

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

2013 年 7 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命理工学専攻 分子生理学研究

吉岡祐亮

Yusuke Yoshioka

目次

【略語一覧】・・・4

【図表一覧】・・・6

[第1章] 緒言・・・9

1-1. miRNA の生体内における役割とその意義

1-2. miRNA の発現制御機構

1-3. miRNA の標的 mRNA の抑制機構

1-4. miRNA の発現異常とがん

1-5. がんと微小環境

1-6. 生体と鉄

[第2章] miR-210 を研究対象とした経緯と本研究の目的・・・24

2-1. miR-210 と赤血球造血

2-2. miR-210 とがん

2-3. 本研究の狙い

[第3章] miR-210 の発現制御機構の解明・・・29

3-1. 序論

3-2. 材料および実験方法

3-2-1. 細胞培養

3-2-2. 低酸素環境下における細胞培養

3-2-3. 鉄欠乏状態における培養

3-2-4. qRT-PCR 法による miR-210 と pri-miR-210 の発現解析

3-2-5. ウェスタンブロット法による HIF-1 α の発現解析

3-2-6. siRNA による遺伝子の発現抑制

3-2-7. miR-210 のプロモーターアッセイ

3-2-8. *In vivo* における miR-210 発現細胞の解析

3-3. 結果

3-3-1. 低酸素環境かおよび鉄欠乏状態における miR-210 の発現解析

3-3-2. 低酸素環境かおよび鉄欠乏状態における pri-miR-210 の発現解析

3-3-3. miR-210 のプロモーター領域の同定および転写因子の同定

3-3-4. 腫瘍内環境における miR-210 発現細胞の局在解析

3-4. 考察

[第4章] miR-210 の標的遺伝子の探索と機能解析・・・53

4-1. 序論

4-2. 材料および実験方法

4-2-1. データベースによる候補標的遺伝子の探索

4-2-2. qRT-PCR 法による標的遺伝子の発現解析

4-2-3. 3'UTR アッセイ法による標的遺伝子の発現抑制の評価

4-2-4. Pre-miR-210、Anti-miR-210 による標的遺伝子の抑制効果検証

4-2-5. ウェスタンブロット法による遺伝子の蛋白質発現解析

4-2-6. トランスフェリンの取り込み評価方法

4-3. 結果

4-3-1. *in silico* 解析による miR-210 の標的遺伝子の候補探索

4-3-2. 標的遺伝子 3'UTR に対する miR-210 の結合能評価

4-3-3. miR-210 の発現変化に伴う ISCU の発現変化

4-3-4. ISCU の発現抑制を介した miR-210 による細胞内鉄代謝制御

4-3-5. miR-210 の過剰発現による細胞内鉄代謝制御

4-3-6. miR-210 の発現変動による IRP1 の活性変化

4-3-7. miR-210 の発現抑制における鉄代謝制御

4-4. 考察

[第5章] 細胞が分泌する小胞・・・80

5-1. 序論

5-2. 細胞外小胞の歴史と呼び名

5-3. EVs の分泌機構

5-4. EVs と miRNA

5-5. EV マーカー蛋白質

[第6章] Extracellular vesicles に含まれる蛋白質のマーカー探索・・・87

6-1. 序論

6-2. 材料および実験方法

6-2-1. 使用した細胞株と培養方法

6-2-2. EVs の回収方法

6-2-3. 抗体

6-2-4. Nano particle tracking analysis (NTA) を用いた粒子径の測定

6-3. 結果

6-3-1. 回収した EVs の位相差電子顕微鏡による形態観察

6-3-2. 低温曝露後の造血巣中の赤芽球系細胞の分布

6-3-2. Nano particle tracking analysis (NTA) を用いた粒子径の測定

6-3-3. 銀染色による EVs に含まれる蛋白質の特徴付け

6-3-4. ウェスタンブロット法による EV マーカーの比較

6-4. 考察

[第7章] 統括と展望・・・103

[謝辞]・・・108

[引用・参考文献]・・・110

【研究業績】・・・126

【略語一覧】

3'UTR	3' untranslated region (3'非翻訳領域)
AGO	Argonaute
CLL	chronic lymphocytic leukemia (慢性リンパ性白血病)
CMV	cytomegalovirus
DFO	Desferrioxamine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (ダルベッコ改変イーグル培地)
EBV	Epstein-Barr Virus
EPO	Erythropoietin (エリスロポエチン)
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
EVs	Extracellular vesicles
FBS	Fetal Bovine Serum (ウシ胎児血清)
FITC	fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)
GLUT1	glucose transporter 1
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)
hEGF	Human Epidermal Growth Factor (ヒト上皮成長因子)
HIF	Hypoxia-inducible factor (低酸素誘導因子)
HRE	Hypoxia response element (低酸素応答領域)
HSP70	Heat Shock Protein 70
ILV	intraluminal membrane vesicle
IRE	iron responsive element (鉄応答因子)
IRP	iron regulatory protein (鉄制御蛋白質)
ISCU	iron-sulfur cluster scaffold homolog
MEBM	Mammary Epithelial Basal Medium (乳腺上皮細胞用基礎培地)
MEP 細胞	megakaryocyte/erythroid progenitor cell

miRNA	microRNA (マイクロ RNA)
MVB	multivesicular body
NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa
NTA	Nano particle tracking analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline (リン酸緩衝液)
PHD	proly hydroxylase domain (プロリン水酸化酵素)
PHZ	Phenylhydrazine (フェニルヒドラジン)
Pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA
qRT-PCR	Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
RFP	red fluorescent protein
RISC	RNA-induced silencing complex
rRNA	ribosomal RNA (リボソーム RNA)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interference RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nuclear RNA
TCA	tricarboxylic acid
TfR1	transferrin receptor 1 (トランスフェリンレセプター1)
TPO	Thrombopoetin (トロンボポエチン)
tRNA	transfer RNA (転移 RNA)
TSG101	Tumor susceptibility gene 101
U6	U6 small nuclear RNA
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von-Hippel Lindau

種々の RNA は適切な和訳表現が存在しない場合が多いため、英語表記で統一する。

【図表一覧】

第1章

- 表 1-1 各生物種のゲノムサイズと遺伝子数
- 表 1-2 多種にわたる non-coding RNA の概要
- 表 1-3 2008年と2012年までに発見されている miRNA 数の比較
- 図 1-1 miRNA の発現制御と標的遺伝子の翻訳抑制
- 図 1-2 HIF-1 α 蛋白質の安定化と役割
- 図 1-3 生体内の鉄代謝と鉄の分布

第2章

- 図 2-1 UT-7 細胞株とその亜株に発現する miRNA

第3章

- 表 3-1 プロモーター領域クローニングに用いたプライマー一覧
- 表 3-2 予想転写因子の結合部位欠失に用いたプライマー一覧
- 図 3-1 鉄欠乏状態、低酸素環境下における miR-210 の発現解析
- 図 3-2 鉄欠乏状態による HIF-1 α の安定化
- 図 3-3 miR-210 のゲノム情報
- 図 3-4 Pri-miR-210 の発現解析
- 図 3-5 HIF-1 α の発現抑制による miR-210 の発現減少
- 図 3-6 miR-210 のプロモーター解析
- 図 3-7 miR-210 のプロモーター領域に存在する HIF-1 α 結合部位の同定
- 図 3-8 非がん細胞株 HEK293 における通常酸素下のプロモーター解析
- 図 3-9 miR-210 の転写因子予測
- 図 3-10 通常酸素下における miR-210 の転写因子の同定
- 図 3-11 E2F ファミリー遺伝子の抑制による miR-210 の発現変化
- 図 3-12 Sensor-210 ベクターによる miR-210 発現細胞可視化
- 図 3-13 Promoter-210 による miR-210 発現細胞可視化
- 図 3-14 Sensor-210 ベクターによる miR-210 の発現確認

図 3-15 腫瘍内における miR-210 の発現解析

図 3-16 miR-210 の発現調節機構

第 4 章

図 4-1 miR-210 の標的遺伝子の候補

図 4-2 標的遺伝子と miR-210 の結合配列

図 4-3 miR-210 の標的遺伝子への結合能評価

図 4-4 miR-210 過剰発現による NDUFA4 の発現変化

図 4-5 低酸素下と鉄欠乏状態における ISCU の発現

図 4-6 Pre-miR-210 と anti-miR-210 導入による標的遺伝子 ISCU の発現変化

図 4-7 Pre-miR-210 と Anti-miR-210 の導入による miR-210 の発現変化

図 4-8 ISCU 発現抑制株における TfR1 の発現解析

図 4-9 Pre-miR-210 導入細胞における TfR1 の発現解析

図 4-10 TfR1 と miR-210 の結合配列

図 4-11 miR-210 と TfR1 の結合能評価

図 4-12 顕微鏡観察によるトランスフェリンの取り込み評価

図 4-13 フローサイトメーターによるトランスフェリンの取り込み評価

図 4-14 フェリチンの発現解析による IRP1 の活性評価

図 4-15 miR-210 の発現抑制による TfR1 の発現変化

図 4-16 ISCU もしくは IRP1 の発現抑制かつ miR-210 の発現抑制に伴う TfR1 の発現変化

図 4-17 miR-210 による鉄代謝調節機構

図 4-18 種間における TfR1 と miR-210 の予測結合部位

図 4-19 マウス乳がん細胞株 4T1 細胞を用いた miR-210 の標的遺伝子の発現解析

第 5 章

図 5-1 EVs に含まれる蛋白質

第6章

- 表 6-1 ウェスタンブロット法に用いた EV マーカーに対する抗体一覧
- 図 6-1 位相差電子顕微鏡による EVs の形態観察
- 図 6-2 NTA による各 EVs の粒度分布解析
- 図 6-3 銀染色法による細胞抽出物と EVs に含まれる蛋白質の解析
- 図 6-4 回収した EVs の品質評価
- 図 6-5 EVs マーカーの存在量の解析 (1)
- 図 6-6 EVs マーカーの存在量の解析 (2)
- 図 6-7 EVs マーカーの存在量の解析 (3)
- 図 6-8 EVs マーカーの存在量の解析 (4)
- 表 6-2 各マーカーにおける細胞内発現量と EVs における存在量の比較
- 表 6-3 ウェスタンブロット法による各マーカーの存在量の比較

第7章

- 図 7-1 TfR1 の発現抑制による細胞増殖能への影響
- 図 7-2 がん細胞と正常細胞における TfR1 の発現解析

[第 1 章] 緒言

1-1. miRNA の生体内における役割とその意義

生物の遺伝情報を担う物質としてデオキシリボ核酸 (DNA) が知られており、それら DNA の配列情報から伝令 RNA (mRNA) が産生され、mRNA が蛋白質に翻訳されることで様々な生命現象に関与する。しかし、様々な生物種の全ゲノム解析が行われた結果、最終産物である蛋白質の推定数とゲノムサイズは比例せず、1 個体を形成する細胞数、細胞の種類が大きく異なる場合でも遺伝子数に大きな差がないことが明らかとなった (表 1-1)。例えば、1 個体が千細胞から成る線虫の遺伝子数はおよそ 1 万 9 千であるのに対して、60 兆個の細胞から成るヒトの遺伝子数は大規模 cDNA 解析の結果からおよそ 2 万 2 千であると予想されている (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004)。生物の複雑さを形成する要因と考えられていた蛋白質に翻訳される遺伝子数のみでは、生物の複雑さを説明することが困難である。しかし、遺伝子数のみならず、蛋白質に翻訳されない非翻訳 RNA (non-coding RNA) による遺伝子発現制御が生物の複雑さを形成するのに重要であると考えられている (Szymański and Barciszewski, 2002)。全ゲノム領域に対する蛋白質情報をコードす

表1-1 各生物種のゲノムサイズと遺伝子数

生物種	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Takifugu niphobles</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>
	大腸菌	酵母	ショウジョウバエ	線虫	クサフグ	マウス	ヒト
ゲノムサイズ (mega base)	4.64	15	170	100	400	2500	3000
遺伝子数	4000	6000	13000	19000	21000	22000	22000

る領域の割合は線虫ではおよそ 30%であるが、ヒトではわずか 2%のみである (Szymański and Barciszewski, 2002)。しかし、Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 法を用いた解析によるとゲノム領域のおよそ 70%以上が RNA に転写され (The FANTOM Consortium, 2005, Djebali *et al*, 2012)、ゲノム領域の 80%は生物的機能を持つ領域であるとされており (The ENCODE Project Consortium, 2012)、non-coding RNA が様々な生命現象に関与することが示唆された。

Non-coding RNA は様々な種類が存在し、古くから機能性 non-coding RNA として蛋白質合成に関わる ribosomal RNA (rRNA) や transfer RNA (tRNA)、RNA スプライシングに関与する small nuclear RNA (snRNA)、RNA 修飾に関与する small nucleolar RNA (snoRNA) などが知られており、現在までに多くの機能性 non-coding RNA が発見されている (表 1-2)。その中でも、microRNA (miRNA) は約 22 塩基の小分子 RNA であり、複雑な遺伝子発現制御ネットワークの中で新たなクラス

表1-2 多種にわたるnon-coding RNAの概要

種類	転写	長さ	特徴・機能
5.8S, 18S, 28S rRNA	Pol I	約160b, 1.9kb, 4.7kb	タンパク質翻訳
mRNA-like noncoding RNA	Pol II	約100~1kb	さまざまな機能
snoRNA	Pol II	約60~150b	RNAの切断、修飾など
U1, U2, U4, U5 snRNA	Pol II	約100~200b	スプライシング
U7 snRNA	Pol II	約60b	ヒストンmRNA3'端プロセッシング
microRNA	Pol II, Pol III	約22b	翻訳抑制
piwi-interacting RNA	Pol II, Pol III	約28b	レトロトランスポソンの発現抑制
5S rRNA	Pol III	約400b	タンパク質翻訳
7SK RNA	Pol III	約300b	転写因子の活性制御
7SL RNA	Pol III	約300b	シグナル識別粒子の構成成分
Rnase MRP RNA	Pol III	約300b	rRNAプロセッシング、mtDNA複製
Rnase P RNA	Pol III	約300b	tRNA 5'末端プロセッシング
tRNA	Pol III	約70~90b	タンパク質翻訳
U6 snRNA	Pol III	約100b	スプライシング

の生体調節因子として各種恒常性の維持に機能する (Filipowicz *et al.*, 2008, Sayed and Abdellatif, 2011)。miRNA は 1993 年、Ambros と Ruvkun の 2 つのグループにより線虫で発見された lin-4 が最初の報告である (Lee *et al.*, 1993)。この lin-4 は lin-14 遺伝子と lin-28 遺伝子の相補的配列を有しており、幼生期に lin-14 と lin-28 の翻訳を抑制することで発生を制御する。その後、2001 年には乳類細胞でも存在が報告され (Lagos-Quintana *et al.*, 2001)、microRNA と名付けられ、様々な生物種で存在が確認されている。2013 年までにヒトでは 2042 種類、マウスで 1281 種類での報告がある (<http://www.mirbase.org>; Release 19: August 2012)。近年の次世代シーケンサーなどの技術開発により、2008 年に比べて、わずか 5 年足らずでその数はヒトでおよそ 3 倍に、マウスではおよそ 2.5 倍に増加している (表 1-3)。miRNA は標的遺伝子の mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) ないし、翻訳領域に配列相補的に結合し、蛋白質への翻訳を阻害し、遺伝子発現を調節する (Filipowicz *et al.*, 2008, Sayed and Abdellatif, 2011)。さらに 1 種類の miRNA で 100 種類以上の遺伝子の発現制御を担うと予想されており、miRNA の発現異常は、多くの遺伝子発現に影響を与える。従って、miRNA の発現異常により多くの遺伝子発現が変化することから、個体の発生や細胞の分化、増殖などの様々な生命現象に関与する。さらに、細胞における様々な恒常性の破綻を引き起こし、がんを含む多くの疾患に繋がることが多く報告されている (Croce CM. 2009)。例えば、miRNA の成熟化に必須な RNase である Dicer をノックアウトしたマウス ES 細胞では miRNA の成熟化が正常に

表1-3 2008年と2012年までに発見されているmiRNA数の比較

生物種	発見されているmiRNAの数	
	2008年9月	2012年8月
ヒト	695	2042
マウス	488	1281
ラット	286	723
線虫	154	368
シロイヌナズナ	187	338

<http://www.mirbase.org/>

行われず、胎生致死になることや、個体発生の異常が報告されている (Harfe *et al.*, 2005)。さらに 2007 年に初めて miRNA のノックアウトマウスが作成され、解析の結果、miR-1 が心臓発生に必須であることが証明された。単一の miRNA のみで個体発生に異常が認められたことで miRNA の重要性をさらに位置づけた (Zhao *et al.*, 2007)。

1-2. miRNA の発現制御機構

miRNA はゲノムから RNA ポリメラーゼによって数百から数千塩基程度の一次転写産物 primary miRNA (pri-miRNA) として転写された後に、核内で RNA 切断酵素 Drosha と RNA 結合蛋白質 DGCR8 を含む複合体によってヘアピン構造を有する約 70 塩基の precursor miRNA (pre-miRNA) と切断される (図 1-1)。pre-miR は RanGTP 依存的輸送蛋白質 Exportin-5 により核外へ輸送され、Dicer という RNaseIII による二度の切断を受けて成熟した約 21 塩基の miRNA となる。成熟した miRNA は Argonaute (AGO) 蛋白質ファミリーを中心とする RNA-蛋白

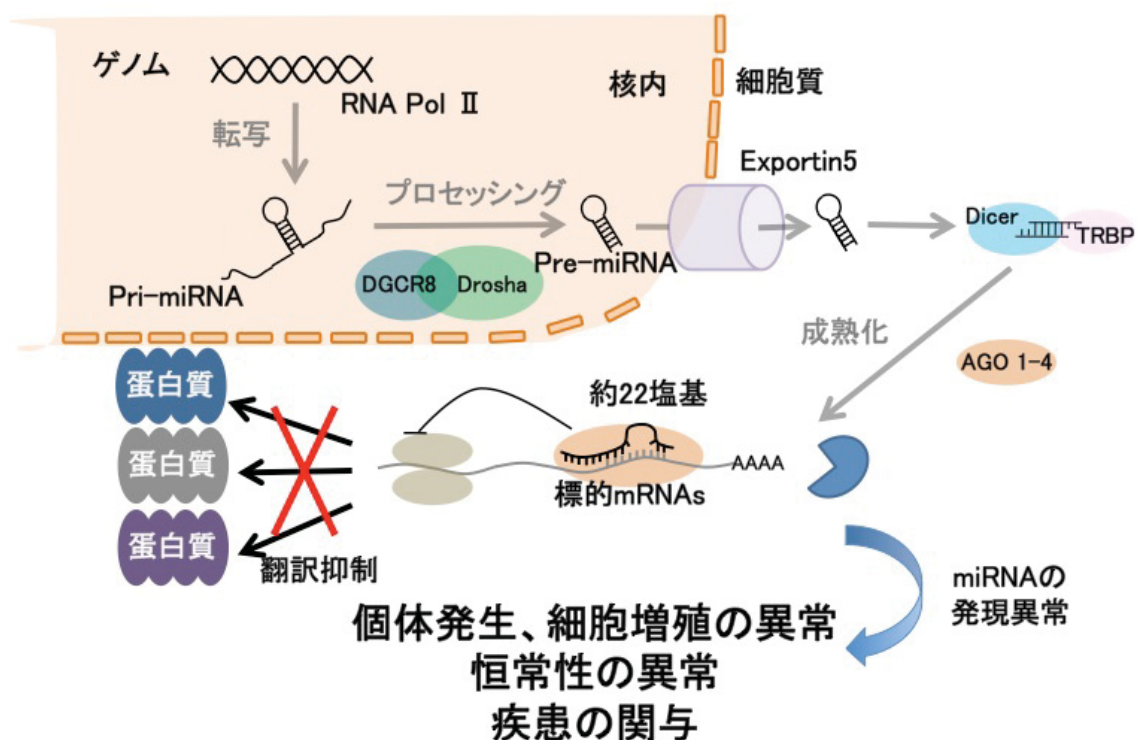


図 1-1 miRNA の発現制御と標的遺伝子の翻訳抑制

miRNA はゲノムにコードされており、RNA Pol II によって転写された一次転写産物 Pri-miRNA が Drosha/DGCR8 複合体による切断を受けて Pre-miRNA となる。

質複合体 (RNA-induced silencing complex; RISC) に取り込まれ、標的 mRNA の翻訳領域に結合する例も報告されているが (Rigoutsos I, 2009)、基本的には 3' 非翻訳領域に配列相補的に結合し、翻訳を抑制して遺伝子の発現を調整する (図 1-1)。このように miRNA は様々な因子によって発現が制御されている。miRNA の発現制御機構に関する転写とプロセッシングが明らかにされつつある。転写制御とは、転写因子によって一次転写産物の量が増減し成熟 miRNA の生成量が変化することである。また、プロモーター領域のメチル化による転写制御も報告されている。プロセッシング制御とは、例えば一次転写産物 pri-miRNA における一塩基多型が引

