

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

脳転移性エクソソームによる前転移ニッチェの解明

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 落谷 孝広

平成26(2014)年5月

目 次

I. 総括研究報告	
がん幹細胞を標的とした治療開発および研究の総括	3
落谷 孝広	
II. 分担研究報告	
1. 脳転移を規定する non-coding RNA のエピゲノムファイリング	6
畑田 出穂	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	8
. 研究成果の刊行物・別刷	10

脳転移性エクソソームによる前転移ニッシェの解明および研究の総括
研究代表者 落谷孝広 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

研究要旨

本研究の目的は、乳がん細胞の血液脳関門(BBB)通過の分子メカニズムや、その前転移ニッシェの分子機構の解明、脳転移機構におけるトロピズムを乳がん細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームを中心に明らかにすることで、癌の脳転移を予防する新しい方策を開発することである。平成25年度は、初年度に引き続き、脳転移における癌細胞がBBBを通過する仕組みを、細胞間の新たなコミュニケーションツールであるエクソソーム中のmicroRNA解明を中心に解析することで、この乳がん細胞株が分泌するエクソソームがBBB破綻を誘導するメカニズムを解析した。その結果、脳に高転移する乳がん細胞から分泌されたエクソソームのBBB破壊は、エクソソームにパッケージされた特定のmicroRNA(miR-18X)が脳血管内皮細胞のタイトジャンクションを司る分子を制御する事で、タイトジャンクション、あるいは接着ジャンクションの破綻を誘導する結果を得た。さらにこのBBB破綻のmiR-18Xは、実際の脳転移を有する患者血清中に高い値を示す事も明らかとなり、臨床での実証研究も基礎研究データを支持するものであった。

A. 研究背景、目的 (背景)

癌の脳転移は近年増加傾向にある。とりわけ、乳がんでは、ある特定のサブタイプに脳転移を多く認め、その生物学的特性と転移臓器におけるトロピズムの存在が示唆される。近年の分子標的治療薬の進歩により生存期間が延長した癌患者に脳転移は今後頻発すると予測され、我が国において脳転移の治療と管理法の開発は緊急かつ重要な課題である。癌転移のメカニズムには、癌細胞が脳血管関門(BBB)を通過し、脳内で腫瘍を形成できるよう、あらかじめ血管内皮細胞や間質成分などがニッシェ(前転移ニッシェ)を形成することが癌細胞の定着や増殖の最初のプロセスに重要である。本研究の目的は、BBB通過の分子メカニズムや、その前転移ニッシェの分子機構の解明、脳転移機構におけるトロピズムを乳がん細胞の分泌する小胞顆粒であるエクソソームを中心に明らかにすることで、癌の脳転移を予防する新しい方策を開発することである。

B. 研究方法

2年次となる平成25年度は、おもに脳転移における癌細胞がBBBを通過する仕組みを、細胞間の新たなコミュニケーションツールであるエクソソーム中のmicroRNAを中心に解析する目的で、初年度に樹立した脳に高転移性を示すヒト乳がん細胞株(落谷、小野)の分泌するエクソソームからRNAを抽出し、そのmicroRNAの網羅的発現解析を実施、そのデータを解析することで、BBB破綻を誘導するmicroRNAを同定し、その分子メカニズムを解明す

る。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律(「バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づくカルタヘナ法)の定める細則と、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則、ならびに施設内の組み換えDNA実験指針の基準に従って、定められた基準に適合することを確認し、指針に従ってDNA組み換え実験委員会等の倫理審査委員会の審査を経る手続きを適切に行う。動物実験は、国立がん研究センターの定める動物実験指針に従うとともに、動物倫理委員会の承認を得たうえで、動物の苦痛の低減に務め、動物愛護の精神に基づく実験を行う。ヒトの臨床サンプル解析に関しては、センターの倫理審査委員会の承認を得て実施する。ヒト臨床検体の使用は、所内の倫理委員会に計画書を提出し、審査を受けて承認が得られている。

C. 研究結果

エクソソームのmicroRNA網羅的発現解析の結果、脳に高転移する乳がん細胞から分泌されたエクソソームのBBB破壊は、エクソソームにパッケージされた特定のmicroRNA(miR-18X)が脳血管内皮細胞のタイトジャンクションを司る分子を制御する事で、タイトジャンクション、あるいは接着ジャンクションの破綻を誘導する結果を得た。さらにこのBBB破綻のmiR-18Xは、実際の脳転移を有する患者血清中に高い値を示す事も明らかとなり、臨床での実証研究も基礎研究データを支持するものであった。

