ビオチン化 Src-EVmiR を用いたプルダウン実験を実施し、Western blot 解析によりがん細胞の中で RNABP が Src-EVmiR と結合していることを確認し、他の結合候補蛋白質についても解析した。

2) RNABP 依存的な EV における miRNA 内包についての検証

RNABP 遺伝子をノックダウンした細胞系を作製し、これらの細胞から分泌された EV を回収した上で、各種 EV 中の miRNA 構成、特に Src-EVmiR の内包量を qPCR により解析した。

3) EV 受容細胞の形質変化についての検証

a) がん細胞由来 EV が受容細胞の浸潤能に及ぼす影響

RNABP 遺伝子をノックダウンしたがん細胞株を作製し、これらの細胞から分泌された EV を回収した後、受容細胞の培養液に添加して invasion assay を実施し、受容細胞の浸潤能への影響を評価した。

b) Src-EVmiR が浸潤能に及ぼす影響

がん細胞に対して Src-EVmiR の過剰発現および機能的抑制を行い、それぞれの処理後における細胞の浸潤能の変化を検討した。

4) Src-EVmiR による細胞浸潤能への影響に関与する分子メカニズムの解明

Src-EVmiR の予測標的遺伝子の中から、細胞の浸潤能に関連する分子を選定し、PANC-1 および PC3 細胞において miRNA の過剰発現および抑制処理を行ない、qPCR 法により、それら関連分子の発現変化を解析した。

5) Src-EVmiR が細胞形態に与える影響の検討

Src-EVmiR の過剰発現および機能的抑制を行った細胞に対して免疫蛍光染色 (IF) を実施し、Paxillin (細胞接着斑)、Phalloidin (アクチン骨格)、RhoA (形態調節因子) の発現および RNABP 局在変化を解析した。

3. 研究結果

1) Src-EVmiR と RNABP との相互作用についての検証

Western blot 解析により、RNABP のファミリー蛋白質 (RNABP2) が Src-EVmiR とより強く結合することを新たに見出した。

2) RNABP 依存的な EV における miRNA 内包についての検証

qPCR の結果により、RNABP2 をノックダウンした細胞から回収された EV 中の Src-EVmiR 量が有意に減少していることが確認された。

3) EV 受容細胞の形質変化についての検証

a. RNABP2 をノックダウンしたがん細胞から分泌された EV は、対照群に比べて受容細胞の浸潤能を抑制した。

b. Src-EVmiR は受容細胞の浸潤能を促進することが確認された。

4) Src-EVmiR による細胞浸潤能への影響に関与する分子メカニズムの解明

Src-EVmiR の予測標的遺伝子 383 分子の中から、浸潤抑制因子として知られる 9 つの候補分子を選定した。そのうち PDCC4 および TIMP3 の発現量が Src-EVmiR の過剰発現により有意に減少することを確認した。

5) Src-EVmiR が細胞形態に与える影響の検討

Src-EVmiR は細胞接着斑の形成を促進し、RhoA や RNABP2 の細胞内での局在を変化させる作用を持つことが明らかとなった。

4. 考察

本研究により、RNABP2 が Src-EVmiR と結合し、がん細胞由来 EV に内包されて受容細胞に伝達されることで、受容細胞の浸潤能を促進することが示唆された。また、RNABP2 を介した選択的な miRNA の EV 内包や伝達は、がん細胞間の情報伝達に関与し、がん微小環境の構築に寄与することが示唆された。

5.文献

- 1) Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science. 2020;367(6478): eaau6977.
- 2) Diener C, Keller A, Meese E: Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic, Trends Genet., 38(6): 613–626, 2022.
- 3) Ferragut Cardoso AP, Banerjee M, Nail AN, Lykoudi A, States JC: miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability, Semin Cancer Biol., 76: 120–131, 2021.

6. 論文発表

なし