き起こす二次構造の変化や、Drosha による pri-miRNA の切断に関わる認識部位が変化することによって切断効率の低下が起こり miRNA の成熟化を阻害することである。さらに RNA 結合蛋白質 Lin-28 や p53、Smad などの転写因子が特定の miRNA 前駆体のプロセッシングを制御することで成熟する miRNA の発現量を変化させる (Rybak *et al.*, 2008, Suzuki *et al.*, 2009, Davis *et al.*, 2008)。このように遺伝子発現の調節因子である miRNA 自身の発現も様々な要因で制御され、遺伝子発現ネットワークはより複雑なものになっている。

1-3. miRNA の標的 mRNA の抑制機構

前項までに述べたように 1 種類の miRNA が数百種類もの mRNA の 3'UTR ないし翻訳領域に配列相補的に結合して、それらの翻訳を抑制する。しかし、miRNA の発現抑制メカニズムは全て解明されているわけではなく、解明されている部分だけでも相当複雑である。まず、Dicer によって切断後、約 21 塩基の 2 本鎖 miRNA として成熟するが、この 2 本鎖のうち、より不安定な 5'末端を持つ miRNA 鎖のみが最終的に RISC へ取り込まれ、片側の鎖は分解される。miRNA はヒトでは、4 つの AGO 蛋白質ファミリー、Ago1~4 に miRNA は取り込まれ、配列相補的に標的 mRNA 結合する。この際、標的 mRNA の認識には miRNA の 5'末端の 2~8 塩基目の seed 配列と呼ばれる配列が重要である (Pasquinelli, 2012, Czech and Hannon, 2011)。miRNA による mRNA の発現抑制には主に 2 つの作用があると言われており、一つは翻訳開始の阻害、もう一つが、ポ

リ A 鎖の短縮による mRNA の分解促進である。翻訳開始阻害については、真核生物の mRNA の 5'末端に存在する 7-メチルグアノシンのキャップ構造に依存する翻訳を阻害することが報告されている (Thermann and Hentze, 2007, Mathonnet *et al.*, 2007)。さらに、mRNA 上のリボソーム結合状態を解析した結果から、miRNA の標的となっている mRNA は 80S リボソームの結合量が減少しており (Bazzini *et al.*, 2012)、miRNA が翻訳開始を阻害していることが支持されている。

1-4. miRNA の発現異常とがん

miRNA は多くの疾患に関与するが、特にがんに関する報告が多数なされている。miRNA の発現異常は細胞における様々なホメオスタシスの破綻を意味し、多くの疾患でその異常が観察される。特に「正常細胞」とか異なり、種々の機構が破綻した「がん細胞」における miRNA の発現異常に関する報告は多数ある。これらの報告では miRNA の発現解析手法として、主に定量的解析ではノーザンブロット法や qRT-PCR 法が主流であり、網羅的解析では一般的にマイクロアレイが用いられる。2004 年に初めて miRNA のマイクロアレイを用いた網羅的発現解析が Calin らのグループによって報告された。ヒト成人由来の正常各組織と胎児肝臓、脳における 161 種類の miRNA の発現比較では、各組織の miRNA の発現は異なるパターンを示し、同組織でも成人と胎児では発現パターンが異なるということが分かった (Liu *et al.*, 2004)。さらに彼らはマイクロアレイを利用し、B 細胞慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia; CLL) 患者由

来の B 細胞と健常人の扁桃腺由来の CD5 陽性 B 細胞、または末梢血由来の単球における miRNA の発現を比較した。その結果、患者由来の B 細胞では健常人の B 細胞および単球とはそれぞれ 55 種類、29 種類の miRNA 発現量に有意な差があることが分かった。また、CLL サンプル間でも miRNA の発現は二つのクラスターに分けられた。CLL の予後因子とされているチロシンキナーゼ ZAP-70 の発現を両クラスター間で解析したところ、66% の患者で ZAP-70 陽性を示したのに対してもう片方のクラスターでは 25% の患者のみが陽性を示した (Calin *et al.*, 2004)。Calin らはさらに多くの検体を用いた解析が必要であると述べているが、本論文は、マイクロアレイによる発現プロファイルによって正常細胞とがん細胞を区別でき、さらに予後との相関が示唆され、診断マーカーへの応用が示された最初の論文である。2005 年にはビーズを利用したフローサイトメーターでの miRNA の発現解析手法により、様々ながん組織と正常組織における 217 種類の miRNA の網羅的発現解析がなされた。その結果、miRNA の発現プロファイルは「がん」と「正常」組織の間で大きく異なることが示された (Lu *et al.*, 2005)。2006 年には再び Calin らによって肺がん、乳がん、胃がん、前立腺がん、大腸がんと膵臓がんの計 6 種類の固形がんにおいて miRNA のマイクロアレイによる網羅的発現解析が行われた (Volinia *et al.*, 2006)。その結果は 6 種類それぞれのがん種によって miRNA の発現パターンが異なること、つまり発現パターンによってがん種を特定できることを示した。また、がん組織と同様の正常組織において発現を比較すると、がん組織で過剰発現している miRNA や発現が減少し

ている miRNA がそれぞれ組織によって異なっていた。上述した Lu らの報告と異なる点はそれぞれのがん種毎に比較解析を行ったことで、がん種によって発現が変動する miRNA を網羅的に捉えたことである。さらに現在ではがん遺伝子 oncomiR として多数報告がある miR-21 が 6 種類すべての固形がんで過剰発現していることを明らかにした。しかし、当時はがん細胞における miR-21 の機能解析の報告は一報のみであったが (Chan *et al.*, 2005)、このマイクロアレイ解析により miR-21 が oncomiR として働きうることが示唆された。

このように miRNA の発現プロファイルによってがん種を特定できることが示されてから、転移したがんの原発巣の同定に応用できる期待が生まれた。原発不明がんは日本人成人では全悪性固形腫瘍患者の 3~5%ほどであり、予後が悪いとされている。それは原発巣が不明であるがゆえに適切な化学療法が行えないことなどに起因する。免疫染色、特定の腫瘍マーカーや遺伝子解析による分類で原発巣の特定を行っているが、近年はさらに分類精度を向上させる手段として遺伝子発現プロファイルによる分類も用いられるようになってきた。このような背景から Rosenfeld らは原発巣の特定に 600 種類以上の miRNA の発現プロファイルを用いた (Rosenfeld *et al.*, 2008)。彼らは新鮮凍結、ホルマリン固定、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded:FFPE) の各手法で保存された試料から RNA を抽出し、抽出された RNA の量と質は保存方法による差がないことを確認した上で、11 年間も保存された FFPE 試料でも miRNA の発現プロファイルを安定に取得できると報告し

ている。さらに彼らは22種類の腫瘍組織と転移巣から得たFFPEと新鮮凍結試料、253検体におけるマイクロアレイを用いたmiRNAの網羅的発現解析から、48種類のmiRNAによる分類アルゴリズムを構築した。この分類アルゴリズムによって、22種類のうち16種類の転移巣検体では100%の分類精度であることが示された。合計131検体の転移巣での結果も同様に100%近く分類できた。この結果は原発不明がんの原発巣特定に有用であることを示しており、適切な治療を行い予後改善に役立つ一つの手段になり得る。現在、このようなmiRNAの網羅的発現解析が多くなされており、がんを始めとする多くの疾患でmiRNAの発現異常が明らかとなっている。

1-5. がんと微小環境

がん細胞の代謝制御は正常細胞とは異なることが古くから知られている。それはがん細胞の存在する環境が、正常細胞と異なる点も影響しており、その一つが低酸素環境である。低酸素環境に存在するがん細胞は抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示し、がん治療の妨げになることが大きな問題となっている。このような環境では異常な細胞増殖により正常な血管新生が行われず、生命維持に必須な酸素や栄養素が不足し、細胞の生存には不利な環境であると考えられている。しかし、がん細胞は酸素や栄養素が不足している環境でも生存している。このような環境でがん細胞が生存可能な理由として、解糖系亢進によるエネルギー代謝や、グルタミン分解によるエネルギー獲得、また細胞の増殖に必須な微量元素の恒常性の変化など、

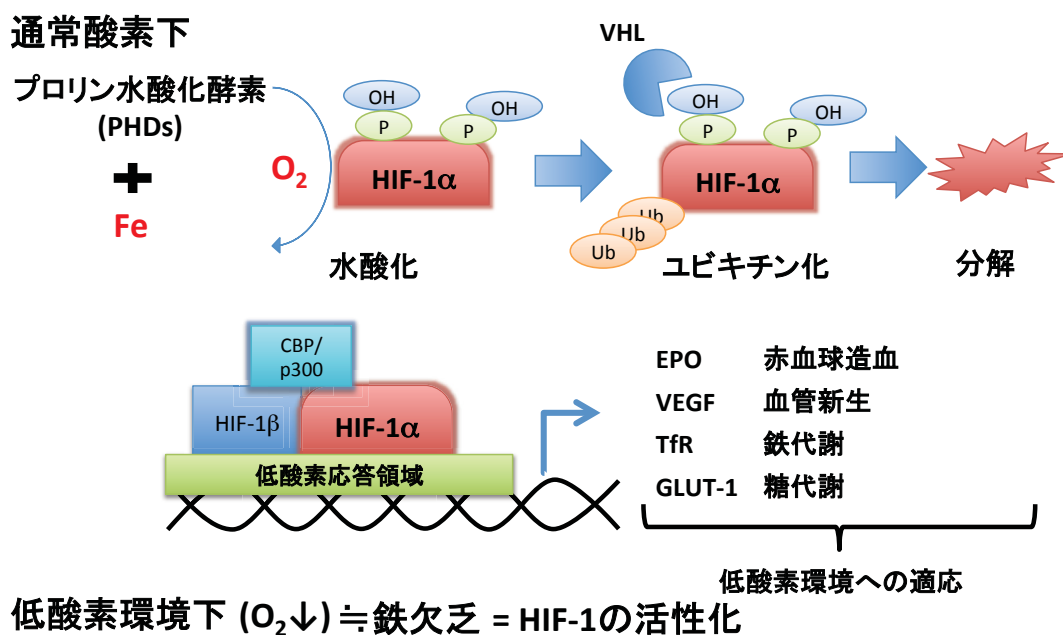


図 1-2 HIF-1 α 蛋白質の安定化と役割

プロリン水酸化酵素 (PHDs) は鉄を補因子にし、酸素を基質として HIF-1 α のプロリン基を水酸化する。水酸化されたプロリン基はポリユビキチン化酵素 VHL の指標となり、ユビキチン化され、HIF-1 α はプロテアソーム系で分解される。しかし、PHD の補因子である鉄や基質の酸素が不足すると、プロリン残基の水酸化を免れて、HIF-1 α は転写因子として働く。その結果、細胞内では低酸素環境への適応に必要な遺伝子が転写され、低酸素環境での生存が可能となる。

がん細胞の特徴的な代謝による低酸素適応が挙げられる。これら代謝や恒常性の維持には多くの遺伝子が関与し、それぞれの遺伝子発現は正常細胞とは大きく異なる。その中心的役割を担う転写因子が 1995 年に Semenza らにより発見された低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor: HIF) である (Wang and Semenza, 1995, Wang *et al.*, 1995)。HIF は α サブユニットと β サブユニットから構成されるヘテロ二量体であり、3種類の α サブユニットと1種類の β サブユニットが存在する。構成する α サブユニットの違いから HIF1、HIF2、HIF3 として機能するが、特に HIF1 は Semenza らが貧血時に赤血球造血因子エリスロポエチン

(Erythropoietin: EPO) の発現を誘導する因子としてクローニングしてから、低酸素環境下におけるキーファクターとして多くの研究が成されてきた。HIF1 の特徴の一つは翻訳後修飾である。HIF-1 α 蛋白質は十分な酸素存在下では、プロリン水酸化酵素 PHD (proly hydroxylase domain 1~3) によってプロリン残基が水酸化され、これを指標にポリユビキチン化酵素 VHL (von-Hippel Lindau) 複合体によりユビキチン化され、プロテアソームで分解される。しかし、PHD は酸素と α ケトグルタル酸を基質とし、共役因子として二価鉄とアスコルビン酸を要求し、プロリン残基またはアスパラギン残基の水酸化を行うため、上記物質が不足すると、蛋白質が蓄積し、転写因子として働く。安定化した HIF1 は細胞核内に移動し、標的遺伝子の低酸素応答領域 (Hypoxia response element: HRE) 5'-RCGTG-3' (R は A もしくは G) に結合し、発現を誘導して、低酸素環境下への適応を促す。下流遺伝子には、上記の EPO 以外にも血管新生を促す vascular endothelial growth factor (VEGF) や糖の取り込みを担う glucose transporter 1 (GLUT1)、鉄取り込みを担う transferrin receptor 1 (TfR1) など、数多くの遺伝子発現を調節している (Milani and Harris, 2008)。このように周囲の環境変化に対して細胞内の様々な遺伝子の発現を変化させることで適応し、自身の生存を可能にしている (図 1-2)。

1-6. 生体と鉄

亜鉛や鉄、銅といった金属元素は、生体内に微量に存在し、欠乏状態また

は過剰量存在すると疾患に結びつくことが古くから知られていた。その役割は様々な蛋白質の活性中心として生命機能の維持に関わっており、通常はある一定の範囲内に留まるように厳密な代謝制御が行われている。しかし、がん細胞は盛んに細胞増殖を行うため、正常細胞とは異なる金属元素の代謝制御を行う場合がある。また、金属元素による発がんなども知られており、がんと金属元素の関係は非常に興味深い。その中でも、鉄はわれわれの生体内にもっとも多く存在する重金属であり、生体内におよそ 4 g 含まれている。生体内における鉄の働きに代表されるのが、赤血球が鉄を利用して作り出すヘモグロビンによる酸素運搬である。他にも鉄は DNA 合成リボヌクレオチドリダクターゼなど種々の酵素が働くために必須な金属元素である。それゆえ、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の高い細胞であることが知られている (Richardson *et al.*, 2009)。しかし、鉄が細胞内に過剰に存在すれば、活性酸素を生み出し、DNA をはじめ生体高分子にダメージを与える。具体的には、イギリスの化学者 Fenton が 1894 年に報告したフェントン反応が起るためである (Fenton *et al.*, 1894)。フェントン反応とは 2 価鉄 Fe^{2+} を触媒として過酸化水素からヒドロキシラジカル $\cdot\text{OH}$ が発生する以下の化学反応である。



この反応で発生したヒドロキシラジカルが DNA 鎖の切断を引き起こすことや、グアニン基が酸化修飾されて 8-ヒドロキシグアニンとなり、点変異を引き起こす原因となる (Kasai 1997)。その結果、遺伝子発現に異常を

来し、発がんすることが報告されている (Akatsuka *et al.*, 2012)。そのため、厳密に、細胞内における鉄濃度は制御されている。

では、鉄濃度はどのように制御されているか。まず、生体内への鉄の流入について述べる。食事に含まれる鉄は第 2 鉄 (Fe^{3+}) の形で存在するが、胃の酸性環境下で第 1 鉄 (Fe^{2+}) に還元されて十二指腸で体内に吸収される。この時、2 価金属輸送蛋白質 divalent metal transporter 1 (DMT1) によって十二指腸細胞内に Fe^{2+} が取り込まれる (De Domenico *et al.*, 2008)。取り込まれた Fe^{2+} は十二指腸上皮の基底膜に局在する ferroportin (FPN) によって門脈側へと輸送され、その後、鉄酸化酵素 hephaestin によって再び Fe^{3+} へと酸化される。FPN は生体内の鉄濃度を調節する重要な因子の 1 つであるが、肝臓から分泌されるペプチドホルモン Heparin によって FPN の発現が制御されており、hepcidin も鉄代謝を調節する因子の 1 つである (Nicolas G *et al.*, 2001)。

次に、生体内に取り込まれた鉄は、主に肝臓で産生される鉄輸送蛋白質トランスフェリンと結合し、血液を循環して全身に輸送される。通常、1 分子のトランスフェリンに対して 2 分子の Fe^{3+} が結合し、その親和性は非常に高い。トランスフェリンと結合した鉄は全身の細胞に発現している膜蛋白質トランスフェリンレセプター (TfR1) によるトランスフェリンの取り込みを介して細胞内に運ばれる。このように細胞に運ばれた鉄は鉄貯蔵蛋白質フェリチン収納されて、毒性を発揮しない状態で細胞内では存在する。このような一連の流れを経て、生体内にはおよそ 4 g の鉄が存在するが、半分ほどは赤血球ヘモグロビン合成に利用され、肝臓や筋肉、骨髄

で貯蔵されている (図 1-3)。

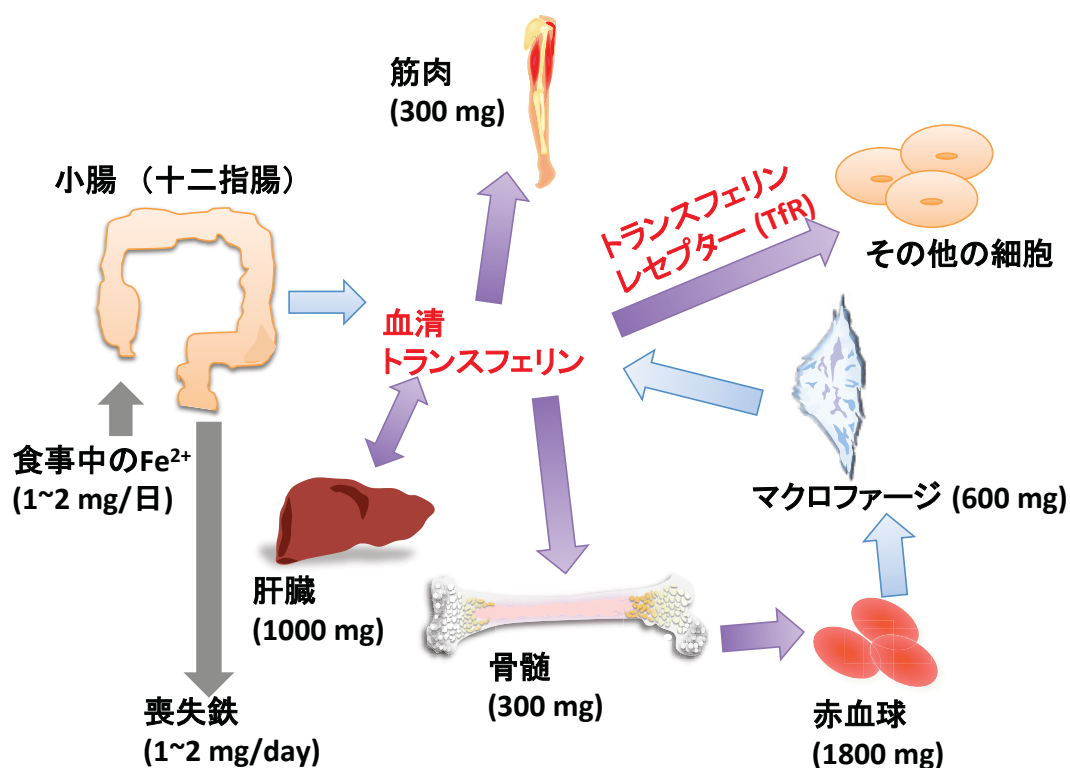


図 1-3 生体内の鉄代謝と鉄の分布

食事中の鉄は十二指腸で日に 1~2 mg、体内に吸収されて、トランスフェリンによって血液中を循環して各組織、細胞に受け渡される。その際、各細胞はトランスフェリンレセプター (TfR1) を介して細胞内にトランスフェリンを取り込む (紫色の矢印)。生体内の鉄は半分程は赤血球のヘモグロビン合成に利用され、他は肝臓内でフェリチン結合した状態で貯蔵されている。

[第 2 章] miR-210 を研究対象とした経緯と本研究の目的

2-1. miR-210 と赤血球造血

本研究で対象とした miR-210 は、当研究室の小坂らによって血球系譜特異的に発現する miRNA として同定された (Kosaka *et al.*, 2008)。まず、小坂らは赤血球と巨核球の成熟過程における未知の制御因子の一つに miRNA が存在すると考えた。全ての血球細胞は造血幹細胞を起源とし、分化、成熟する。赤血球と巨核球は共通の前駆細胞である MEP (megakaryocyte/erythroid progenitor cell) 細胞から分化、成熟するが、分化途中で両細胞系譜に作用する因子で大きく異なるのは赤血球産生因子 EPO と血小板産生因子トロンボポエチン (TPO: Thrombopoetin) である。そこで、EPO と TPO によって発現が誘導される miRNA の探索を行うため、小松らが巨核芽球性白血病の患者骨髄細胞から樹立した細胞株 UT-7 細胞 (Komatsu *et al.*, 1991) とその亜株 3 種類を用いた。用いた亜株は、小松らによって樹立され (Komatsu *et al.*, 1993, Komatsu *et al.*, 1996, Komatsu *et al.*, 1997)、それぞれ EPO 依存的に増殖する細胞株 UT-7/EPO、TPO 依存的に増殖する UT-7/TPO、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF:Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor) 依存的に増殖する細胞株 UT-7/GM である。UT-7/EPO 細胞は親株である UT-7 細胞とは異なり、GM-CSF や interleukin-3 には増殖反応を示さず、赤血球特異的な細胞膜蛋白質 Glycophorin A の発現が上昇しているため、赤血球様細胞であると考えられている。そして、UT-7/GM 細胞を EPO と TPO 存在下でそれぞれ培養