以上の成果は、高転移の細胞由来のエクソソームにはBBBを破綻させる能力が有る事が示唆された。

さらに、血管内皮細胞のタイトジャンクションを形成する occludin, claudin 等, あるいは接着ジャンクションを形成する N-cadherin 等の分子の免疫染色を実施した結果, 高転移の細胞由来のエクソソーム処理によって, これらの分子の細胞表面の局在が失われることが判明した。従ってエクソソームに由来する miR-18X の標的分子群が, これらのジャンクションを制御する分子あるいは関連制御分子である可能性が浮上した。また、国立がん研究センター中央病院の乳腺腫瘍科のコホート研究の一部の血清を用いて, ステージ 3 / 4 の転移患者の miR-18X の量を解析した結果、脳転移を有する患者群で、血清中の miR-18X の量が有意に高い事も判明した。

D. 考察

エクソソームによって引き起こされる BBB 破壊のメカニズムを明らかにするに至るとともに, BBB を破壊する microRNA の臨床的意義にまで研究を発展する事が出来た事は特筆に値する研究成果である。

E. 結論

転移性乳癌細胞の分泌するエクソソームには、血液脳関門を破壊し、乳がん細胞を脳に転移する機構が存在する事が示唆された。さらに、こうした現象の原因となりうるエクソソーム中のマイクロ RNA の存在も、臨床検体の解析から示唆された事は意義の有る研究成果であり、今後診断、治療に向けた発展が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ono M, Takeshita F, Tominaga N, Takahashi RU, Kosaka N, Tsuda H, Tamura K, and Ochiya T. Exosomes secreted by bone marrow-derived mesenchymal stem cells regulate cancer stem cell dormancy. *Science Signaling*, in press
2. Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugisaki H, Higashimoto H, Kato T, Takeshita F, Ochiya T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nature Communications*. 5:3591, 2014
3. Fujita Y, Takeshita F, Mizutani T, Ohgi T, Kuwano K, Ochiya T. A novel platform to enable inhaled naked RNAi medicine for lung cancer. *Sci Rep*, 3:3325, 2013
4. Fujiwara T, Kawai A, Yoshida A, Ozaki T, Ochiya T. Cancer stem cells of sarcoma. In: *Role of cancer stem cells in cancer biology and therapy*. USA, CRC Press, pp 23-78, 2013
5. Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering *ASXL1* mutations. *J Clin Invest*, 123:4627-4640, 2013
6. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem*, 288:10849-10859, 2013
7. Kosaka N, Takeshita F, Yoshioka Y, Hagiwara K, Katsuda T, Ono M, Ochiya T. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 65:376-382, 2013
8. Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, Ochiya T. Trash or treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Front Genet*, 4:173, 2013
9. Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Ochiya T. Functional analysis of exosomal microRNA in cell-cell communication research. *Methods Mol Biol*, 1024:1-10, 2013
10. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther*, 21:185-191, 2013
11. Suetsugu A, Honma K, Saji S, Moriwaki H, Ochiya T, Hoffman RM. Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models. *Adv Drug Deliv Rev*, 65:383-390, 2013
12. Takahashi RU, Takeshita F, Honma K, Ono M, Kato K, Ochiya T. Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3 β . *Sci Rep*, 3:2474, 2013
13. Thirion M, Ochiya T. Extracellular microRNAs as potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In: *López-Camarillo C, Marchat LA (eds)*,

MicroRNAs in Cancer. USA, CRC Press, pp 308-332, 2013

14. Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. Jpn J Clin Oncol, 43:596-607, 2013
15. Uchino K, Takeshita F, Takahashi RU, Kosaka N, Fujiwara K, Naruoka H, Sonoke S, Yano J, Sasaki H, Nozawa S, Yoshiike M, Kitajima K, Chikaraishi T, Ochiya T. Therapeutic Effects of MicroRNA-582-5p and -3p on the Inhibition of Bladder Cancer Progression. Mol Ther, 21:610-619, 2013

