

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

微小環境ストレスに応答する  
細胞代謝制御に関する研究

Studies on the cellular metabolism  
controlled by microenvironmental stress

申請者

吉岡	祐亮
Yusuke	Yoshioka

生命理工学専攻 分子生理学研究

2012年12月

2003年にヒトゲノム解読が宣言され、現在ではヒトの蛋白質をコードする遺伝子数はおよそ2万2千個であると考えられている。この数は予想されていた遺伝子数よりも少ない。しかしヒトを構成する細胞の数は約60兆個であるのに対し、一個体が約千個の細胞から成る線虫の遺伝子数はおよそ1万9千個とされ、ヒトと線虫とでは遺伝子数に大差がない。したがって多種多様な細胞から構成される生物の仕組みの複雑さは、遺伝子数ではなく、遺伝子発現ネットワークによる制御であると考えられるようになった。ゲノムに配列情報がありながら、蛋白質に翻訳されない非翻訳RNA(non-coding RNA)の数は、生物の複雑さと相関する。複雑な遺伝子発現のネットワークの中で、非翻訳RNAの一つであるマイクロRNA(miRNA)は、新たなクラスの生体調節分子であり、各種恒常性の維持に機能する。一つのmiRNAは数百種類もの遺伝子発現を微調整しうるため、miRNAの発現異常は多くの遺伝子の発現に影響を与える。したがってmiRNAの研究は、生物における様々な生体調節系の恒常性の維持や異常、あるいはがんを含む多くの疾患の発症や病態の理解に繋がる。本研究はmiRNAによる生体機能調節について着目した。そして腫瘍細胞を解析対象モデルにして、miRNAによる低酸素環境と鉄代謝に関与する未知の発現制御機構と機能を解析した。さらに、miRNAの細胞間移動を担う細胞外小胞エクソソーム(exosome)の特性をも明らかにした。

第1章では、miRNAに関する歴史、その発現制御、機能について概説している。miRNAは1993年に線虫で発見されて以来、ウイルス、植物、動物でも存在が確認された。miRNAの約22塩基からなる塩基配列は種間を越えて良く保存されている。miRNAは標的遺伝子のmRNAの3'非翻訳領域(3' UTR)または翻訳領域に配列相補的に結合して、標的遺伝子の翻訳を抑制する。また、細胞における鉄代謝や低酸素環境への応答に関する科学的知見をまとめ、がん細胞と正常細胞とで比較する意義について述べている。がん細胞の代謝制御は、正常細胞とは異なる部分が多い。その一つが低酸素環境下における物質代謝である。一般に、がん細胞は低酸素環境にあるとされ、このことはがんの悪性化にも関連する。また細胞の増殖に鉄は必須であり、増殖の速いがん細胞は、鉄要求性が高い。これらの知見を踏まえて、miRNA、低酸素環境、鉄代謝のそれぞれの要素の連鎖を論じ、本研究の意義を位置づけている。

第2章では、本研究の研究対象としているmiR-210について概説している。miR-210は、血球系譜特異的に発現するmiRNA、そして、マウスの赤血球造血過程において発現が上昇するmiRNAとして報告された(小坂ら, 2008)。赤血球は、鉄を含むヘモグロビンに酸素を結合し、各組織へ酸素を供給する。赤血球造血では多くの鉄が赤血球前駆細胞内に取り込まれ、寿命の尽きた赤血球の貪食破壊後は、鉄が再び回収される。このように赤血球の産生と破壊では、様々なレベルで厳密な鉄代謝制御が連動する。miR-210は、赤血球造血で発現が上昇するた

め、鉄代謝に関与する可能性が考えられた。また、miR-210は低酸素環境下の細胞で発現が誘導されることや、乳がんや膵臓がんなどの固形腫瘍においてmiR-210の発現上昇が予後不良と相関することも報告された。したがって、がん細胞におけるmiR-210の機能を調べることによって、がん細胞の悪性化機序の解明に役立つことが期待された。