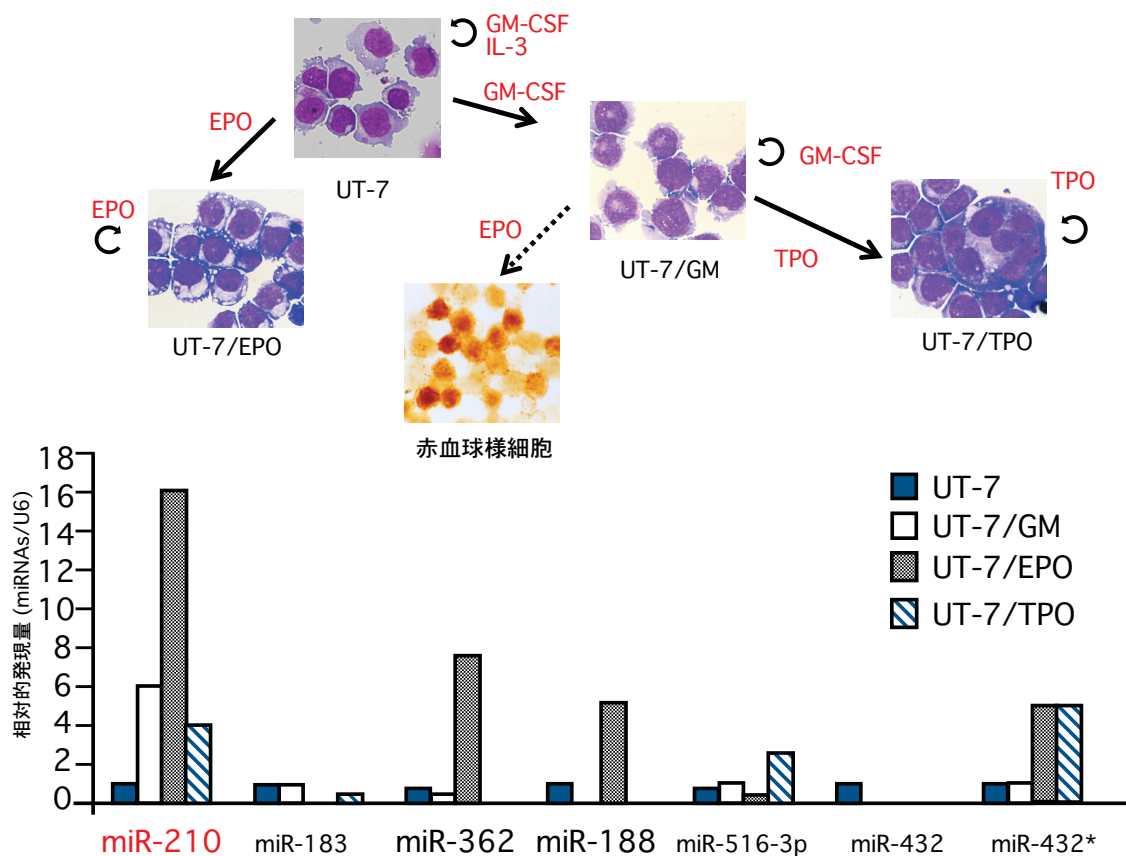


図 2-1 UT-7 細胞株とその亜株に発現する miRNA

小坂らによってヒト巨核芽球性白血病細胞株 UT-7 とその亜株間における miRNA の網羅的発現解析が行われた。その結果、UT-7/EPO に高発現している miR-210 が同定された。また、miR-362 と miR-188 は赤血球系譜特異的に発現している可能性が示唆された。(小坂展慶博士論文 (2008) を改変、引用)

を行うと赤血球様細胞、巨核球様細胞へと分化することから MEP 細胞様の性質を持つことが分かっている。さらに、UT-7/GM 細胞から樹立された UT-7/TPO 細胞は UT-7/GM 細胞に比べて巨核球特異的に発現している血小板第 4 因子と糖蛋白質 IIb、そして TPO の受容体である c-mpl の発現が上昇していることから、巨核球様細胞であると考えられている。このように遺伝子型が同一であるが表現型が異なる細胞株を用いて 324 種類のヒト miRNA のプローブが搭載されているマイクロアレイによる網羅

的発現解析を行った。その結果、UT-7/EPO 細胞と UT-7/GM 細胞における miRNA の発現を比較し、最終的に UT-7/EPO 細胞で発現が上昇している 3 種類の miRNA に着目した。その 3 種類とは miR-188、miR-362、そして、本研究対象とした miR-210 である。さらに小坂は miR-210 の赤血球造血への関与を調べた。まず、マウスにフェニルヒドラジン (PHZ:Phenylhydrazine) を腹腔内投与し、溶血性貧血を誘導させ、マウスの主要な造血器官である脾臓における miR-210 の発現を確認した。その結果、PHZ を投与した群は対照群に比べておよそ 20 倍も miR-210 の発現が亢進した。さらに赤血球造血において miR-210 の発現上昇はどのような細胞で起こっているのか確認するため、マウス胎児肝細胞を初期の前赤芽球から成熟赤血球まで発現している TER-119 分子 (Kina *et al*, 2000) 陽性細胞と陰性細胞に磁気ビーズ抗体法を用いて分離した。分離した細胞において miR-210 の発現を確認した結果、TER-119 陽性細胞において発現が高く、さらに詳細な赤血球分化段階における miR-210 の発現を解析した結果、miR-210 の発現は赤血球成熟の後期の段階で発現が上昇することを明らかにした。

2-2. miR-210 とがん

上述のように、小坂の研究によって、miR-210 の赤血球造血への関与が示唆された。しかし、小坂の報告の前後に miR-210 と固形腫瘍に関する報告が多くなされた。主に固形腫瘍において、miR-210 の発現が上昇していることであったが、興味深いことに、乳がんと膵臓がんにおいて miR-210

の発現上昇と予後不良の相関が報告された (Camps *et al.*, 2008, Greither *et al.*, 2010 *Int J Cancer*)。第 1 章で述べたように、miRNA の発現異常とがんとの関連性は多くの報告があり、miR-210 の発現上昇と予後不良の相関はその一つであろう。さらに乳がん細胞株と大腸がん細胞株を用いて低酸素環境下において発現が誘導される miRNA の探索が行われており、複数の miRNA が低酸素環境下で発現が誘導されることが明らかとなったが、その中に miR-210 も含まれていた (Kulshreshtha *et al.*, 2007)。第 1 章でも記したが、がんと低酸素環境は密接な関係であり、miR-210 が腫瘍組織内の低酸素環境領域で発現し、がん細胞の生存に有利に働くため、予後不良と相関することが予想される。上記 UT-7 細胞は造血器腫瘍であり、これら細胞株を用いて miR-210 に着目したが、固形腫瘍はその腫瘍内で形成する微小環境を持ち、周囲の環境変化や周囲の細胞との相互作用を研究するには適しているため解析対象を固形腫瘍、特に乳がんを中心に研究を進める。

2-3. 本研究の狙い

このように miR-210 に関する報告はすでにあるものの、発現解析などに留まる報告が多く、miR-210 に関する機能解析はあまり行われていなかった。そこで本研究では、非翻訳 RNA の一つである miRNA、特に miR-210 による生体機能調節について着目した。小坂の報告から、miR-210 は赤血球造血に関与することが示唆されたが、赤血球は鉄を含むヘモグロビンに酸素を結合させ、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は弁色破壊後に再び回収され、生体内でほぼリサイクルされているため、様々なレベルで鉄代謝は制御されている。つまり、酸素運搬と鉄代謝は密接な関連があり、miR-210が「酸素」と「鉄」というキーワードを結びつける可能性がある。本研究では低酸素が一つの重要な環境である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ものである。

[第3章] miR-210 の発現制御機構の解明

3-1. 序論

腫瘍組織内は酸素運搬を担う赤血球の通り道である血管が行き渡っておらず、酸素濃度勾配が存在していることが知られている。このような環境では他の因子も正常な状態とは異なり、周囲の環境に適応するため、がん細胞の遺伝子発現は正常細胞とは異なる。その遺伝子発現の変化に miR-210 が含まれると考えられる。miR-210 は低酸素環境下において発現が上昇することが知られているが、他の環境因子による発現誘導が存在するのか、またどのような発現制御機構を備えているのかを明らかにすることとした。

3-2. 材料および実験方法

3-2-1. 細胞培養

前立腺がん細胞株 PC3 細胞と PC3M 細胞、前立腺上皮細胞株 PNT2 細胞、そして、乳がん細胞株 MCF7 細胞と MDA-MB-231 細胞は RPMI 1640 medium (Invitrogen)、ヒト胎児由来腎細胞 HEK293 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) にそれぞれ 10% のウシ胎児血清 (FBS) (Invitrogen) と抗生物質 antibiotic-antimycotic (Invitrogen) を添加し、乳腺上皮細胞株 MCF10A 細胞は Mammary Epithelial Basal Medium (MEBM) (Lonza) に 1% GA-1000、50 µg/ml hydrocortisone、1 µg/ml ヒト Epidermal Growth Factor (hEGF)、500 µg/ml insulin、と 4% BPE (Lonza) を添加し、それぞれの細胞を 37

度 5%CO₂ のインキュベーター内で培養した。

3-2-2. 低酸素環境下における細胞培養

酸素分圧を窒素ガスにより制御可能なインキュベーター 9200E (Wakenyaku) を用いて 37 度、5%CO₂、1%O₂ 下で細胞を 24 時間または 48 時間培養した。

3-2-3. 鉄欠乏状態における培養

各細胞培養液にデスフェルオキサミン (Desferrioxamine:DFO) (Calbiochem) を終濃度 0.5 μM から 50 μM になるように加えて 24 時間または 48 時間培養したものを鉄欠乏状態とした。

3-2-4. qRT-PCR 法による miR-210 と pri-miR-210 の発現解析

miRNA の発現は TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) と 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて定量的 RT-PCR 法 (Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction : qRT-PCR) にて解析し、内部標準は U6 核内低分子 RNA (U6 small nuclear RNA; U6 snRNA) を用いた。Pri-miR-210 の発現は SYBR Green PCR master mix (Invitrogen) と 7300 Real Time PCR System を用いて解析し、内部標準は β-actin を用いた。用いたプライマーは下記の通りである。

(配列 5'→3')

pri-miR-210: Forward, GACTGGCCTTTGGAAGCTCC

Reverse, ACAGCCTTTCTCAGGTGCAG

β -actin: Forward, GGCACCACCATGTACCCTG

Reverse, CACGGAGTACTTGCGCTCAG

3-2-5. ウェスタンブロット法による HIF-1 α の発現解析

HIF-1 α の発現解析は抗ヒト HIF-1 α マウスモノクローナル抗体（クローン:54/HIF-1 α , BD Biosciences)を用いてウェスタンブロット法に行った。ローディングコントロールは抗 Actin マウスモノクローナル抗体（クローン:C4, Millipore)を使用した。二次抗体はペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヒツジ抗体（GE Healthcare)を使用し、ECL Plus Western blotting reagents（GE Healthcare)を用いて発色した。検出機器はLAS300（FUJI FILM)を用いた。

3-2-6. siRNA による遺伝子の発現抑制

HIF-1 α の発現抑制を行うため、HIF-1 α に対する siRNA を MCF7 細胞株に導入した。導入方法は DharmaFECT1 transfection reagent（Thermo Scientific)を用いて行った。siRNA の終濃度は 100 nM になるように調節し、対照群に関しては Allstar Negative Control（QUIAGEN)を同濃度導入した。HIF-1 α に対する siRNA は以下の配列をアニーリングさせ、使用した。

5'-GGAGGUGUUUGACAAGCGAdTdT-3'

5'-UCGCUUGUCAAAACACCUCctg-3'

同様に E2F1, E2F2, E2F3, に対して下記の配列を標的とした siRNA (QUIAGEN) を HEK293 細胞株に導入した。

E2F1: ACGCTATGAGACCTCACTGAA

E2F2: ACCCATTGGGAATGAGTTTAA

E2F3: CAGCGATCTCTTCGATGCTTA

3-2-7. miR-210 のプロモーターアッセイ

UT-7/EPO のゲノムを鋳型として表のプライマー (6 種類の Forward プライマーと 1 種類の Reverse プライマー) を用いて、miR-210 の上流領域をクローニングした。クローニングした PCR 産物を Taq ポリメラーゼによって、3'末端に A を付加後、pGEM-T Easy vector (Promega) に組み込んだ。その後、XhoI と Hind III による制限酵素処理を行い、pGL3-Basic vector (Promega) に組み替えた。各細胞は 96 穴プレートに播種し、Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) を用いて 100 ng/well になるように細胞へ導入した。導入後 48 時間培養し、Dual Luciferase Assay System (Promega) の操作手順に従い、アッセイを行った。また、予測転写因子結合部位の欠失は表のプライマーを用いて、PCR 法にて Vector を得た。

CTGTCACACGCACAGATCGAA-3' ア ン チ セ ン ス
鎖 :5'-TTCGATCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGAACGCGTCTGTGCG
TGTGACAGCGGCTGAATCACT-3'

これらベクターを乳がん細胞株 MDA-MB-231-luc-D3H2LN 細胞に導入後、G418 による薬剤選択によって恒常発現株を樹立した。樹立した細胞株をそれぞれ6週齢のメスのヌードマウスの乳腺へ 5×10^6 細胞移植した。およそ一ヶ月半から二ヶ月後、解剖前に 60 mg/kg の割合でピモニダゾール (Pimonidazole) (コスモバイオ) を腹腔内投与し、1 時間後に腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍を用いて切片を作製し、抗 red fluorescent protein (RFP) ウサギポリクローナル抗体 (abcam) と抗 HIF-1 α マウスモノクローナル抗体、もしくは抗ピモニダゾールマウスモノクローナル抗体を用いて染色した。二次抗体にはそれぞれ、Alexa594 標識抗ラビット IgG 抗体 (Invitrogen) と Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。核染色には DAPI (Invitrogen) を用いた。

3-3. 結果

3-3-1. 低酸素環境かおよび鉄欠乏状態における miR-210 の発現解析

低酸素環境下で miR-210 の発現が上昇することはすでに報告されていたが、前立腺がん細胞株 PC3 細胞と PC3 細胞を親株として骨転移能を高めた PC3M 細胞の 2 細胞株と前立腺上皮細胞株 PNT2 細胞、そして、乳がん細胞株 MCF7 細胞と MDA-MB-231 細胞の 2 細胞株と乳腺上皮細胞株 MCF10A 細胞を 1%酸素濃度という低酸素環境下で 24 時間もしくは 48

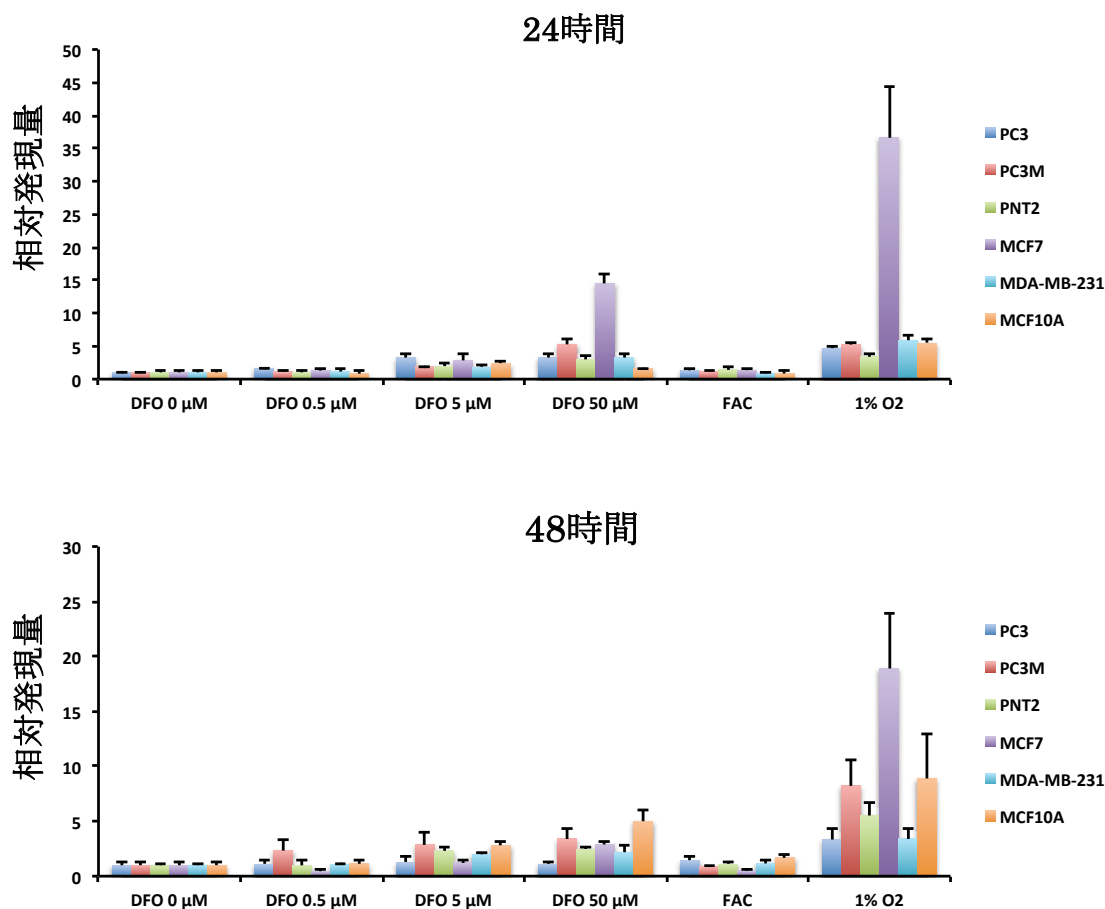


図 3-1 鉄欠乏状態、低酸素環境下における miR-210 の発現解析

前立腺がん細胞株 PC3、PC3M、前立腺上皮細胞株 PNT2、乳がん細胞株 MCF7、MDA-MB-231、乳腺上皮細胞株 MCF10A の培養液に各濃度の DFO もしくは 500 mM の ferric ammonium citrate (FAC) を添加、または 1%O₂ 濃度で 24 時間と 48 時間培養後に RNA を回収し、qRT-PCT 法を用いて miR-210 の発現を解析した。内部コントロールには U6 snRNA を用いた。

時間培養し、miR-210 の発現が上昇することを確認した (図 3-1)。さらに第 1 章で述べたように、HIF-1 α のプロリン残基を水酸化する酵素 PHD1~3 (prolyl hydroxylase domain 1~3) が鉄を共役因子としているため、鉄欠乏状態では HIF-1 α が水酸化されず、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されずに安定して存在する (Schofield and Zhang, 1999)。

そのため鉄欠乏状態は擬似的な低酸素環境下として用いられることがあり、その際に鉄キレート剤 DFO が使用されることがある。本研究でも擬似的低酸素環境下として DFO を培養液中に $0.5 \mu\text{M}$ から $50 \mu\text{M}$ の濃度で添加し、24 時間もしくは 48 時間後に RNA を回収し miR-210 の発現解析を行った (図 3-1)。その結果、低酸素環境下のみならず鉄欠乏時でも通常酸素下 ($20\%O_2$) で培養した場合に比べ、約 5 倍の miR-210 の発現上昇が認められた。また、その際の HIF-1 α の蛋白質発現量をウェスタンブロット法で確認した (図 3-2)。この結果は酸素濃度のみならず細胞内の鉄濃度によっても miR-210 の発現が変動しうることが示され、低酸素と鉄を結びつける一つの事象となった。

3-3-2. 低酸素環境かおよび鉄欠乏状態における pri-miR-210 の発現解析
低酸素環境下に加え、鉄欠乏時でも miR-210 の発現が上昇することが判明したが、どのような発現制御機構が存在するのか分かっていないため、まず、ゲノムから転写される一次転写産物である pri-miR-210 の発現を確認することとした。しかし、miR-210 前駆体はゲノムデータベース上では蛋白質に翻訳されない non-coding RNA のイントロン中に存在することが分かった (<http://genome.ucsc.edu>) (図 3-3)。そこで、そのイントロンを挟むようにエクソン上にプライマーを作製し、PCR 法にて発現を解析した結果、複数種類の PCR 産物が確認でき、UT-7/EPO で 3 種類、UT-7/GM、UT-7/TPO 細胞株で 2 種類の pri-miR-210 が存在する可能性が示唆された (図 3-4)。この結果は miR-210 の発現制御機構にスプライ