2. 学会発表

国内

1. 分子がん転移研究の新たな潮流：エクソソームによる前転移ニッシュの実態解明」、落谷孝広、22th 日本がん転移学会学術集会・総会（2013.7.10-12 長野）
2. 「細胞外分泌顆粒によるがん転移メカニズムの解明（代：小坂展慶）」、落谷孝広、14th ホルモンと癌研究会（2013.7.13 東京）
3. 「Exosome による遺伝情報の水平伝達の発見をもたらすインパクト」、落谷孝広、第5回 ライフサイエンスセミナー（2013.7.17 東京）
4. 「細胞外分泌顆粒：エクソソームによる細胞間情報伝達の意義と診断・治療への応用」、落谷孝広、阿蘇シンポジウム、（2013.8.2 熊本）
5. 「エクソソームによるがんの浸潤転移の解明と Liquid Biopsy への応用」、落谷孝広、第10回 日本病理学会カンファレンス 2013 六甲山、（2013.8.2 神戸）
6. 「細胞間コミュニケーションの新たな担い手「エクソソーム」の正体と診断治療への応用」、落谷孝広、34th 日本炎症・再生医学会、（2013.7.2 京都）
7. 「Exosome による遺伝情報の水平伝達と疾病診断治療への応用」、落谷孝広、29th 日本 DDS 学会、（2013.7.4 京都）
8. 「エクソソームの基礎と最新の話題」、落谷孝広、京都大学再生医科学研究所・講演（2013.8.8-9 京都）

海外

1. Ochiya T. 「Direct Detection Of Extracellular Vesicles In Human Serum By ExoScreen System」. Expectations of the first meeting of International Society for Extracellular Vesicles, ISEV 2013, Boston, USA. April 15-21
2. Ochiya T. 「Exosomes as a Novel Diagnostic and Therapeutic Tool for Cancer」. 2013 World CTC, Berlin, Deutschland. April 23-27
3. Ochiya T. 「Hepatocyte from other sources of stem cell」. APASL Liver Week 2013, Suntec, Singapore. June 6-10
4. Ochiya T. Exoscreen provides a new diagnostic tool for circulating exosomes, ISEV Workshop 2014 on EV Proteomics and Lipidomics, Melbourne, Australia, Feb 3-4

G. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

研究要旨

転移能、薬剤耐性を獲得した癌細胞でのエピゲノムの変化、特に DNA のメチル化の変化は癌細胞の性質を決定づける重要な因子である。脳転移の関連した miRNA の転写調節領域での DNA のメチル化の変化はエクソソーム内での miRNA の量的変化への関連が予想される。本研究では昨年、miRNA の転写調節領域での DNA のメチル化を次世代シーケンサーを用いて調べた。miRNA の転写調節領域の DNA のメチル化が癌における miRNA の転写制御に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。今年度はこのメチル化を制御する因子として miR-29 ファミリーをみいだした。miR-29 はメチル化酵素と脱メチル化酵素の両者を抑制することにより、メチルの変化を抑えエピジェネティック状態を維持して癌化を防いでいることがわかった。

A. 研究背景、目的 (背景)

癌細胞におけるエピゲノムの変化、特に DNA メチル化の変化は癌化、癌の転移能、薬剤耐性など悪性化に関連した様々な性質において重要な働きをしていることが知られている。小分子 RNA のひとつである miRNA の発現変化は癌化やその悪性化において重要な働きをしていることがわかってきている。これら miRNA をコードする遺伝子においても DNA のメチル化の変化は通常の遺伝子と同様、癌細胞で変化が見られる。

一方、細胞が分泌するエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソームの中に、miRNA が安定して存在することが発見され、細胞間のメッセンジャーとして機能することが示唆されている。特にがん患者の血清中のエクソソームには健康人と異なる種類と量の miRNA が含まれていることが報告されており、バイオマーカーとしても注目されている。このような変化は癌細胞中における miRNA の発現量の変化とも関係しており、癌細胞におけるエピゲノムの研究が重要であることがわかる。