第3章では、本研究で見出されたmiR-210の発現制御機構について述べている。miR-210の発現制御機構は不明であった。そのため、まず低酸素環境下および鉄欠乏時のmiR-210の発現を各種のがん細胞で調べた。細胞内の鉄が不足すると低酸素環境下で重要な働きをする転写因子である低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor 1 alpha: HIF-1 $\alpha$ )の蛋白質安定性が増す。その結果、細胞の鉄欠乏状態は擬似的な低酸素環境を作り出すことが知られている。そこで、乳がん細胞株、前立腺がん細胞株を酸素濃度1%の低酸素環境下で48時間培養し、あるいは鉄キレート剤であるデスフェロキサミン(Desferrioxamine: DFO)を添加して鉄欠乏状態にして48時間培養後、各々の培養細胞に発現したmiR-210を定量した。その結果、通常酸素濃度20%の培養と比較して、低酸素環境下あるいは鉄欠乏時において、miR-210の発現が亢進することが判明した。さらに、ゲノムから転写される一次転写産物 primary microRNA-210の発現も上昇していた。このことは転写段階での発現制御の可能性を示した。一方、siRNAによってHIF-1 $\alpha$ の発現を抑制するとmiR-210の発現減少が認められた。したがって低酸素環境下および鉄欠乏時においては、miR-210の発現を誘導する転写因子の候補としてHIF-1 $\alpha$ が浮上した。そこで、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子にして、miR-210の発現プロモーター領域を同定した。その結果、転写開始地点上流882bp以内に3カ所存在するHIF-1 $\alpha$ 結合コンセンサス配列がmiR-210の転写に重要であることが分かった。そこでそれぞれのHIF-1 $\alpha$ 結合コンセンサス配列を欠失させた変異体で解析を行った。その結果より、低酸素環境下および鉄欠乏時には、HIF-1 $\alpha$ が転写開始地点から一番近傍に存在するHIF-1 $\alpha$ 結合コンセンサス配列に結合することでmiR-210の転写を制御している、と結論した。

第4章では、miR-210による鉄代謝制御の解析結果を述べている。miR-210の機能解析を行うため、データベースを用いて標的遺伝子の*in silico*同定を実施した。その結果、複数の標的遺伝子候補の中より、鉄代謝に関わる鉄-硫黄クラスター形成足場蛋白質(iron-sulfur cluster scaffold protein; ISCU)の遺伝子に着目した。ISCUは鉄-硫黄クラスターの生合成に関与する遺伝子で、ISCUの発現抑制は鉄-硫黄クラスターの産生を低下させる。miR-210を強発現させるとISCUの発現は低下し、発現抑制を行うとISCUの発現は増加した。さらにmiR-210がISCUのmRNAに直接結合することを証明し、ISCUはmiR-210の標的遺伝子の一つであることを明らかにした。鉄-硫黄クラスターは鉄制御蛋白質1(iron regulatory protein 1; IRP1)と結合することで細胞質アコニターゼとし

て機能するが、鉄-硫黄クラスターの減少による未結合状態では鉄代謝調節因子として機能する。そのため、ISCU は間接的に鉄代謝遺伝子の発現制御に関与しており、ISCU の発現抑制は細胞内への鉄取り込みを担うトランスフェリンレセプター1 (TfR1) の発現上昇を引き起こすことが知られている。そこで、miR-210 による鉄代謝制御を明らかにするため、miR-210 の強発現によって ISCU の発現を低下させて、IRP1 の活性化を誘導し、TfR1 の発現を調べた。当初、IRP1 が活性化するため、TfR1 の発現は上昇すると考えたが、予想に反して TfR1 の発現は減少した。この結果を受けて、miR-210 は ISCU のみならず TfR1 も標的遺伝子としていることが予想されたため、TfR1 が miR-210 の標的遺伝子であるか上記方法で評価し、標的遺伝子であることを明らかにした。実際に miR-210 の過剰発現によって、鉄輸送蛋白質トランスフェリンの細胞内への取り込みは阻害され、がん細胞の増殖を抑制された。以上の結果より miR-210 は鉄欠乏時や低酸素環境下において、TfR1 の発現を微調節すると結論し、miRNA による新たな鉄代謝制御機構の存在を明らかにした。

第5章では、細胞外小胞であるエクソソームについて概説している。エクソソームの発見は1980年代初期であるが、2007年にエクソソームはmiRNAを内包することが報告された。これを契機にエクソソーム研究が盛んに行われ始めたが、未だ不明瞭な点も多い。