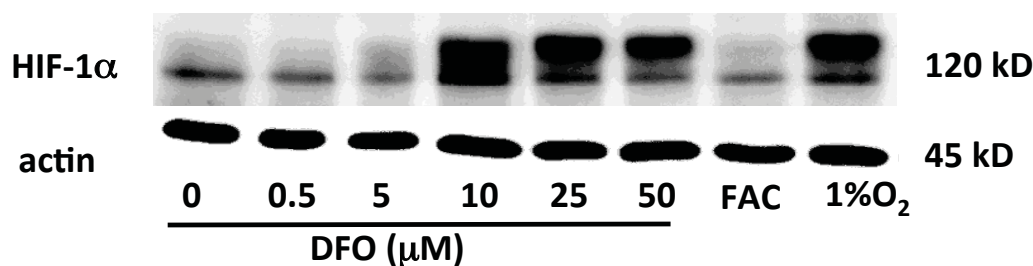


図 3-2 鉄欠乏状態による HIF-1 α の安定化

MCF7 細胞を各濃度の DFO と 500 mM の FAC、もしくは 1%O₂ で 48 時間培養後、蛋白質を抽出し、HIF-1 α の発現をウェスタンブロット法にて解析した。ローディングコントロールには actin を使用した。

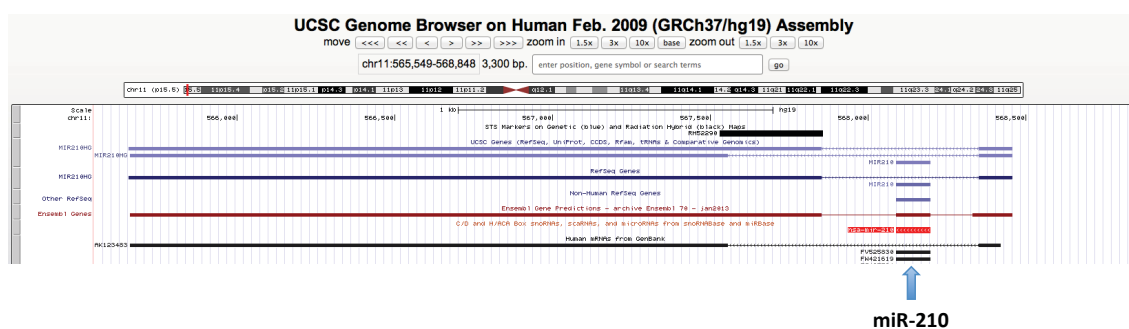


図 3-3 miR-210 のゲノム情報

ゲノムデータベース UCSC による miR-210 のゲノム情報。miR-210 は 11 番染色体の短腕 (p15.5) にコードされている。miR-210 は non-coding RNA のイントロンからスプライシングを受けて成熟する。また、スプライシングされた pri-miR-210 は異なる長さのものが存在することが分かる。(http://genome.ucsc.edu から引用)

シングが関与する可能性があることを示している MCF7 細胞株を低酸素環境下、または鉄欠乏状態で 48 時間培養し、RNA を抽出後、リバースプライマーを変更して qRT-PCR 法による pri-miR-210 の発現解析を行った (図 3-4)。低酸素環境下で培養した細胞は通常酸素下で培養した細胞に比べて pri-miR-210 はおよそ 10 倍も発現が上昇し、同様に鉄欠乏状態でも 3 倍以上も発現が亢進した。この結果から、少なくとも miR-210 は転写による発現制御機構の存在が判明した。

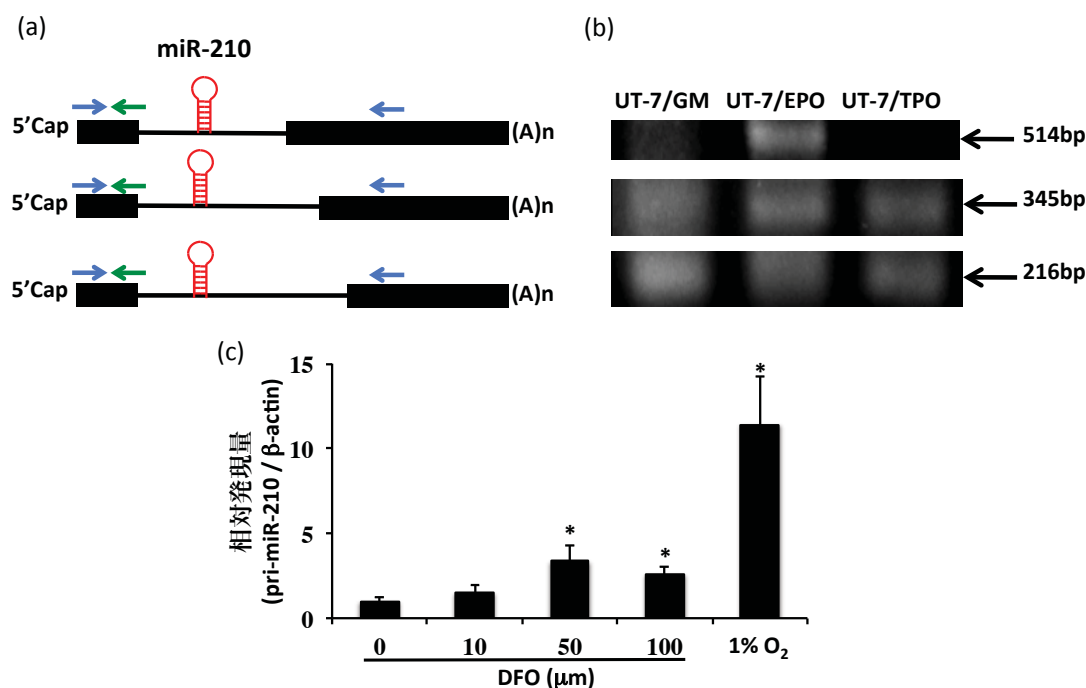


図 3-4 Pri-miR-210 の発現解析

Pri-miR-210 の種類の確認と発現解析を行った。(a) 水色の矢印の位置にプライマーを設計し、(b) ヒト巨核芽球性白血病細胞株 UT-7 の亜株 UT-7/GM、UT-7/EPO、UT-7/TPO における Pri-miR-210 の発現を確認した。UT-7/EPO では 3 種類、他は 2 種類の Pri-miR-210 の発現が確認された。(c) 右向き水色矢印のプライマーと緑矢印のプライマーを用いて、3 種類全ての pri-miR-210 の発現を解析した。MCF7 細胞の培養液に各濃度の DFO を添加、もしくは 1%O₂ で 48 時間培養後、RNA を抽出し、qRT=PCR 法にて発現を解析した。内部標準には β -actin を用いた。*DFO 0 μ M と比較して $p < 0.05$ 。

3-3-3. miR-210 のプロモーター領域の同定および転写因子の同定

低酸素環境下と鉄欠乏状態による HIF-1 α の安定化による擬似的低酸素環境下において、pri-miR-210 の発現が亢進することから、HIF-1 α による転写制御が考えられた。HIF-1 α の関与を確かめるため、MCF7 細胞に HIF-1 α に対する siRNA を導入し、HIF-1 α の発現を抑制した上で、低酸素環境下、鉄欠乏状態における miR-210 の発現解析を行った。発現解析

の結果、HIF-1 α に対する siRNA を導入した細胞群はネガティブコントロール用 siRNA を導入した細胞群に比べて miR-210 の発現が3分の1程度にまで発現が減少した (図 3-5)。

この結果から、miR-210 の発現制御機構のうち、HIF-1 α による転写制御を明らかにしたので、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として miR-210 の発現プロモーター領域の同定を試みた。pri-miR-210 の転写開始地点上流 1700bp を最大長、170bp を最短長としてクローニングし、pGL3 ベクターのルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込み、5 種類のレポーターベク

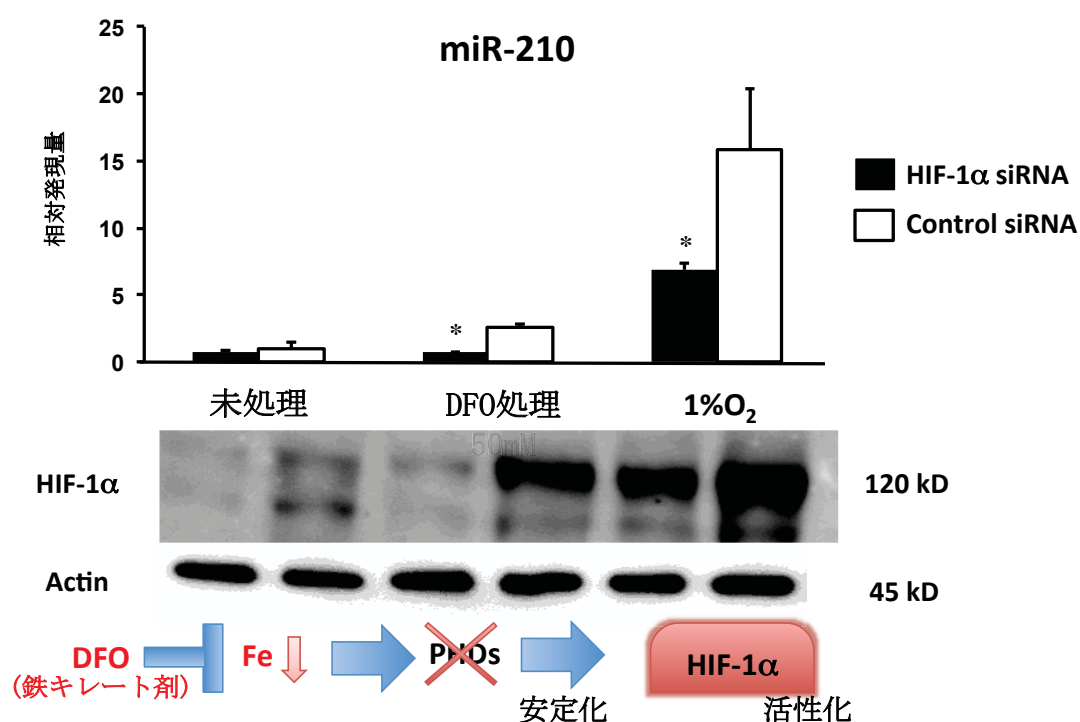


図 3-5 HIF-1 α の発現抑制による miR-210 の発現減少

MCF7 細胞に HIF-1 α に対する siRNA を導入後、DFO 50 μ M の濃度もしくは1%の酸素濃度で48時間培養後における miR-210 の発現を qRT-PCR 法にて解析した。内部標準は U6 snRNA を用いた。*コントロール siRNA を導入した群と比較して $p < 0.05$ 。(上段)

また、その際の HIF-1 α の蛋白質発現をウェスタンブロット法により解析した。ローディングコントロールは actin を用いた。(中段)

ターを作製し、各レポーターベクターを MCF7 細胞に導入して、低酸素環境下、鉄欠乏状態で 48 時間培養し、レポーターアッセイを行った。その結果、転写開始地点上流 255bp から 882bp の領域が存在しないとルシフェラーゼ活性は大幅に低下することが判明し、さらに 80bp 程の領域を欠除するとルシフェラーゼ活性はほぼ消失した (図 3-6)。よって、この転写開始地点上流 882bp 以内に存在する HIF-1 α のコンセンサス配列 (ACGTG または GCGTG) (Wenger *et al.*, 2005) の存在を確認したところ、この領域内には 3 ヶ所のコンセンサス配列が存在した。この 3 ヶ所のコンセンサス配列 5bp を欠失させたベクターを作製し、同様にレポーターアッセイを行った結果、転写開始地点近傍に存在するコンセンサス配

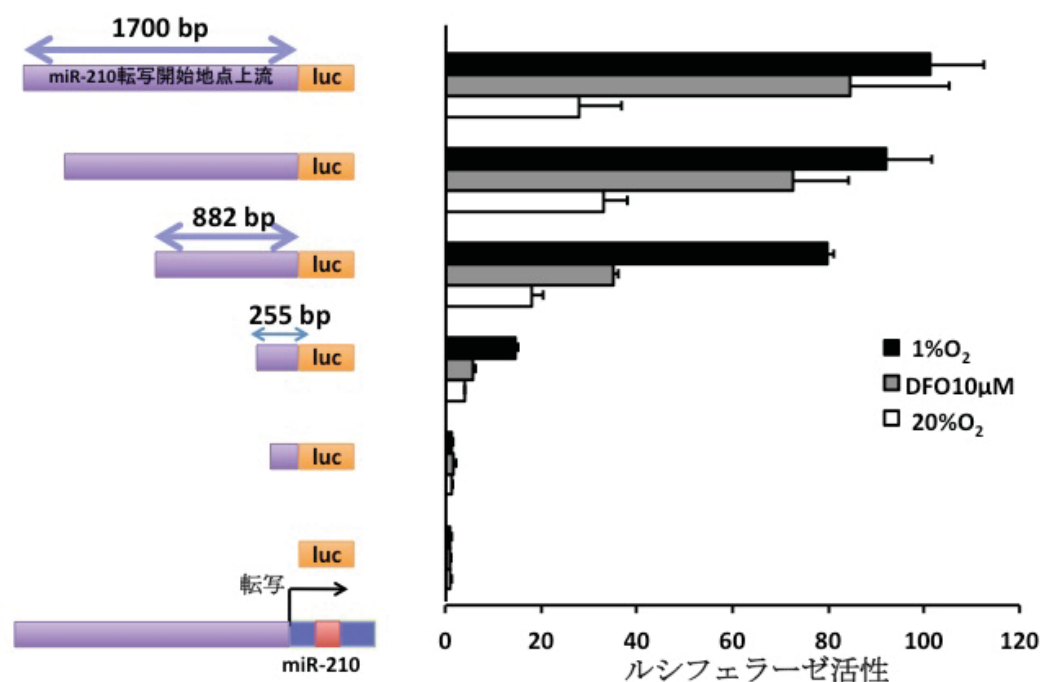


図 3-6 miR-210 のプロモーター解析

MCF7 細胞に各種レポーターベクターを導入後、通常酸素下 (20%O₂)、DFO 10 μM、低酸素下 (1%O₂) で 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

Luc:ルシフェラーゼ遺伝子

列を欠失させるとルシフェラーゼ活性に影響を与えることが分かった(図3-7)。

この結果より、転写開始地点近傍に存在するコンセンサス配列に HIF-1 が結合し、pri-miR-210 の転写を促進していることが示された。しかし、このコンセンサス配列が存在しても、255bp から 882bp の領域が存在しないと、ルシフェラーゼ活性が低下することから、この領域にはエンハンサーなどが存在することが考えられた。以上の結果より、低酸素環境下では酸素が不足することによる HIF-1 α の安定化が miR-210 の上流に結合し、転写を促進し、鉄欠乏状態では PHD の共役因子として必要な鉄が不

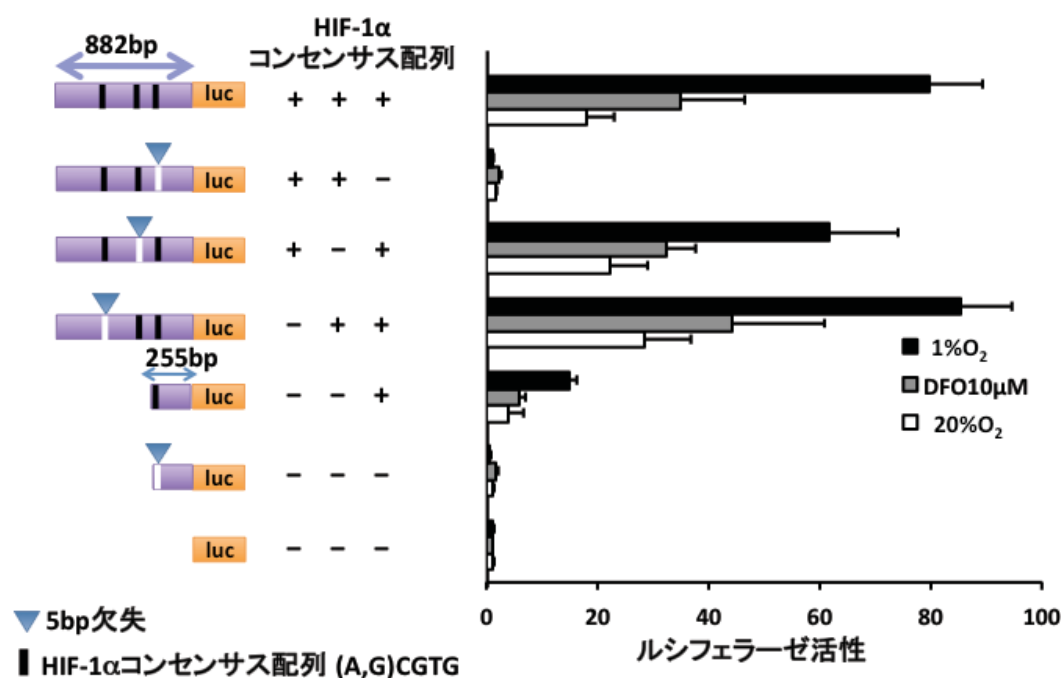


図 3-7 miR-210 のプロモーター領域に存在する HIF-1 α 結合部位の同定
MCF7 細胞に各種レポーターベクターを導入後、通常酸素下(20%O₂)、DFO 10 μ M、低酸素下(1%O₂)で24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

足することで HIF-1 α が安定化し、転写を促進することが明らかになった。また、miR-210 は低酸素下で発現が上昇するが、通常酸素下でも発現を認めることができることから、他の因子による転写制御が行われている可能性を考えた。がん細胞は通常酸素下においても HIF-1 α が微量ではあるが、安定化していることが報告されており (Denko *et al.*, 2008)、本研究においても通常酸素下で HIF-1 α に対する siRNA を MCF7 細胞に作用させると、miR-210 の発現が 7 割程度まで減少した (図 3-5)。そこで、非がん細胞であるヒト胎児腎由来細胞 HEK293 細胞を用いて、通常酸素下における転写制御機構の解析を行った。上記同様、プロモーター領域の長さが異なる 5 種類のベクターを HEK293 細胞に導入し、48 時間、通常酸素下で培養後、レポーターアッセイを行った (図 3-8)。低酸素下の実験結果とは異なり、転写開始地点上流 255bp から 882bp の領域が存在しなくても、ルシフェラーゼ活性に影響はなく、転写開始地点上流 170bp から 255bp が存在しないとルシフェラーゼ活性が半分以下に低下することが分かった。よって、転写開始地点上流 255bp 以内に転写因子が結合しうる配列が存在すると考え、UCSC Genome database (<http://genome.ucsc.edu>) による予測転写因子結合部位を参考にし、E2F、AP2、Oct-C が候補転写因子として挙げられた (図 3-9)。これらの予測結合配列を上記同様に欠失させたベクターを作製し、HEK293 細胞に導入後 48 時間培養し、レポーターアッセイを行った。低酸素環境とは異なり、転写開始地点上流に一番近い HIF-1 α 結合コンセンサス配列は転写活性に影響を与えず、E2F の予測結合部位を欠失した時のみ、ルシフェラーゼ

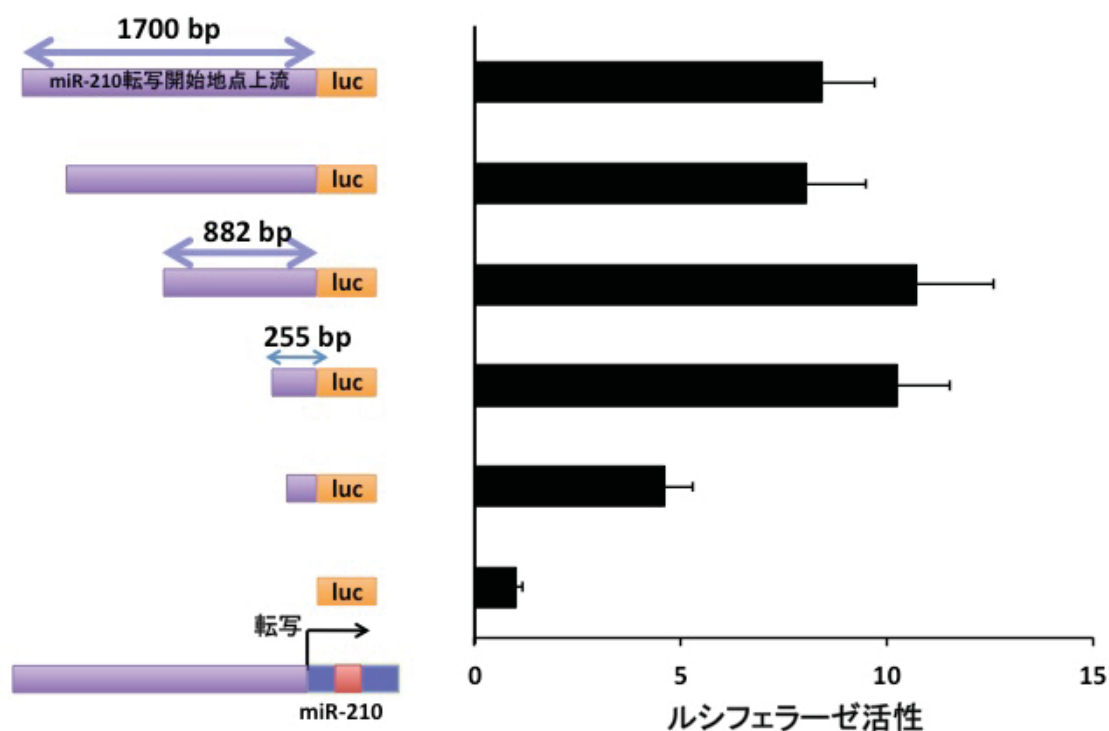


図 3-8 非がん細胞株 HEK293 における通常酸素下のプロモーター解析
 図 3-6 と同様の各種レポーターベクターを HEK293 細胞に導入し、通常酸素下で 24 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。Luc:ルシフェラーゼ遺伝子