さて、どのようにしてメチル化は制御されているのだろうか？今回我々は miR-29 がその役割をなしていることを示唆する証拠をえたので報告する。

B. 研究方法

miR-29 は miR-29a、miR-29b、miR-29c、のファミリーからなるが、癌抑制遺伝子として知られている。すなわちその発現と予後との関係が報告されていたり、癌細胞で強発現をすることで腫瘍形成が抑えられることが報告されているからである。従来 miR-29 は DNA メチル化酵素の DNMT3A、DNMT3B を抑制することでがん抑制遺伝子のメチル化を防ぐ働きがあるといわれているが、本当にそれだけかを検証するためにターゲット抑制ソフトの miRanda などを用いて miR-29 のターゲットの検索

をおこなった。そして候補の遺伝子をレポーター実験などで検証した。

(倫理面への配慮)

今回の解析では該当しない。

C. 研究結果

miR-29 のターゲットとして miRanda の候補で多くの候補が上がってきた。その中でヒトでもマウスでも保存されているものを上げると興味深いことに脱メチル化に関与する TET1 と TDG があった。そこでこれらの遺伝子のターゲットを含む配列を用いてレポーター実験をおこなったところ、いずれの遺伝子も miR-29 によって発現が抑制されることがわかった。さらに miR-29 が内在性の TET1 と TDG を抑制できるかを Realtime-PCR やウエスタンブロットで確認することができた。

D. 考察

miR-29 はがん抑制遺伝子であるが、今回 DNA 脱メチル化に関与する TET1 と TDG を抑制することがわかった。従来 miR-29 はメチル化の酵素 DNMT3A と DNMT3B を抑制することが知られていた。そとことからがん抑制遺伝子のメチル化を防ぐことが miR-29 の働きと考えられていたが、今回脱メチル化も抑制していることがわかり、むしろ miR-29 はメチルの変化を抑えエピジェネティック状態を維持して癌化を防いでいると考えられる。

E. 結論

miR-29 はメチル化酵素と脱メチル化酵素の両者を抑制することにより、メチルの変化を抑えエピジェネティック状態を維持して癌化を防いでいる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Morita S, Horii T, Kimura M, Ochiya T, Tajima S, Hatada I. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. *Int J Mol Sci*. 14: 14647-14658, 2013

2 . 学会発表

1. 森田純代、堀居拓郎、木村美香、落谷孝広、田嶋正二、畑田出穂 miR-29 は DNA メチル化酵素と DNA 脱メチル化酵素を制御する。第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日, 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1.特許取得
特になし。
- 2.実用新案登録
特になし。
- 3.その他
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugi saki H, Higashimoto H, Kato T, <u>Ochiya T.</u>	ExoScreen as a novel ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles.	Nat Commun			in press
Fujita Y, Takeshita F, Kuwano K, <u>Ochiya T.</u>	RNAi therapeutic platforms for lung diseases.	Pharmaceuticals	6	223-250	2013
Fujita Y, Takeshita F, Mizutani T, Ochiya T, Kuwano K, <u>Ochiya T.</u>	A novel platform to enable inhaled naked RNAi medicine for lung cancer.	Sci Rep	3	3325	2013
Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiyama Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Okita M, Maehara A, Isono M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, <u>Ochiya T.</u> Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T.	Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations.	J Clin Invest	123	4627-4640	2013

Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, <u>Ochiya T.</u>	Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis.	J Biol Chem	288	10849-10859	2013
Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Tominaga N, Katsuda T, <u>Ochiya T.</u>	Trash or treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication.	Front Genet	4	173	2013
Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, <u>Ochiya T.</u> , Gotoh N, Kuroda M.	Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells.	Mol Ther	21	185-191	2013
Takahashi RU, Takeshita F, Honma K, Ono M, Kato K, <u>Ochiya T.</u>	Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3 β .	Sci Rep	3	2474	2013
Uchino K, <u>Ochiya T.</u> , Takeshita F.	RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment.	Jpn J Clin Oncol	43	596-607	2013
Uchino K, Takeshita F, Takahashi R, U, Kosaka N, Fujiwara K, Naruoka H, Sonoke S, Yanagino J, Sasaki H, Nozawa S, Yoshiike M, Kitajima K, Chikaraishi T, <u>Ochiya T.</u>	Therapeutic Effects of MicroRNA-582-5p and -3p on the Inhibition of Bladder Cancer Progression.	Mol Ther	21	610-619	2013
Morita S, Horii T, Kimura M, Ochiya T, Tajima S, <u>Hattada I</u>	miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases.	Int J Mol Sci	14	14647-14658	2013