第6章では、エクソソームに含まれる蛋白質について記載している。エクソソームにはmiRNAのみならず、多くの蛋白質も含まれている。由来する細胞によってその構成は異なることが知られているが、エクソソームマーカーといわれる全てのエクソソームに含まれる蛋白質の存在も示唆されている。これらエクソソームマーカーを指標としてエクソソームの存在を示している報告は多数あるが、報告によって用いられているマーカーが異なる。そこで、異なる乳がん細胞株4種類、乳腺上皮細胞株1種類、前立腺がん細胞株3種類、前立腺上皮細胞株1種類の培養上清から超遠心法により各種エクソソームを回収し、10種類ほどのマーカーの発現をウェスタンブロッティング法で比較した。その結果、CD9とCD81は全細胞株由来のエクソソームに多量に含まれていることが明らかとなり、CD9とCD81をエクソソームのマーカーとして用いることが有用であると結論した。

最終章では、本研究の総括と今後の展望を示している。本研究は、細胞周囲の環境変化がもたらす恒常性の変化をmiRNAが微調整することで維持する事例を示した。代謝制御は厳密かつ緻密な制御を必要とするため、生物が1つの因子で複数の遺伝子の発現を制御するmiRNAを利用することは理にかなっていると言える。また、エクソソームに含まれるmiRNAが細胞間を移動して、受容側の細胞内で機能し、疾患を含む様々な生理現象に関与している可能性が示唆され始めた。そのため、本研究で示されたmiRNAとエクソソームとに関する知見は広く基礎生物学に貢献する。