活性に影響を与えた (図 3-10)。E2F は 8 つのファミリー遺伝子を持ち、E2F1～E2F8 と名付けられており、細胞周期を制御する転写因子として知られている (Attwooll *et al.*, 2004)。さらに E2F ファミリーは 4 つのサブグループに分類される。どの E2F ファミリーが結合するかは不明であるため、代表的な E2F1～E2F3 に対する siRNA を HEK293 細胞に導入し、48 時間後に miR-210 の発現を確認した。ネガティブコントロール用 siRNA を導入した細胞群に比べて、全ての E2F の発現を抑制した場合、miR-210 の発現は低下した (図 3-11)。一方で miR-16 の発現は減少傾向にあるものの、有意な差はなく、E2F1、E2F2、E2F3 の発現を抑制する

と miR-210 の発現を特異的に減少させることから、同じサブグループに属する E2F1~3 が通常酸素下において miR-210 の発現を制御している可能性が見いだされた。また、miR-210 は E2F3 を標的遺伝子としていることが報告されているため (Giannakakis *et al.*, 2008)、フィードバック効果による細胞周期の微調整を行っていることが考えられる。

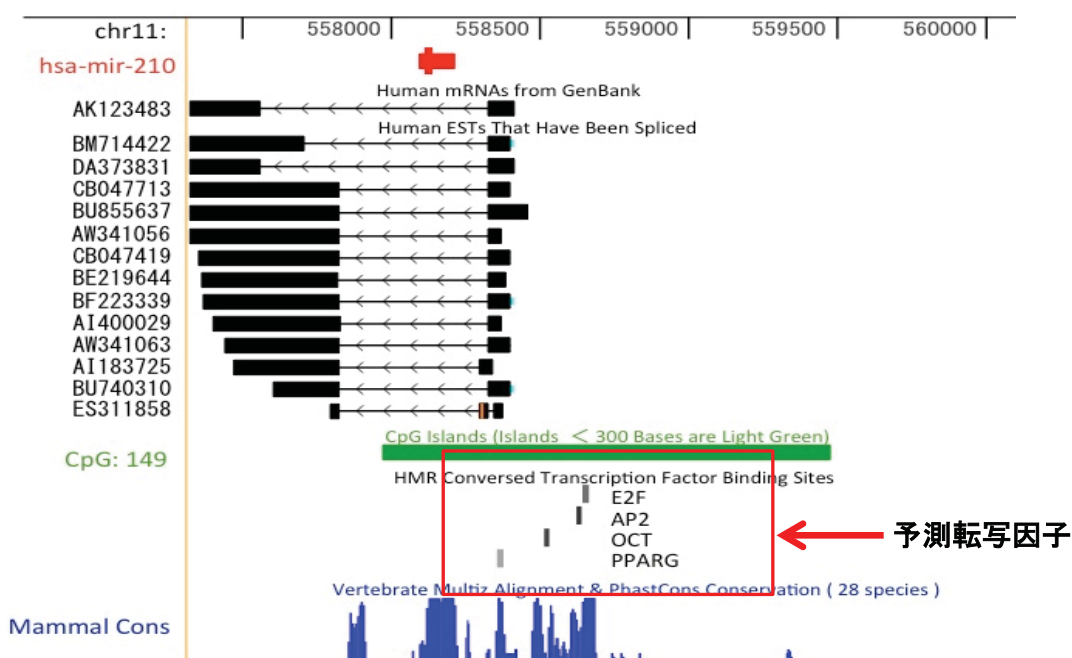


図 3-9 miR-210 の転写因子予測

UCSC ゲノムデータベースより、miR-210 のプロモーター領域に結合しうる転写因子が予測されている。E2F、AP2、OCT の予測結合部位が miR-210 の上流に存在する。また、miR-210 の上流は CpG アイランドが存在しており、メチル化による転写制御も受けている可能性がある。(UCSC Genome database より引用)

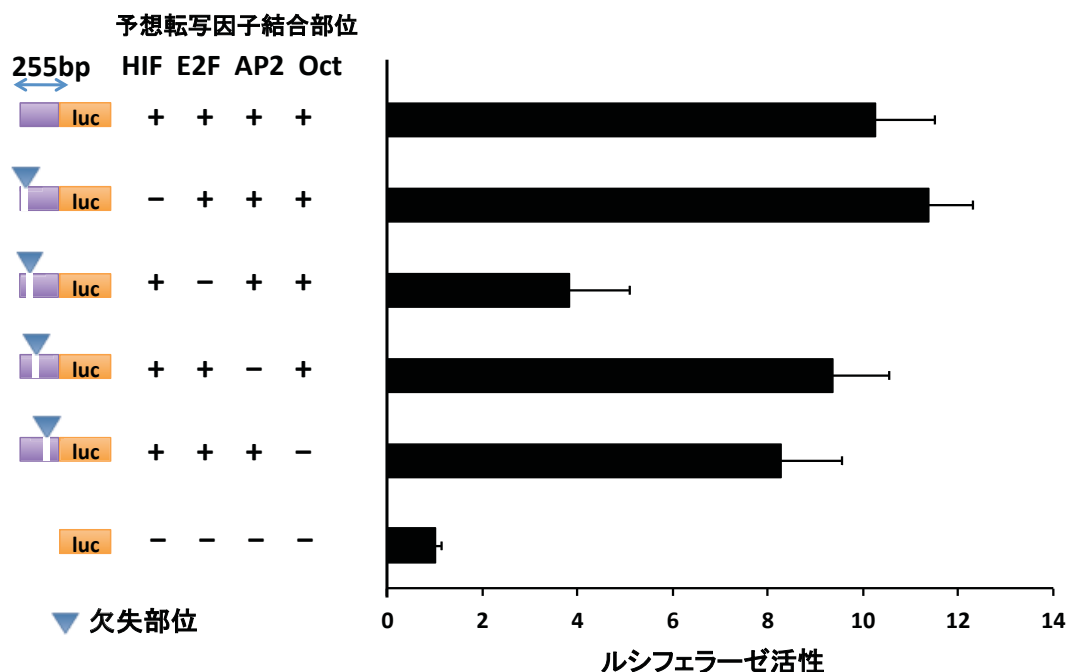


図 3-10 通常酸素下における miR-210 の転写因子の同定

転写開始地点上流 255bp の領域において、HIF-1 α 、E2F、AP2、Oct の結合部位をそれぞれ欠失したレポーターベクターを HEK293 細胞に導入後、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。それぞれの欠失した部位は左模式図で白抜きと矢印で示してある。“+”はその転写因子の予測結合部位が存在していることを、“-”は欠失していることを表している。Luc:ルシフェラーゼ遺伝子

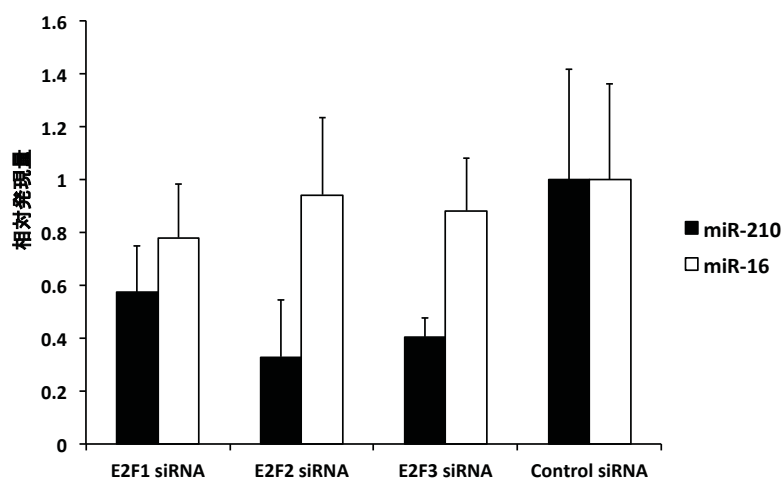


図 3-11 E2F ファミリー遺伝子の抑制による miR-210 の発現変化

HEK293 細胞に E2F1、E2F2、E2F3 に対する siRNA を導入し、48 時間後に RNA を抽出し、miR-210 と miR-16 の発現を解析した。miR-16 は E2F による発現誘導がない miRNA として測定した。内部標準は U6 snRNA を用いた。

3-3-4. 腫瘍内環境における miR-210 発現細胞の局在解析

前項で miR-210 は低酸素環境下で HIF-1 によって発現が誘導されることを明らかにしたが、これは *in vitro* のアッセイに基づく結果であったため、より生体内の環境に近い条件で miR-210 の発現細胞と低酸素部位の関係を明らかにすることを試みた。概略は miR-210 の発現を可視化可能な細

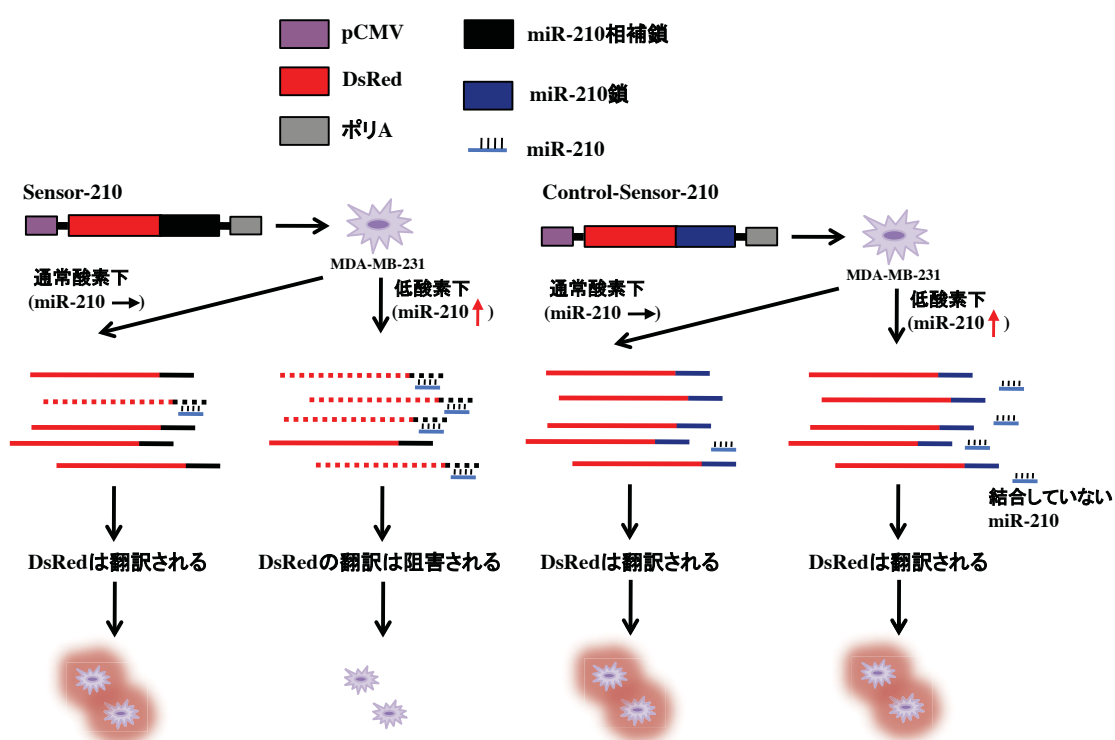


図 3-12 Sensor-210 ベクターによる miR-210 発現細胞の可視化

Sensor-210 ベクターによる miR-210 発現細胞の可視化の概略図を示す。CMV プロモーター下流に半減期が短縮されている赤色蛍光蛋白質 DsRed-DR が組み込まれており、DsRed-DR の 3'UTR に miR-210 と相補的な配列が 2 つ組み込まれている。対照となるベクターは miR-210 と順列の配列が 2 つ組み込まれている。これらベクターを MDA-MB-231 細胞に導入し、薬剤選択による恒常発現細胞株を樹立する。転写された DsRed-DR の mRNA には miR-210 との結合部位を持つため、miR-210 の発現が上昇すると DsRed-DR の翻訳が阻害され、細胞内の赤色蛍光蛋白質の量が減少する。対照となるベクターを導入した細胞は miR-210 が結合できないため、miR-210 の発現に関わらず赤色蛍光を観察できる。

胞株を樹立し、マウスにそれら細胞株を移植してゼノグラフトモデルを作製する。その後、腫瘍径が大きくなったところで、マウスを解剖し、腫瘍を摘出、切片を作製して腫瘍内の低酸素領域と miR-210 の発現部位を観察することで、がん微小環境における miR-210 の発現を考察する。2 種類のベクターを作製し、miR-210 を可視化する細胞は作製した。1 つ目は cytomegalovirus (CMV) プロモーターの下流に半減期が通常より短くなるように変異が導入された DsRed-DR を、さらに DsRed-DR の下流に miR-210 の相補鎖を組み込んだベクターを作製した (pCMV_miR-210-Sensor)。対照となるベクターは miR-210 の順配列を組み込んだ。このベクターは転写された DsRed-DR の mRNA 下流に存在する miR-210 の相補鎖に対して miR-210 が結合し翻訳を抑制する。その結果、miR-210 の発現が上昇した細胞では DsRed-DR の赤色蛍光が減少する (図 3-12)。もう一つは、前項で使用した miR-210 の転写開始地点より上流 882bp の領域の下流に DsRed-DR を組み込んだベクターを作製した (pmiR-210-promoter_DsRed)。対照としたベクターは上記ベクターの転写開始地点上流に近傍する HIF-1 α 結合配列を欠失したベクターを用いた (図 3-13)。また、ゼノグラフトモデルを作製することを考え、高転移乳がん細胞株 MDA-MB-231-luc-D3H2LN 細胞株に上記ベクターを導入し、安定的に DsRed-DR を発現する細胞株を樹立した pCMV_miR-210-Sensor については低酸素環境下で DsRed-DR の発現が変化するかを確かめた (図 3-14)。上記の恒常発現細胞株を低酸素環境下と通常酸素下において 24 時間培養し、抗 RFP 抗体を用いて DsRed-DR

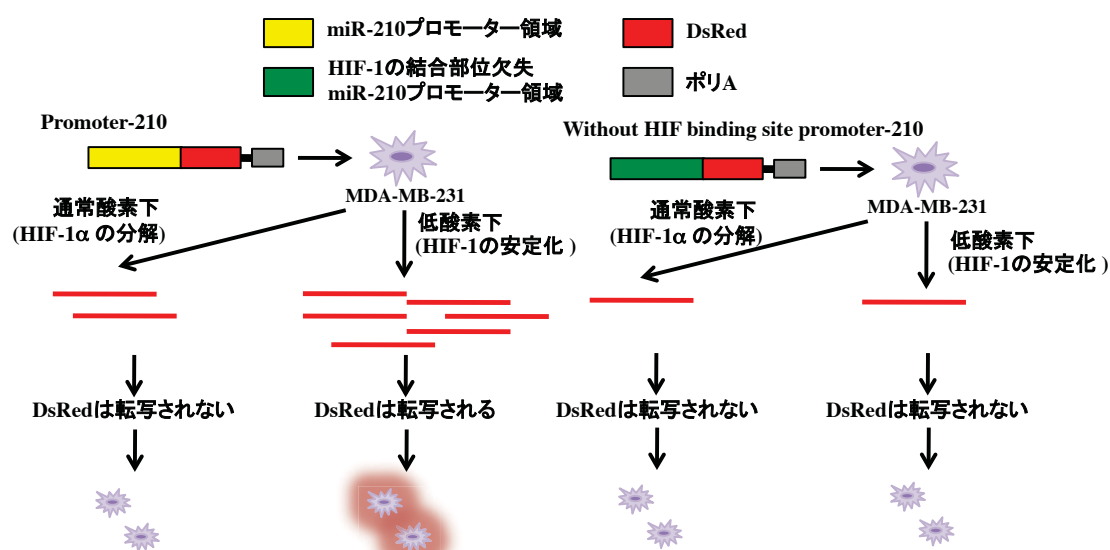


図 3-13 Promoter-210 による miR-210 発現細胞の可視化

Promoter-210 ベクターによる miR-210 発現細胞の可視化の概略図を示す。プロモーターアッセイに用いたプロモーター領域の下流に半減期が短縮されている赤色蛍光蛋白質 DsRed-DR が組み込まれており、miR-210 の転写が誘導される条件で DsRed-DR の発現が誘導される。そのため、miR-210 の発現誘導されている細胞は赤色蛍光を観察することができる。対照となるベクターは図 3-6 で確認された HIF-1 α 結合部位が欠失したプロモーター領域を用いており、DsRed-DR はほぼ転写されないため、赤色蛍光を観察できない。

を染色した。その結果、低酸素環境下において、通常酸素下と比べて DsRed-DR の発現が低下する一方で、対照となるベクターを導入した細胞群では、低酸素環境下でも DsRed-DR の発現に変化はなかった。このことから、本細胞株を用いることで miR-210 の発現細胞を可視化することが可能である。これら細胞株をヌードマウスの乳腺に移植し、ゼノグラフトマウスを作製後、腫瘍を摘出する前に酸素分圧 10mmHg 以下の低酸素環境下で還元され、その領域に存在する細胞内に取り込まれ、蛋白質と結合するピモニダゾール (Pimonidazole) を腹腔内投与した。腫瘍摘出後、切片を作製し、抗 RFP 抗体と、抗 HIF-1 α 抗体もしくは抗ピモニダゾール

ル抗体で染色した結果、pCMV_miR-210-Sensor を導入した細胞群を移植した腫瘍では、RFP が強発現している細胞が存在する領域では HIF-1 α の発現が弱く、一方で RFP の発現が弱い細胞が存在する領域では HIF-1 α は強発現していた。また、pmiR-210-promoter_DsRed を導入した細胞群を移植した腫瘍では RFP の強発現細胞とピモニダゾールが取り込まれた細胞がほぼ一致していた。以上の結果から、miR-210 は腫瘍内においても低酸素領域で発現が上昇することが示された。

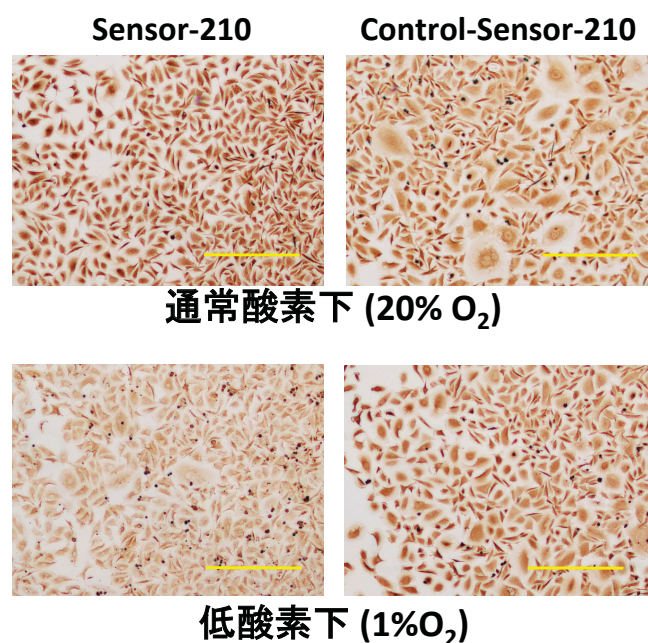


図 3-14 Sensor-210 ベクターによる miR-210 の発現確認

Sensor-210 ベクターを MDA-MB-231 細胞株に導入し、通常酸素下（上段）と低酸素下（下段）で 24 時間培養し、DsRed-DR 蛋白質を抗 RFP 抗体を用いて DAB 染色を行った。Sensor-210 ベクターを導入した細胞では低酸素下で培養した群は DsRed-DR の発現が減少したが（左列）、対照となるベクターを導入した細胞では通常酸素下で培養を行っても DsRed-DR の発現減少は認められなかった（右列）。