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 吉岡 祐亮 印

(2013年7月現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Micromanaging iron homeostasis: HYPOXIA-INDUCIBLE MICRO-RNA-210 SUPPRESSES IRON HOMEOSTASIS-RELATED PROTEINS. J.Biol. Chem. 2012, 287(41):34110-9. <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya, and Takashi Kato.</li> <li>○ 2. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. Journal of Extracellular Vesicles. 2013, 2:20424. <u>Yusuke Yoshioka</u>, Yuki Konishi, Nobuyoshi Kosaka, Takashi Kato, and Takahiro Ochiya.</li> <li>3. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. Br. J. Haematol. 2008, 142(2):293-300. Nobuyoshi Kosaka, Keiichi Sugiura, Yusuke Yamamoto, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Hiroshi Miyazaki, Norio Komatsu, Takahiro Ochiya, and Takashi Kato.</li> <li>4. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. J.Biol. Chem. 2010, 285(23):17442-52. Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Fumitaka Takeshita, Yasushi Matsuki, and Takahiro Ochiya.</li> <li>5. MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression. Mol Ther. 2011, 19(6):1123-30. Mitsuhiko Osaki, Fumitaka Takeshita, Yui Sugimoto, Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yamamoto, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Eisuke Kobayashi, Tesshi Yamada, Akira Kawai, Toshiaki Inoue, Hisao Ito, Mitsuo Oshimura, and Takahiro, Ochiya.</li> <li>6. An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells. Mol Cancer. 2011 10: 135. Yusuke Yamamoto, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Kaho Minoura, Ryou-u Takahashi, Fumitaka, Takeshita, Toshiki Taya, Reiko Horii, Yayoi Fukuoka, Takashi Kato, Nobuyoshi Kosaka, and Takahiro Ochiya.</li> <li>7. Competitive Interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. J Biol Chem. 2012, 287(2):1397-405. Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.</li> <li>8. Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumor-suppressive microRNA activity. Sci Rep. 2012, 2: 314. Keitaro Hagiwara, Nobuyoshi Kosaka, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.</li> </ol>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 （口演発表）	<p>9. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "Exocure" is another choice for cancer treatment. Adv Drug Deliv Rev. 2012. Nobuyoshi Kosaka, Fumitaka Takeshita, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Keitaro Hagiwara, Takeshi Katsuda, Makiko Ono, and Takahiro Ochiya.</p> <p>10. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. PLoS ONE 2012, 7(10): e48366. Yoshiki Murakami, Hidenori Toyoda, Toshihito Tanahashi, Junko Tanaka, Takashi Kumada, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiy, Y-h Taguchi.</p> <p>他 共著発表 2 件</p> <p>1. The activation mechanism of miR-210 under hypoxic stress in cancer cells. 第 68 回 日本癌学会学術総会 横浜, 2009 年 10 月, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, and Takahiro Ochiya.</p> <p>2. 鉄代謝の fine-tuner としての miR-210 の意義. 第 2 回 日本 RNAi 研究会 広島, 2010 年 8 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広.</p> <p>3. Erythropoietin-Induced Expression of miR-188 and miR-362 in Primary Murine Erythrocytes. 第 72 回 日本血液学会 横浜, 2010 年 9 月, <u>吉岡祐亮</u>, 杉浦圭一, 山本雄介, 小坂展慶, 宮崎洋, 小松則夫, 落谷孝広, 加藤尚志.</p> <p>4. microRNA-210 による鉄代謝制御と腫瘍内における役割. 第 3 回 日本 RNAi 研究会 広島, 2011 年 8 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広.</p> <p>5. miR-210 is an iron sensor and contributes to maintenance of iron homeostasis in breast cancer cells. 第 70 回 日本癌学会学術総会 名古屋, 2011 年 10 月, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, Takashi Kato and Takahiro Ochiya.</p> <p>6. エクソソーム診断へ向けた新規エクソソーム検出系 ExoScreen の開発 第 4 回 日本 RNAi 研究会 広島, 2012 年 8 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 太田英樹, 岡本博之, 園田光, 佐々木秀郎, 力石辰也, 落谷孝広.</p> <p>7. ExoScreen as a novel ultra-sensitive detection technology of serum exosomes. 第 71 回 日本癌学会学術総会 札幌, 2012 年 9 月, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, Hideki Ohta, Hikaru Sonoda, Hideo Sasaki, and Takahiro Ochiya.</p>
講演 （ポスター発表）	<p>他 共著発表 12 件</p> <p>8. ヒト巨核芽球性白血病細胞株 UT-7 における非翻訳 RNA の一種 miR-210 の発現制御. 第 70 回 日本血液学会 京都 2008 年 10 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 山本雄介, 杉浦圭一, 落谷孝広, 小松則夫, 宮崎洋, 加藤尚志.</p> <p>9. Hypoxia-inducible miR-210 regulates iron metabolism via ISCU suppression. 第 7 回 がんとハイポキシア研究会 京都, 2009 年 12 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広.</p> <p>10. Iron deficiency-inducible miR-210 suppress iron homeostasis related proteins. 第 69 回 日本癌学会学術総会 大阪, 2010 年 9 月, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, Takashi Kato, and Takahiro Ochiya.</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 (続き)	<p>11. Erythropoietin-Inducible MicroRNA-362 Contributes to Erythropoiesis Via the Suppression of Histone Deacetylase 3. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orland, America December 2010, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Keiichi Sugiura, Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yamamoto, Hiroshi Miyazaki, Norio Komatsu, Takahiro Ochiya, and Takashi Kato.</p> <p>12. microRNA-210 による新たな鉄代謝制御機構. 第 84 回 日本生化学会 京都, 2011 年 9 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広.</p> <p>13. miR-210 Maintains Iron Homeostasis in Cancer Cells by Down-Regulating ISCU and TfR. RNAi &amp; miRNA Europe 2011 Munich, Germany, September 2011, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, Takashi Kato, and Takahiro Ochiya. (<i>Poster Award Winner</i>)</p> <p>14. ExoScreen as a novel ultra-sensitive detection technology of serum exosomes. International Society for Extracellular Vesicles, Gothenburg, Sweden, April 2012, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, and Takahiro Ochiya.</p> <p>他 共著発表 8 件</p>
講演 (招聘) (その他)	<p>5 件</p> <p>1 件</p>
学術雑誌 等又は商 業誌にお ける解説、 総説	<p>1. がん微小環境にかかわる miRNA の意義. 分子細胞治療(Cellular Molecular Medicine), Vol.8 No.5 21(343)-27(349), 2009 年 10 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広.</p> <p>2. MicroRNA の発現解析から見えてきた新たな診断マーカー. 血液内科 (HEMATOLOGY), Vol.62 No.5 622-628, 2011 年 5 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広.</p> <p>3. エクソソームを用いた新規核酸デリバリーシステム. ファインケミカルシリーズ ドラッグデリバリーシステムの新展開 II -核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術- P32-38, シーエムシー出版社, 2012 年 3 月, <u>吉岡祐亮</u>, 竹下文隆, 小坂展慶, 落谷孝広.</p> <p>4. がん細胞の代謝異常と microRNA 制御. 実験医学増刊号 Vol.30-No.15 P121(2455)-127(2461) 2012, 2012 年 9 月, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広.</p> <p>5. 新たなバイオマーカーとしてのエクソソームと診断技術:エクソソームはバイオマーカーの宝箱? Exosomes as a Novel Biomarker and Their Application to Diagnostic Technology: Exosomes as Treasure Chest of Biomarker? 細胞工学 2013 年 1 月号, P66-70, <u>吉岡祐亮</u>, 小坂展慶, 加藤尚志.</p> <p>他 2 件</p>