スケールバー: 500 μ m

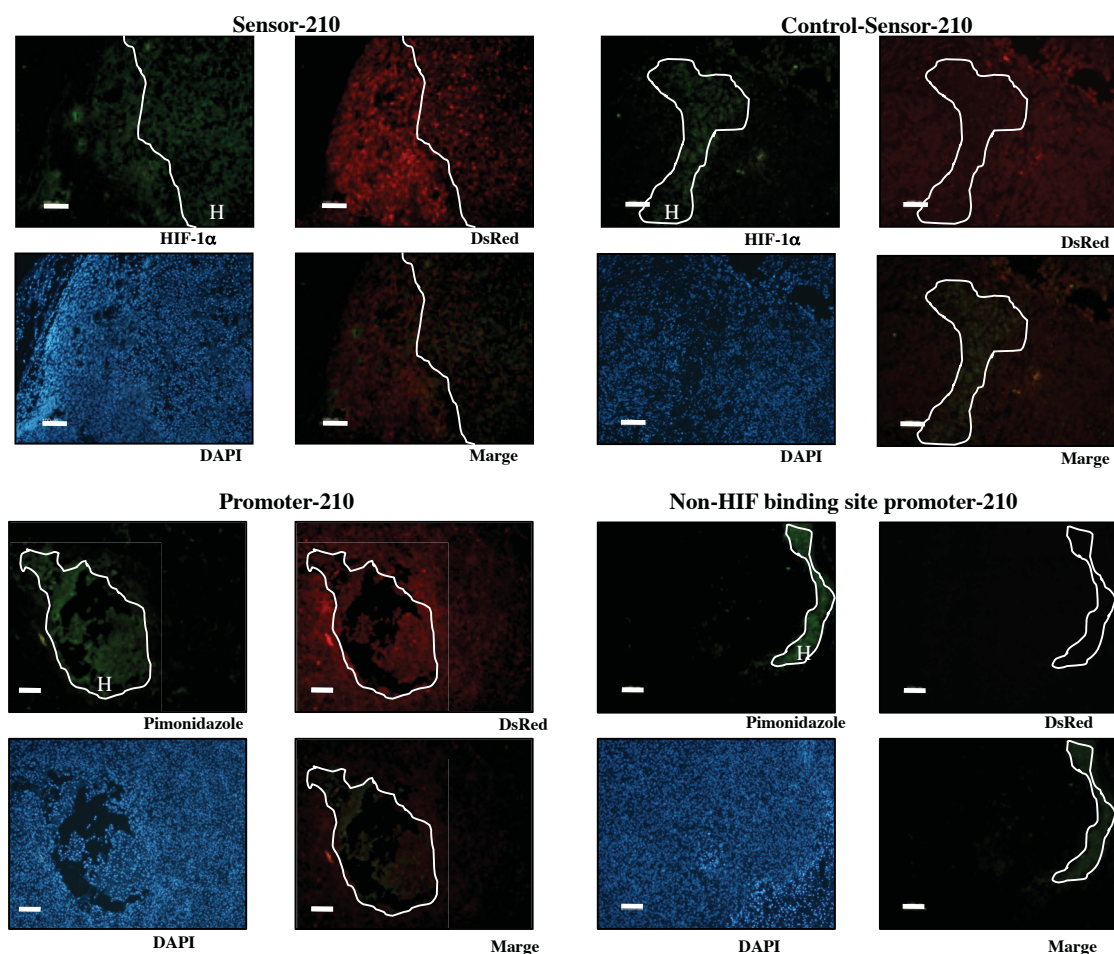


図 3-15 腫瘍内における miR-210 の発現解析

Sensor-210 と Promoter-210 を用いて腫瘍内における miR-210 の発現細胞を可視化した。スケールバー: 100 μm

3-4. 考察

本研究により、miR-210 の発現制御機構が明らかとなった。miR-210 は多くのがん種で発現上昇の報告があるが、細胞株を用いた研究から、特に低酸素環境下で発現の上昇が確認されている。生体中に発生した腫瘍組織中のがん細胞は通常組織に比べて低酸素に晒されており (Vaupel *et al.*, 1991)、この結果、miR-210 の発現が上昇していると考えられる。さらに本研究によって、低酸素下においてキーとなる転写因子 HIF-1 α によって

miR-210 の発現が誘導されること、そして HIF-1 α の安定化に寄与するのが低酸素のみならず、鉄欠乏状態であることも考慮し、鉄キレート剤による miR-210 の発現誘導も示した。この結果は、腫瘍組織内では血管新生が不十分なため、酸素のみならず、鉄などの栄養素が不足しているため、そのような環境下において、miR-210 が何らかの役割を果たしているのではないかと考えられる。また、miR-210 が HIF-1 α の下流遺伝子であることから、乳がんや膵臓がんにおける miR-210 の発現上昇と予後不良の相関が説明できる。なぜならば、肺がんや乳がんにおいて HIF-1 α の高発現群は予後不良であることがすでに報告されており (Hung *et al.*, 2009, Generali *et al.*, 2006)、miR-210 の高発現は HIF-1 α の高発現とみなすことも可能であることから、これら報告と合わせて、miR-210 の発現を予後不良マーカーとして使用できるだろう。さらに、HIF-1 α は蛋白質の安定化が機能と関連しているため、蛋白質の発現解析を行うより、RNA で定量できる miR-210 の発現を指標とする方が簡便である。また、株化されたがん細胞株は正常な細胞に比べて HIF-1 α が通常酸素下においても蓄積されているため、HIF-1 α 以外の転写調節を受けている可能性を考え、非がん細胞株 HEK293 細胞を用いた解析をおこなった。この解析結果からは E2F ファミリー遺伝子の関与を明らかにしたが、HIF-1 α による転写活性に比較すると低く、主に発現調節している因子は HIF-1 α であると考えられるが、miR-210 は E2F3 を標的遺伝子としていることが報告されていることを合わせると発現誘導が微量であっても、細胞周期などを調節するには重要な要素であると推測できる (図)。

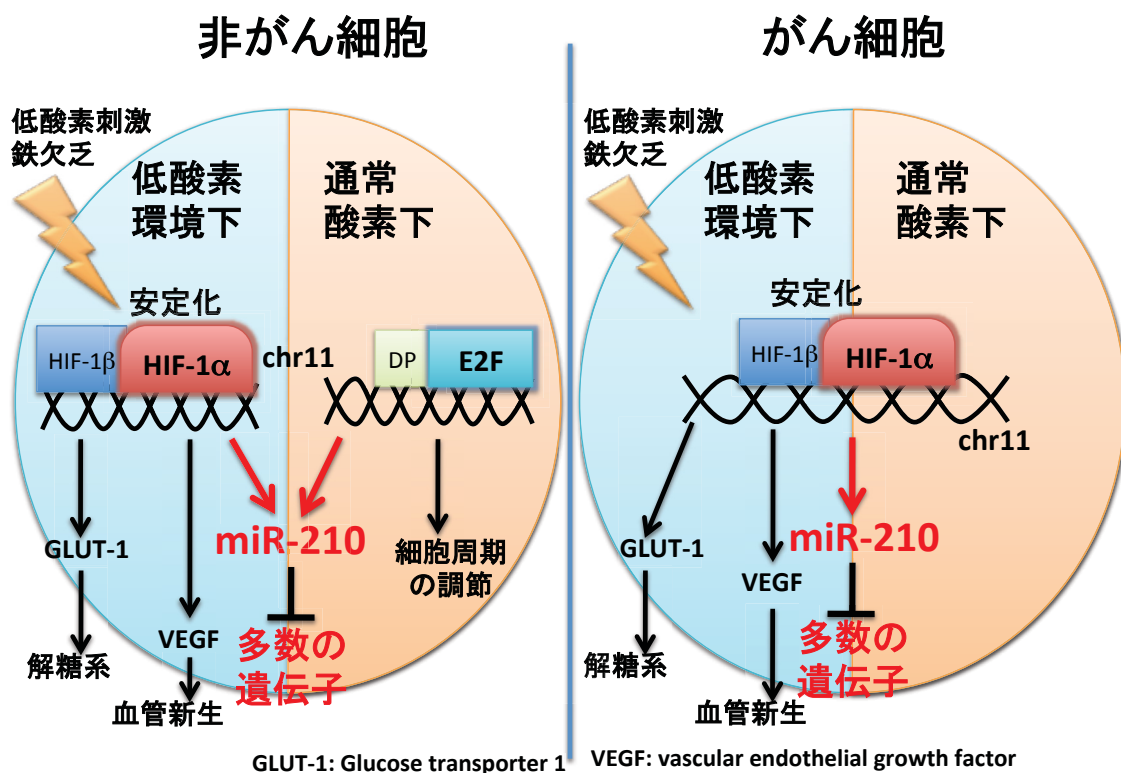


図 3-16 miR-210 の発現調節機構

miR-210 は低酸素刺激、もしくは鉄欠乏状態によって HIF-1 α が安定化すると、転写が誘導される。しかし、がん細胞（右）では通常酸素下においても HIF-1 α の安定化が認められ、HIF-1 α による転写が通常酸素下でも行われていると考えられる。非がん細胞においては、通常酸素下では E2F ファミリーによる転写制御を受けている可能性が示唆された。HIF-1 α は多数の遺伝子の転写を促し、細胞が低酸素環境や鉄欠乏状態への適応を促進するが miR-210 も、標的遺伝子の発現を抑制することで、そのような環境への適応を促進すると考えられる。

[第 4 章] miR-210 の標的遺伝子の探索と機能解析

4-1. 序論

第 3 章では、miR-210 が鉄欠乏状態や低酸素環境において HIF-1 α によって転写制御されており、通常酸素下では E2F ファミリーによって転写制御されていることを明らかとした。さらに小坂の研究により酸素運搬を担う赤血球造血にも関与が示唆されていることから、miR-210 は「酸素」や「鉄」といったキーワードに関連する機能を持っているのではないかと予想される。しかし、miRNA は複数種類、中には数百種類の標的遺伝子を持ち、それぞれの遺伝子の発現を微調節することで、細胞の恒常性を保っている。本章では、まず、データベースによる miR-210 の標的遺伝子の探索を行い、数多く挙げられた遺伝子の中から候補となる遺伝子を抽出することとした。その後、生化学的実験を実施することで、miR-210 の標的遺伝子を同定することとした。さらに、miR-210 の発現変動による機能変化を解析し、解析結果をもとに miR-210 の腫瘍内における役割や赤血球造血への関与などを考察した。

4-2. 材料および実験方法

4-2-1. データベースによる候補標的遺伝子の探索

複数存在するとされている miRNA の標的遺伝子の候補を挙げるため、主に使用したデータベースは「TargetScan」(<http://www.targetscan.org>) である。このデータベースは更新されることがあり、いくつかの version

が存在する。本研究を開始し、初めて TargetScan を用いた時は、version 5.0 (December 2008) であった。2013 年現在は version 6.2 (June 2012) となっている。本アルゴリズムは主に mRNA の 3'UTR に対する miRNA の 5'末端 2~8 番目 seed 配列との相補性、結合部位が 3'UTR のどの位置に存在するか、そして、その配列が種間を超えて保存されているか、などでスコア付けされている。他に補助的に「Sanger MirBase (version 5)」 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) と「miRanda」 (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) を用いた。

4-2-2. qRT-PCR 法による標的遺伝子の発現解析

標的遺伝子の発現解析は TaqMan Probe (Applied Biosystems) と 7300 Real Time PCR System を用いて qRT-PCR 法にて解析し、内部標準は β -actin を用いた。

4-2-3. 3'UTR アッセイ法による標的遺伝子の発現抑制の評価

標的遺伝子の候補として挙げられた各遺伝子の 3'UTR を下記表のプライマーを用いてクローニングし、クローニングした PCR 産物を Taq ポリメラーゼによって、3'末端に A を付加後、pGEM-T Easy vector に組み込んだ。その後、XhoI と NotI による制限酵素処理を行い、psiCHECK-2 ベクター (Promega) のルシフェラーゼ遺伝子下流に組み込んだ。さらに予測結合部位に変異や欠失を下記表のプライマーを用いて導入した。MCF7 細胞を 96 穴プレートに播種し、DharmaFECT DUO (Thermo

Scientific) を用いて各ベクター100 ng/ well と Pre-miR-210 (ambion) もしくは Pre-miR-NC (ambion) を終濃度 100 nM になるように細胞へ導入した。導入後 48 時間培養し、Dual Luciferase Assay System の操作手順に従い、アッセイを行った。

4-2-4. Pre-miR-210、Anti-miR-210 による標的遺伝子の抑制効果検証

MCF7 細胞を 96 穴プレートに播種し、DharmaFECT1 transfection reagent を用いて Pre-miR-210 もしくは Pre-miR-NC、また Anti-miR-210 (ambion) もしくは Anti-miR-NC (ambion) を終濃度 100 nM になるように細胞へ導入した。Pre-miR-210 もしくは Pre-miR-NC を導入した細胞群は通常酸素下で、Anti-miR-210 もしくは Anti-miR-NC を導入した細胞群は低酸素環境下でそれぞれ 48 時間培養した後に、RNA を抽出し標的遺伝子の発現を qRT-PCR 法とウェスタンブロット法で確認した。

4-2-5. ウェスタンブロット法による遺伝子の蛋白質発現解析

各遺伝子の蛋白質量の解析は下記抗体を用いてウェスタンブロット法にて行った。

抗ヒト ISCU ウサギポリクローナル抗体 (ロット:FL-142, santaCruz)

抗ヒト Tfr1 マウスモノクローナル抗体 (クローン:H68.4, Invitrogen)

抗フェリチンラビットモノクローナル抗体 (クローン: EPR3004Y, EPITOMICCS)

抗 IRP1 ウサギポリクローナル抗体 (医学生物研究所)

ローディングコントロールは抗 Actin マウスモノクローナル抗体を使用した。

4-2-6. トランスフェリンの取り込み評価方法

MCF7 細胞と MDA-MB-231 細胞に Pre-miR-210 もしくは Pre-miR-NC を導入し、48 時間後にトランスフェリンの取り込みを評価した。評価方法 2 つあり、1 つは免疫染色による評価方法である。まず、FBS 不含の細胞培養液に換えて、30 分間、37 度でインキュベートし、さらに FBS 不含の細胞培養液に Alexa 594 標識ヒトトランスフェリン (Invitrogen) を終濃度 50 mg/ml に調節した培養液に換えて 45 分間、37 度でインキュベートする。その後、4%パラホルムアルデヒドで 15 分間、室温でインキュベートして固定する。固定後、Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗い、抗ヒト TfR1 マウスモノクローナル抗体(クローン:H68.4, Invitrogen) を添加し、室温で 1 時間インキュベートする。二次抗体は Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体を用いた。最後にヘキスト 33342 (Invitrogen) を用いて細胞核を染色して、共焦点顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (Olympus) で観察した。

もう一つの評価方法はフローサイトメーターを用いた方法である。免疫染色の時と同様にトランスフェリンを添加し、インキュベーションまでの手順は同じである。その後、細胞を剥がして、集めた後に、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト TfR1 マウスモノクローナル抗体(クローン:M-A712, BD Biosciences) もしくは FITC 標識アイソタイプコン

トロール IgG (クローン:G155-178, BD Biosciences) を加えて 30 分、4 度にてインキュベートし、FACSAria II cell sorter (BD Biosciences) にて Tfr1 の発現とトランスフェリンの取り込みを解析した。

4-3. 結果

4-3-1. in silico 解析による miR-210 の標的遺伝子の候補探索

miRNA 自体はおよそ 21 塩基で、標的遺伝子へ配列相補的に結合するが、結合に重要な配列は 21 塩基全てではない。第 1 章で述べたように seed 配列と呼ばれる 7 塩基ないし 6 塩基が重要であり、計算上では 16384 塩基ないし 4096 塩基にあれば、seed 配列と相補的な配列が存在することになり、さらに多少の“ゆらぎ”が存在するため miRNA の標的遺伝子の探索には複数のアルゴリズムが組み込まれたデータベースによる in silico 解析が用いられる。本研究でも主に「TargetScan」を用いて miR-210 の標的遺伝子の探索を行った。種間で結合配列の保存性が高い遺伝子は 21 種類、保存性の低い結合配列を持つ遺伝子も含めると 100 種類もの遺伝子が挙げられた (version 5.2) (図 4-1)。miRNA の働きは種間を超えても保存されている可能性が高いため、前者の 21 種類の遺伝子に着目した。その中でも、「酸素」や「鉄」、「赤血球」、「がん」に関連する遺伝子を抽出することとした。その結果、ISCU (iron-sulfur cluster scaffold homolog) と NDUFA4 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa) に着目した (図 3-2)。ISCU はミトコンドリア内で鉄-硫黄クラスター (Fe-S クラスター) 生成に関わる遺伝子である。細

予測標的遺伝子 予測結合部位の種類と数 スコア

Target gene	Gene name	Conserved sites				Poorly conserved sites				Representative miRNA	Total context score	Aggregate PCT	Previous TargetScan publication(s)	Links to sites in UTRs
		total	8mer	7mer-m8	7mer-1A	total	8mer	7mer-m8	7mer-1A					
ISCU	iron-sulfur cluster scaffold homolog (E. coli)	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.44	0.24	2007	Sites in UTR
GIT2	G protein-coupled receptor kinase interactor 2	1	1	0	0	1	0	1	0	hsa-miR-210	-0.43	0.29		Sites in UTR
ZNF462	zinc finger protein 462	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.38	0.24		Sites in UTR
DIMT1L	DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (S. cerevisiae)	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.33	< 0.1		Sites in UTR
FAM116A	family with sequence similarity 116, member A	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.32	0.24	2007	Sites in UTR
ARMC1	armadillo repeat containing 1	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.28	0.24		Sites in UTR
B4GALT5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.27	0.24		Sites in UTR
MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.26	< 0.1	2007	Sites in UTR
KCMF1	potassium channel modulatory factor 1	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.25	< 0.1		Sites in UTR
FAM73B	family with sequence similarity 73, member B	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.23	0.24		Sites in UTR
EFNA3	ephrin-A3	1	0	1	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.19	0.24	2007	Sites in UTR
SYNGAP1	synaptic Ras GTPase activating protein 1 homolog (rat)	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.19	< 0.1	2007	Sites in UTR
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	1	0	0	1	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.18	< 0.1	2007	Sites in UTR
NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	1	0	0	1	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.17	< 0.1	2007	Sites in UTR
MID1IP1	MID1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12 homolog (zebrafish))	1	0	0	1	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.14	< 0.1	2007	Sites in UTR
ELFN2	extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 2	1	0	1	0	1	0	1	0	hsa-miR-210	-0.13	0.43	2007	Sites in UTR
NEUROD2	neurogenic differentiation 2	1	1	0	0	1	0	1	0	hsa-miR-210	-0.11	0.43	2007	Sites in UTR
SCRT1	scratch homolog 1, zinc finger protein (Drosophila)	1	0	1	0	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.09	0.24	2007	Sites in UTR
LOC399947	similar to expressed sequence AI593442	1	0	0	1	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.08	< 0.1	2007	Sites in UTR
C12orf34	chromosome 12 open reading frame 34	1	0	0	1	0	0	0	0	hsa-miR-210	-0.08	< 0.1		Sites in UTR
C15orf52	chromosome 15 open reading frame 52	1	0	0	1	0	0	0	0	hsa-miR-210	0.00	< 0.1		Sites in UTR

図 4-1 miR-210 の標的遺伝子の候補

TargetScan データベースより、miR-210 の標的遺伝子の候補一覧。バージョン 5.2 では miR-210 の標的遺伝子は 21 種類挙げられている。しかし、これら標的遺伝子の候補は全て種間を超えて配列保存性が高いもの (Conserved sites) に限られている。種間での保存性が低い配列 (Poorly conserved sites) を含めると数百種類にもなる。Total context score の値が低いもの遺伝子ほど、標的遺伝子となりうる可能性が高い。

胞は Fe-S クラスタや鉄原子とポルフィリンからなる錯体ヘムの濃度によって細胞内の鉄濃度を感知し、鉄代謝を制御している。そして、鉄代謝調節因子の一つに IRP (iron regulatory protein) がある。IRP には相同性の高い IRP1 と IRP2 が存在し、鉄代謝に重要な遺伝子である、TfR1 やフェリチンなどの mRNA に結合し翻訳制御を行う。TfR1 は細胞内に鉄を取り込む役目を担っているが、その mRNA の 3' UTR に IRE (iron responsive element) を持ち、IRP が結合することで mRNA の分解を防ぎ、翻訳が促進され、細胞内に鉄を多く取り込むようになる。鉄貯蔵に重要なフェリチンは mRNA の 5' UTR に IRE を持ち、IRP が結合すると翻訳が抑制され、貯蔵鉄が減少し、利用可能な鉄が増える (Rouault, 2006)。

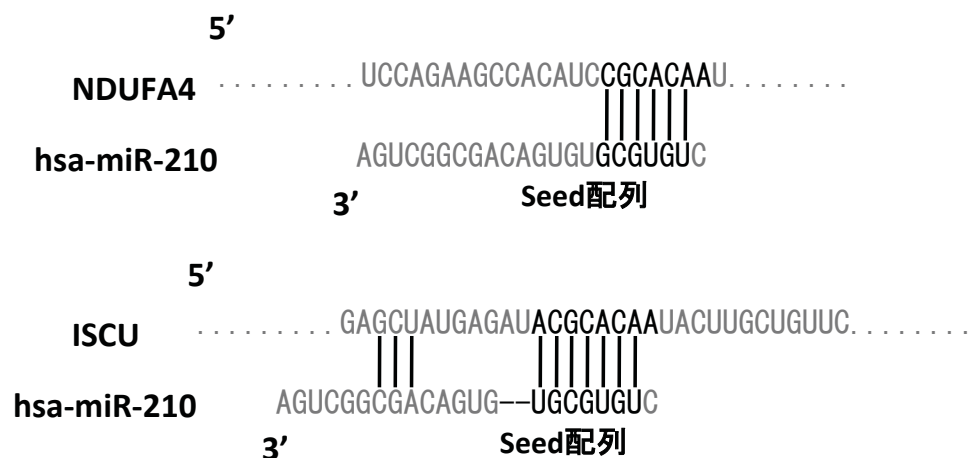


図 4-2 標的遺伝子と miR-210 の結合配列

着目した NDUFA4 (上)、ISCU (下) と miR-210 の予測結合配列を示す。miR-210 の 5'側、2 塩基目から 8 塩基目までは Seed 配列と言われ、標的遺伝子認識に重要な配列とされている。

IRP1 は tricarboxylic acid (TCA) サイクルを構成するミトコンドリアのアコニターゼと 31%の相同性を持ち、Fe-S クラスターと結合することで細胞質アコニターゼとして機能する。つまり通常はミトコンドリアにおけるエネルギー産生を行う役割を果たしているが、鉄欠乏などによる Fe-S クラスターの減少で Fe-S クラスターが IRP1 から外れると、IRE への結合能を持ち、鉄代謝制御因子として働く。ISCU の減少は Fe-S クラスターの減少に繋がり、ミトコンドリアのエネルギー産生の減少かつ IRP1 の IRE 結合活性の上昇を引き起こす (Tong and Rouault, 2006)。このことから、低酸素環境において miR-210 が ISCU の発現を抑制することでミトコンドリアの活動低下を促し解答系によるエネルギー獲得への切り替えを、そして、鉄代謝を調節して細胞内の恒常性を維持していると考えられる。また、NDUFA4 は TCA サイクルで獲得した NADH や FADH₂

を用いてミトコンドリア内膜で ATP を獲得する過程の呼吸鎖複合体を形成する遺伝子の一つである。酸素を利用できる条件下では好気呼吸（電子伝達系）にてエネルギーを獲得しているが低酸素環境下では酸素を必要としない嫌気呼吸に切り替わるのでこれら遺伝子は不要となるため、miR-210 が NDUFA4 の発現を抑制している可能性が考えられる。

4-3-2. 標的遺伝子 3'UTR に対する miR-210 の結合能評価

ISCU と NDUFA4 の 3'UTR に miR-210 が結合して直接発現を抑制するか評価した。各 3'UTR をクローニングし、psiCHECK-2 ベクターのルシフェラーゼ下流に組み込んだベクターを作製した。さらに予想される結合部位に変異を導入、もしくは欠失させたベクターを作製し、結合部位の同定も試みた。MCF7 細胞を用いて、アッセイを行った結果、ISCU と NDUFA4 の mRNA の野生型 3'UTR を組み込んだベクターと miR-210 の模倣合成分子 Pre-miR-210 を細胞に同時に導入した群のルシフェラーゼ活性は同じ野生型 3'UTR を組み込んだベクターと Pre-miR-210 の陰性対照となる Pre-miR-NC を導入した群に比べて、低かった。さらに変異型 3'UTR や予測結合部位欠失型 3'UTR を組み込んだベクターと Pre-miR-210 を導入した群はルシフェラーゼ活性の低下は確認されなかった。これら結果から、miR-210 は ISCU と NDUFA4 の mRNA の 3'UTR に結合し、発現を抑制する可能性を示した（図 4-3）。しかし、NDUFA4 は Pre-miR-210 を MCF7 細胞に導入しても、発現減少が認められなかったことから（図 4-4）、細胞内においては miR-210 が NDUFA4 の発現を

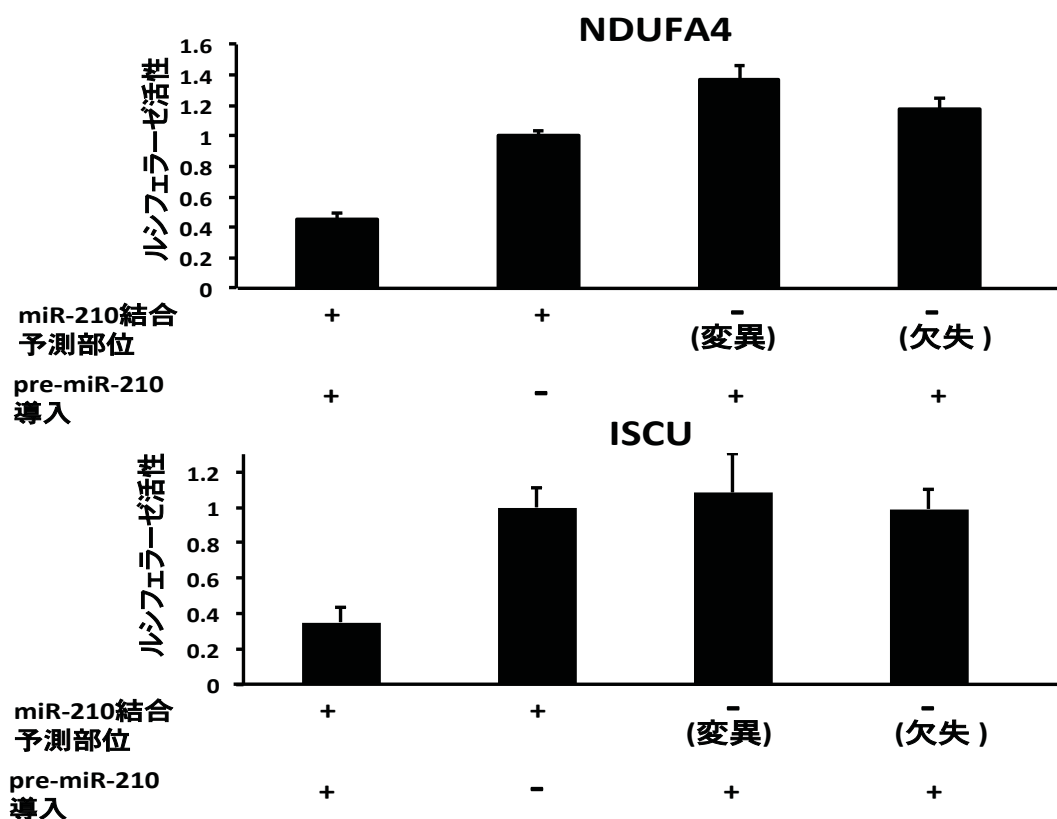


図 4-3 miR-210 の標的遺伝子への結合能評価

NDUFA4（上段）と ISCU（下段）の mRNA 3'UTR と miR-210 の結合能をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。それぞれ、mRNA の 3'UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだベクターを MCF7 細胞に導入した。その際、pre-miR-210 もしくは pre-miR-NC を同時に導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。また、予測結合部位に変異や欠失を導入したベクターも作製し細胞に導入した。“+”は miR-210 の結合予測部位がある野生型、また pre-miR-210 の導入を表している。“-”は miR-210 の結合予測部位に変異や欠失を導入、また pre-miR-210 の代わりに pre-miR-NC を導入したことを表している。

抑制していないと結論した。

4-3-3. miR-210 の発現変化に伴う ISCU の発現変化

miR-210 の発現が上昇する低酸素環境下もしくは鉄欠乏状態において ISCU の mRNA の発現を qRT-PCR 法にて解析した。miR-210 が発現を

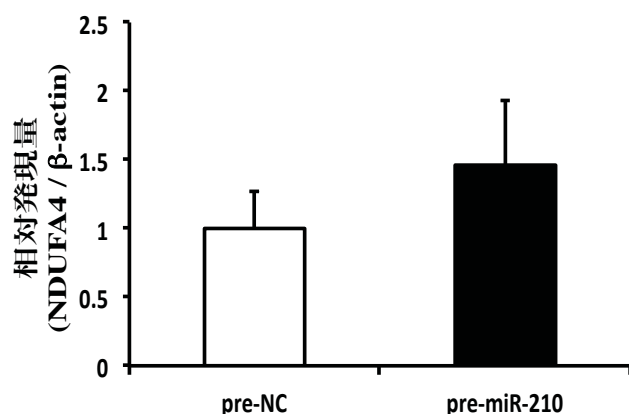


図 4-4 miR-210 過剰発現による NDUFA4 の発現変化
MCF7 細胞に pre-miR-210 もしくは pre-miR-NC を導入して、48 時間後に RNA を抽出し NDUFA4 の発現を qRT-PCR 法にて解析した。内部標準は β -actin を用いた。

抑制するのであれば、標的遺伝子の発現は減少することが予想され、通常酸素下と比べて、両条件下では ISCU の発現は減少した (図 4-5)。さらに Pre-miR-210 を MCF7 細胞に導入し、qRT-PCR 法とウェスタンブロッティング法で発現を確認すると、3 割に減少した (図 4-6)。しかし、Pre-miR-210 を導入した細胞群は、miR-210 の発現がおよそ 1000 倍以上にも上昇することから (図 4-7)、生体内の発現量を反映してないと考え

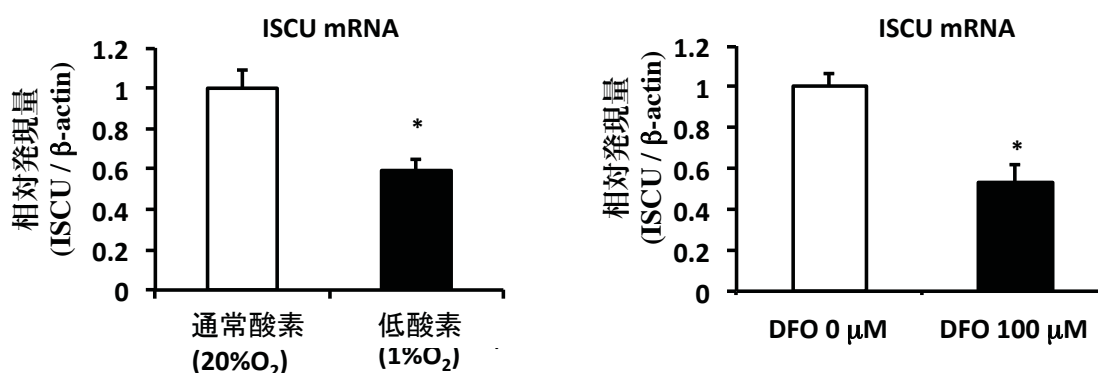


図 4-5 低酸素下と鉄欠乏状態における ISCU の発現

低酸素環境下で MCF7 細胞を 48 時間培養し、ISCU の発現を qRT-PCR 法にて解析した (左)。また、DFO を 100 μ M となるように MCF7 細胞培養液に添加し、48 時間後に ISCU の発現を qRT-PCR 法にて解析した (右)。いずれも、内部標準は β -actin を用いた。*通常の細胞培養群 (20%O₂、DFO 未処理) と比較して $p < 0.05$ 。

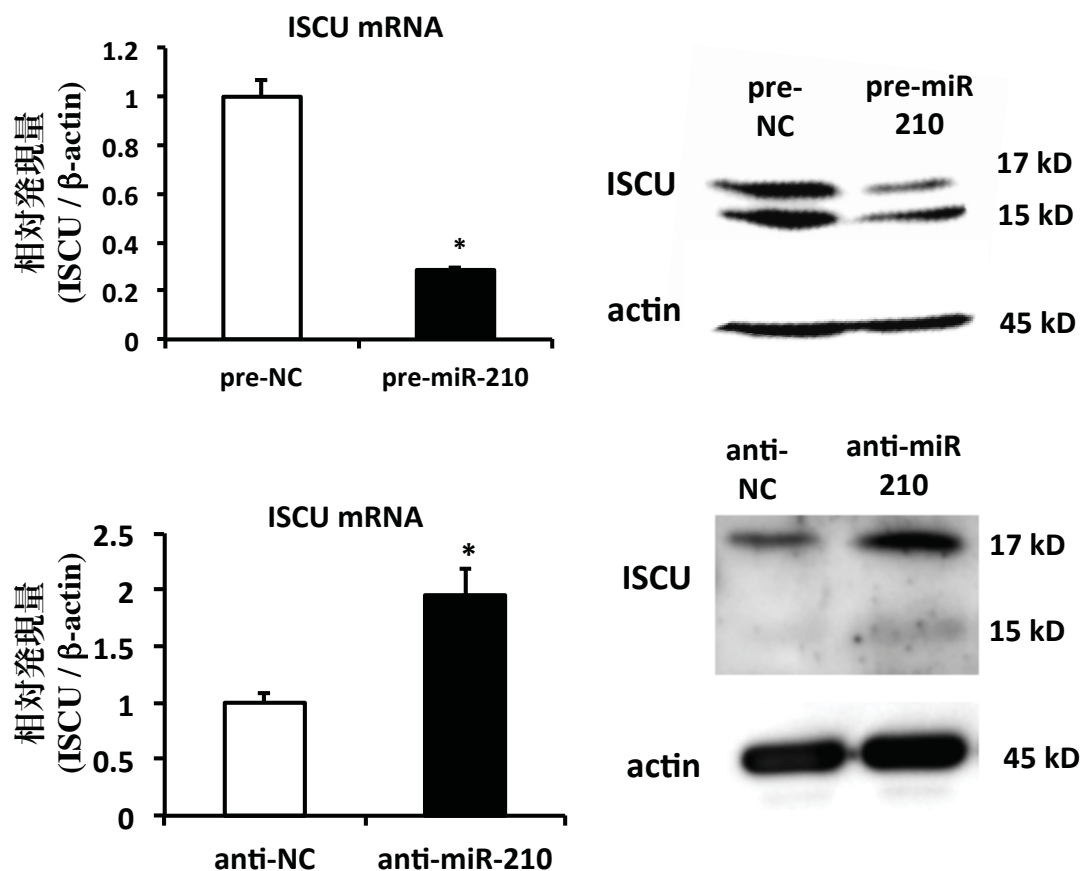


図 4-6 Pre-miR-210 と anti-miR-210 導入による標的遺伝子 ISCU の発現変化

MCF7 細胞に pre-miR-210 (上) と anti-miR-210 (下) をそれぞれ終濃度 100nM で導入し、48 時間後に RNA と蛋白質を回収し、ISCU の発現を qRT-PCR 法およびウェスタンブロット法で確認した。Anti-miR-210 と anti-miR-NC を導入した細胞群は 1%O₂ 条件下で培養した。内部標準は β -actin を用い、ローディングコントロールは actin を用いた。*Pre-miR-NC または anti-miR-NC を導入した細胞培養群と比較して $p < 0.05$ 。

られるため、低酸素環境下において miR-210 の発現を抑制することで ISCU の発現に影響を与えるか確認した。MCF7 細胞に Anti-miR-210 もしくは Anti-miR-NC を細胞に導入後、低酸素環境下で培養し、ISCU の発現を qRT-PCR 法とウェスタンブロット法で確認すると、ISCU の発現はおよそ 2 倍にまで上昇していた (図 4-6)。このとき、miR-210

の発現はおよそ 100 分の 1 にまで低下していた (図 4-7)。以上の結果から、miR-210 は細胞内において ISCU の発現を抑制しており、低酸素環境下や鉄欠乏状態で ISCU 認められる発現減少は miR-210 によるものと結論した。

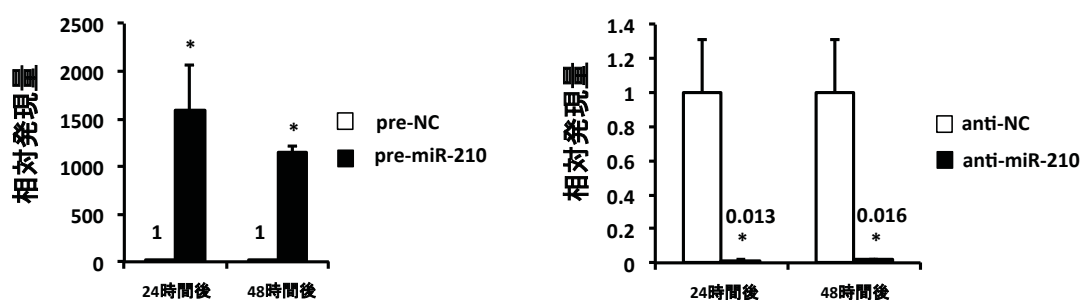


図 4-7 Pre-miR-210 と Anti-miR-210 の導入による miR-210 の発現変化
MCF7 細胞に pre-miR-210 と anti-miR-210 をそれぞれ終濃度 100nM で導入し、24 時間後と 48 時間後の発現 (存在量) を qRT-PCR 法によって解析した。Anti-miR-210 と anti-miR-NC を導入した細胞群は 1%O₂ 条件下で培養した。
*Pre-miR-NC または anti-miR-NC を導入した細胞培養群と比較して p<0.05。

4-3-4. ISCU の発現抑制を介した miR-210 による細胞内鉄代謝制御

miR-210 は ISCU の発現を抑制することが明らかとなったことから、ISCU の発現抑制を介した miR-210 の細胞内の役割を明らかとすることとした。上述したように ISCU は Fe-S クラスターの生合成を調節することで、細胞内の鉄代謝とエネルギー代謝を調節している。腫瘍組織における低酸素環境下は血管から供給される酸素や鉄を含む栄養素が乏しい状態であり、細胞増殖に必要な栄養素が不足している。しかし、がん細胞はそのような状態であるにも関わらず、増殖することから正常細胞とは異なる機能を備えていることが知られている。その一因を担うのが miR-210

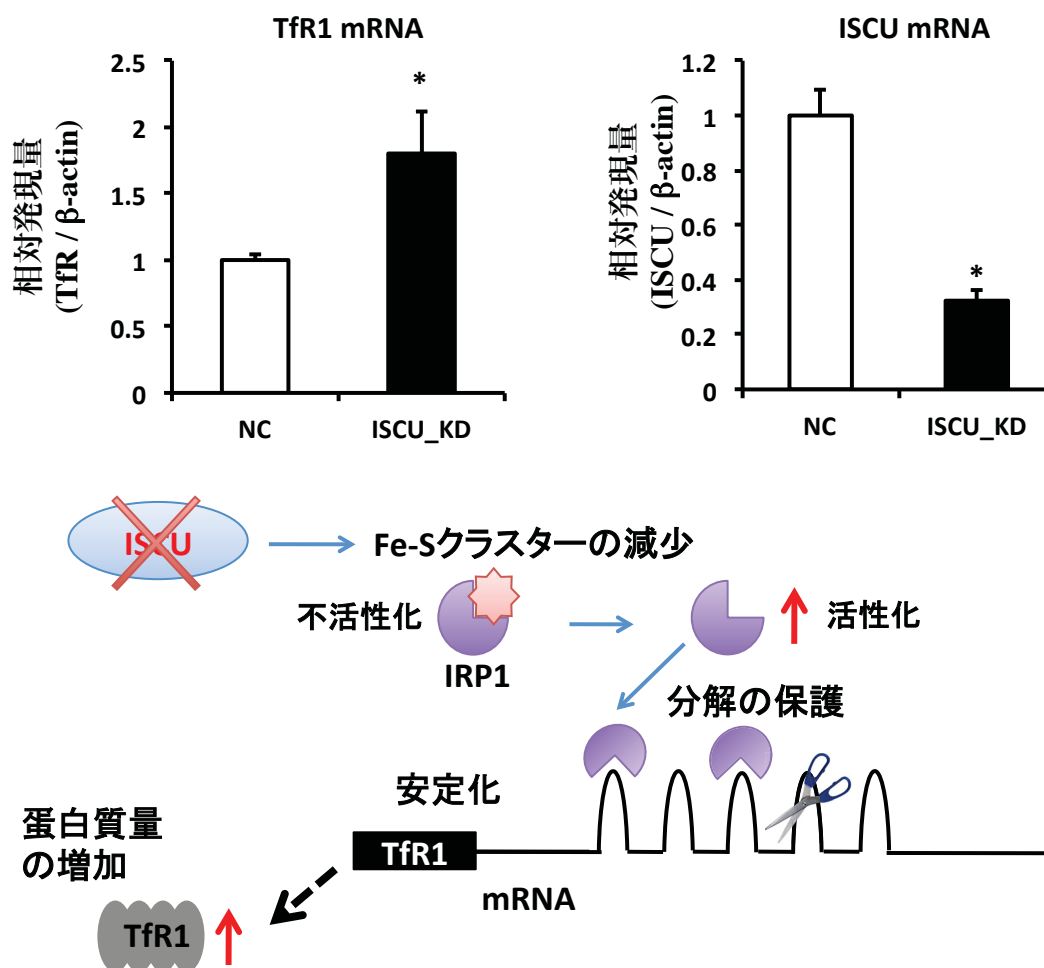


図 4-8 ISCU 発現抑制株における TfR1 の発現解析

MCF7 細胞株に ISCU 発現抑制ベクター-shISCU を導入し、blastcidin による薬剤選択を行い、発現抑制恒常株を作製した。作製した細胞株から RNA を抽出し、TfR1 と ISCU の発現を qRT-PCR 法によって解析した (上段)。内部標準はβ-actin を用いた。NC:ネガティブコントロールスクランブル配列を組み込んだベクターを導入した細胞株。ISCU_KD:ISCU の発現を抑制した細胞株。*スクランブル配列を組み込んだベクターを導入した細胞培養群と比較して $p < 0.05$ 。

下段は ISCU の発現抑制における IRP1 の活性化とそれに伴う TfR1 の発現上昇を図に示した。ISCU の発現抑制は Fe-S クラスターの減少を引き起こし、結果的に IRP1 を活性化させる。活性化した IRP1 は TfR1 の mRNA 3'UTR に結合して、mRNA の分解を防ぎ、TfR1 の発現量を増加させる。(Wing-Hang Tong and Tracey A. Rouault Cell Metabolism 2006)

を介した ISCU の発現抑制にあると考えた。そこで、ISCU の発現抑制を

介した鉄代謝に着目し、すでに報告があるが、ISCU の発現を抑制することで、細胞内への鉄取り込みに重要な TfR1 の発現上昇することを確認することとした。ISCU に対する short hairpin RNA vector (shRNA vector) を作製し、MCF7 細胞株に導入して恒常的に ISCU の発現を抑制した細胞株を樹立後、ISCU の上昇発現を確認した (図 4-8)。この結果からも、miR-210 による ISCU の発現抑制は TfR1 の発現を上昇させ、鉄代謝に関与していると考えられる。そこで、Pre-miR-210 を MCF7 細胞に導入し、ISCU の発現を抑制した状態で、TfR1 の発現を確認した。その結果は TfR1

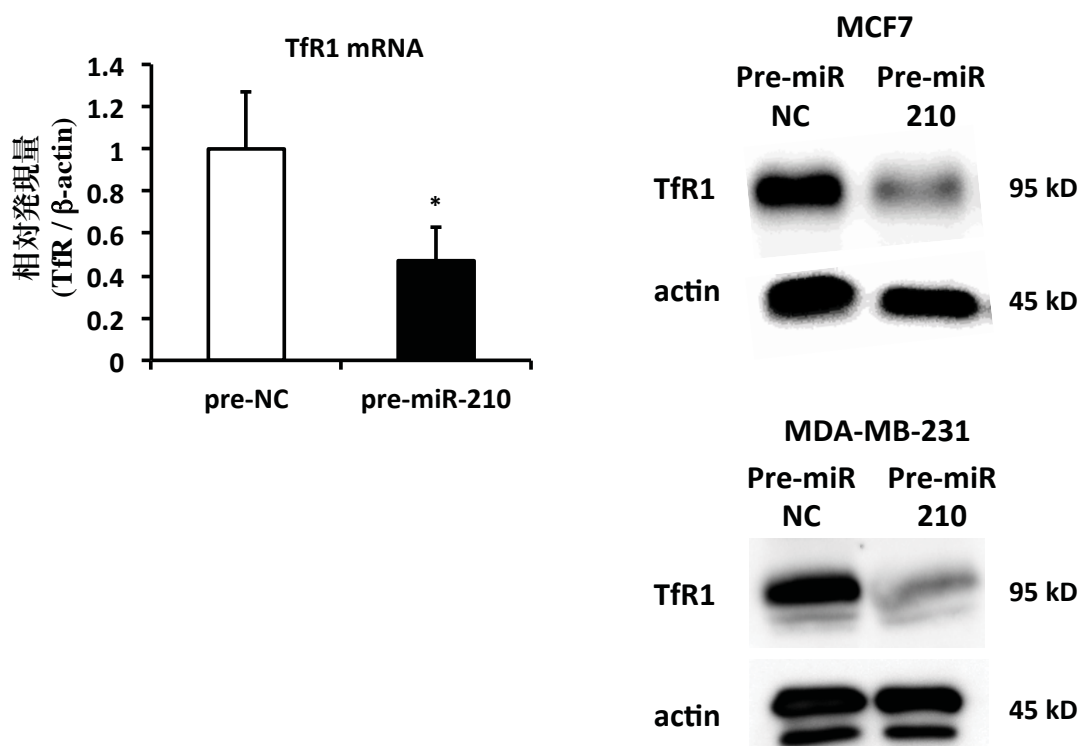


図 4-9 Pre-miR-210 導入細胞における TfR1 の発現解析

MCF7 細胞に pre-miR-210 を導入し 48 時間後に RNA を回収し、qRT-PCR 法により TfR1 の発現を解析した (左)。内部標準は β -actin を用いた。*Pre-miR-NC 導入した細胞培養群と比較して $p < 0.05$ 。同様に pre-miR-210 を MCF 細胞と MDA-MB-231 細胞に導入し、48 時間後に蛋白質を回収し、ウェスタンブロット法を用いて TfR1 の発現を確認した (右)。ローディングコントロールは actin を用いた。

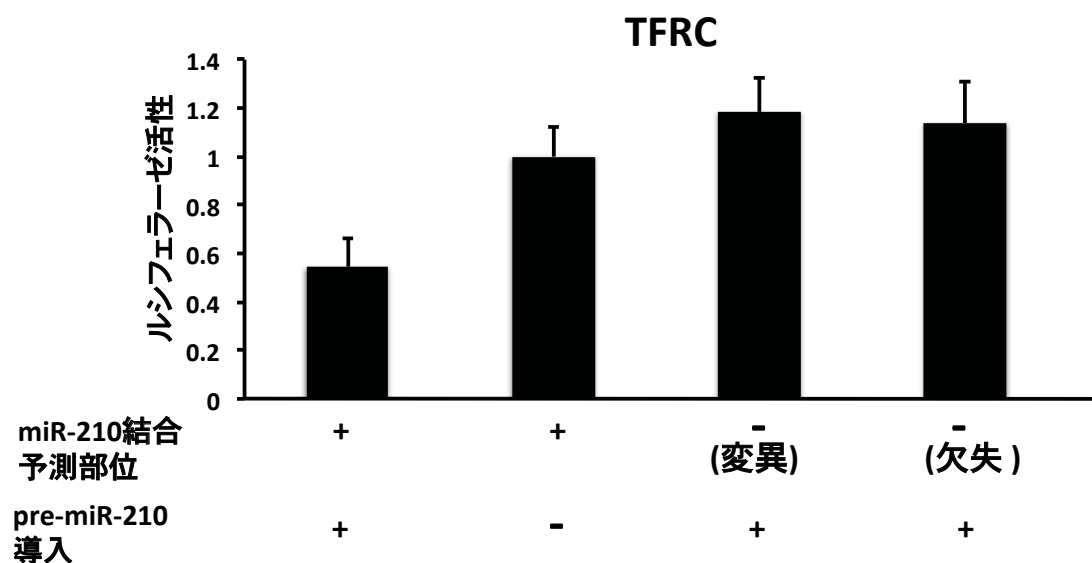


図 4-11 miR-210 と Tfr1 の結合能評価

Tfr1 の mRNA 3'UTR と miR-210 の結合能をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。それぞれ、mRNA の 3'UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだベクターを MCF7 細胞に導入した。その際、pre-miR-210 もしくは pre-miR-NC を同時に導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。また、予測結合部位に変異や欠失を導入したベクターも作製し細胞に導入した。“+”は miR-210 の結合予測部位がある野生型、また pre-miR-210 の導入を表している。“-”は miR-210 の結合予測部位に変異や欠失を導入、また pre-miR-210 の代わりに pre-miR-NC を導入したことを表している。

を過剰発現による、Tfr1 の発現減少が認められるが、この発現減少が細胞の鉄取り込みに影響するか評価した。Pre-miR-210 もしくは Pre-miR-NC を MCF7 細胞と MDA-MB-231 細胞に導入し、Alexa594 を標識したトランスフェリンを培養液中に添加後、その取り込みを免疫染色法とフローサイトメトリーによる解析を行った。免疫染色の結果、両細胞株において Pre-miR-210 を導入した群は Pre-miR-NC を導入した群に比べて取り込まれたトランスフェリンの量が明らかに少なく、Tfr1 の発現も低下していた (図 4-12)。また、フローサイトメーターによる解析の結

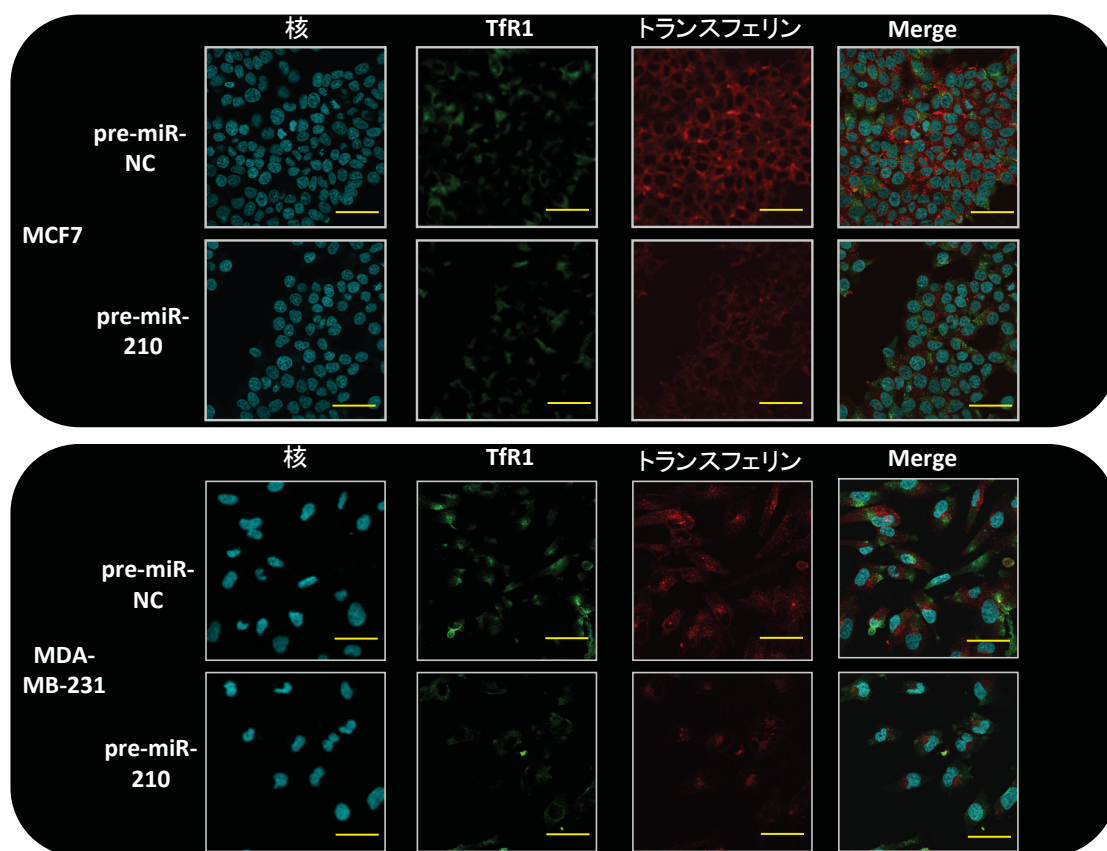


図 4-12 顕微鏡観察によるトランスフェリンの取り込み評価

MCF7 細胞（上段）もしくは MDA-MB-231 細胞（下段）に pre-miR-210 を導入し、48 時間後に Alexa594 標識されたトランスフェリンを終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培養液に添加した。その後、細胞を固定し、抗 TfR1 抗体を用いて TfR1 を染色し共焦点顕微鏡で観察した。スケールバー; 50 μm

果も同様であり、MCF7 細胞株において、Pre-miR-210 を導入した群では TfR1 の発現と取り込まれたトランスフェリンが強陽性の画分の割合は 37.5%であったが、Pre-miR-NC を導入した群において、同画分はおよそ 2 倍の 69.4%であり、miR-210 の過剰発現は TfR1 の発現抑制を引き起こし、トランスフェリンの取り込みを阻害した（図 4-13）。

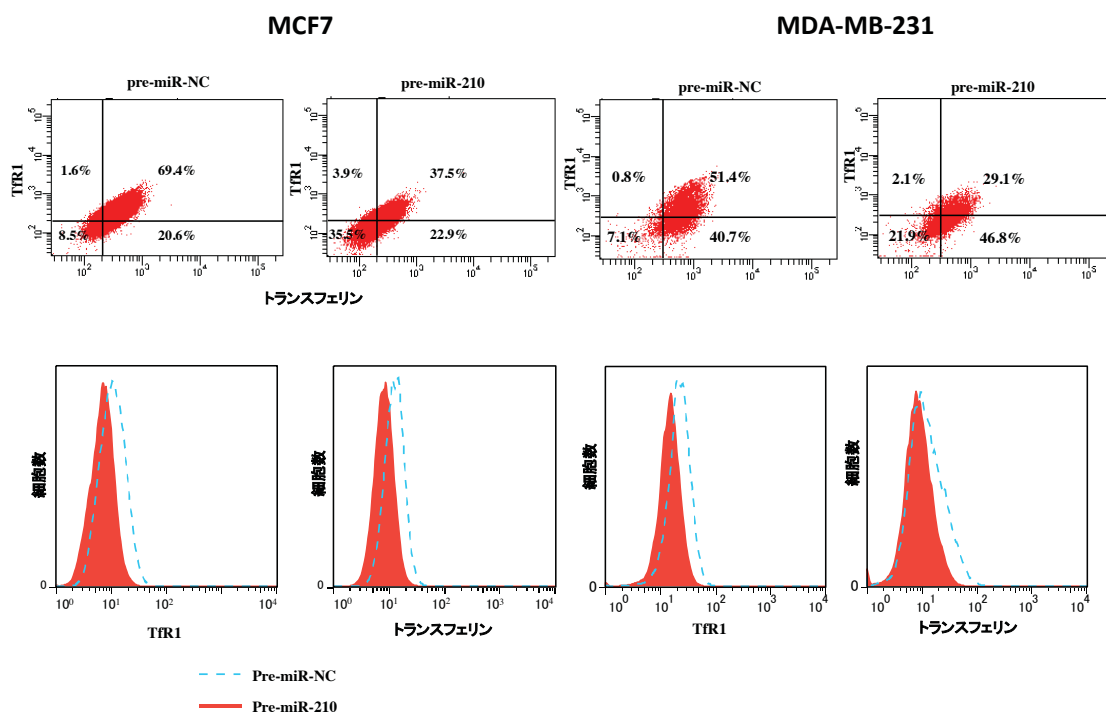


図 4-13 フローサイトメーターによるトランスフェリンの取り込み評価
MCF7 細胞（左）もしくは MDA-MB-231 細胞（右）に pre-miR-210 を導入し、48 時間後に Alexa594 標識されたトランスフェリンを終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培養液に添加した。その後、抗 Tfr1 抗体を用いて Tfr1 の発現とトランスフェリンの取り込みを解析した。

4-3-6. miR-210 の発現変動による IRP1 の活性変化

mi-210 が Tfr1 も標的遺伝子としていることから、ISCU の発現変化に伴う IRP1 の活性変化を確認することができなかつたため、Tfr1 以外に IRP1 によって発現が調節されているフェリチンの発現を解析した。なお、フェリチン遺伝子の mRNA の 3'UTR には miR-210 の予測結合部位は存在しない。MCF7 細胞に Pre-miR-210、もしくは Anti-miR-210 を導入し、

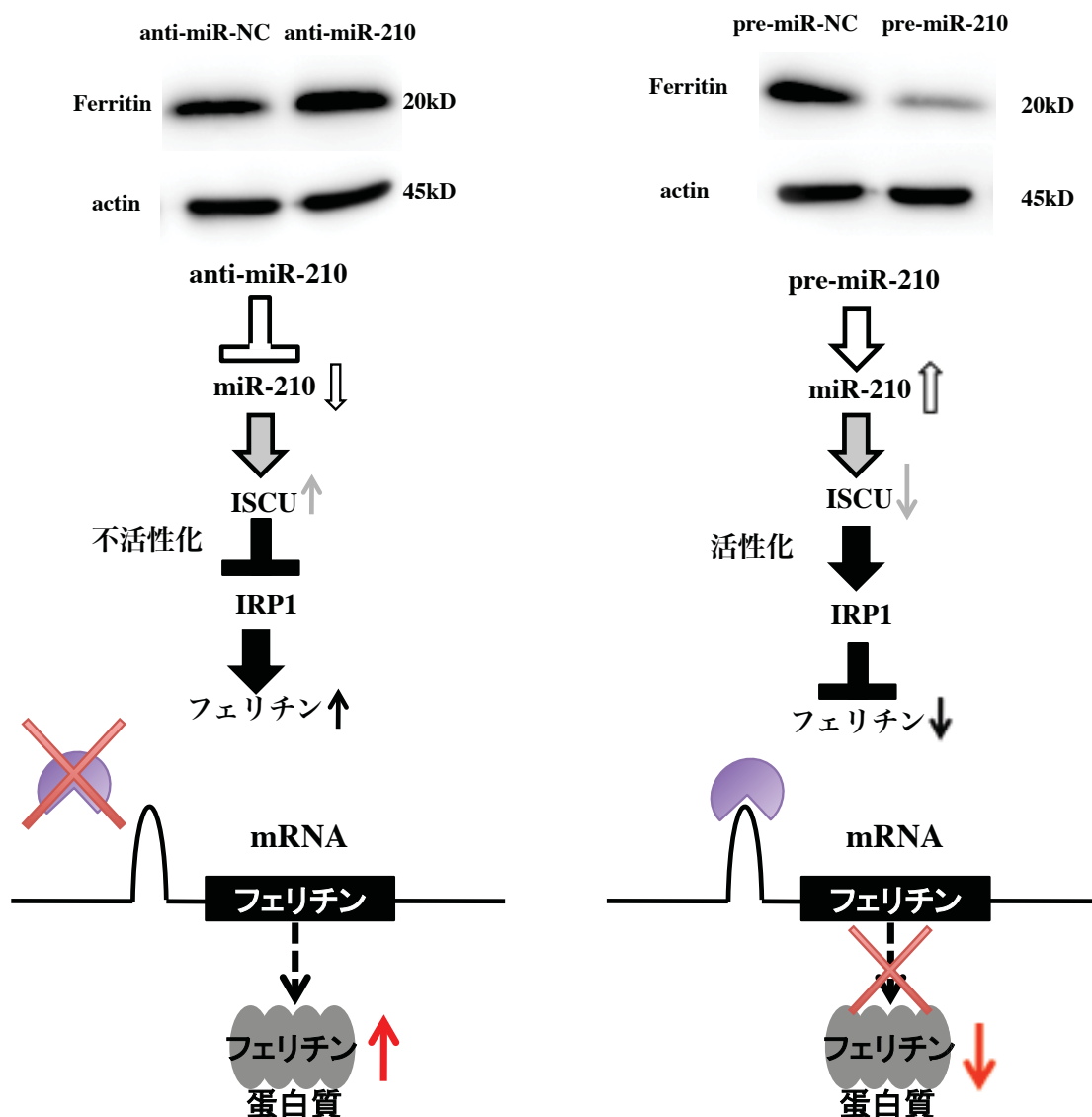


図 4-14 フェリチンの発現解析による IRP1 の活性評価

MCF7 細胞に pre-miR-210 (右) もしくは anti-miR-210 (左) を導入し、48 時間後に蛋白質を回収し、フェリチン蛋白質の発現を解析した。anti-miR-210 を導入し細胞群は 1%O₂ 条件下で培養した。それぞれ下段は IRP1 とフェリチン蛋白質の模式図を表している。anti-miR-210 を導入することで、ISCU の発現が増加するため、IRP1 は不活性化しフェリチン mRNA の 5'UTR に結合できなくなるため、フェリチン蛋白質の発現は上昇する (左)。一方 pre-miR-210 を導入することで ISCU の発現が減少するため、IRP1 は活性化しフェリチン mRNA の 5'UTR に結合してフェリチン蛋白質の翻訳を阻害する (右)。

に添加した。その後、抗 TfR1 抗体を用いて TfR1 の発現とトランスフェリンの取り込みを解析した。

フェリチンの蛋白質発現をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、Pre-miR-210を導入すると ISCU の発現が減少し、IRP1 の活性が上昇するため、フェリチンの発現が減少した (図 4-14)。一方で、Anti-miR-210 を導入すると、ISCU の発現が上昇し、IRP1 の活性が低下するため、フェリチンの発現が上昇した (図 4-14)。これら結果から、miR-210 は ISCU の発現を抑制することで、間接的に IRP1 の活性を制御し、鉄代謝を制御していることが示唆された。

4-3-7. miR-210 の発現抑制における鉄代謝制御

Pre-miR-210 を導入することで、細胞には通常の 1000 倍もの miR-210 が存在する (図 4-7)。この量は低酸素環境下や鉄欠乏状態に発現誘導される miR-210 の 100 倍以上にあたる。つまり、Pre-miR-210 を導入した細胞群では通常の生体内では起こらない反応が起きている可能性がある。そこで、低酸素環境下において Anti-miR-210 を用いて、miR-210 の発現を抑制することで、生体内においてどのような役割を果たすか解析した。Anti-miR-210 を導入すると、ISCU の発現は上昇し (図 4-6)、IRP1 の活性は低下することが、予想される。その結果、TfR1 の発現は減少し、フェリチンの発現は上昇することが考えられる。しかし、miR-210 は TfR1 も標的遺伝子とすることから、Anti-miR-210 を導入することで TfR1 の発現は上昇する経路も存在する。このように TfR1 の発現に関しては相反する経路が存在しており、生体内における miR-210 の働きを解析するため、低酸素環境下において Anti-miR-210 を MCF7 細胞に導入し、TfR1

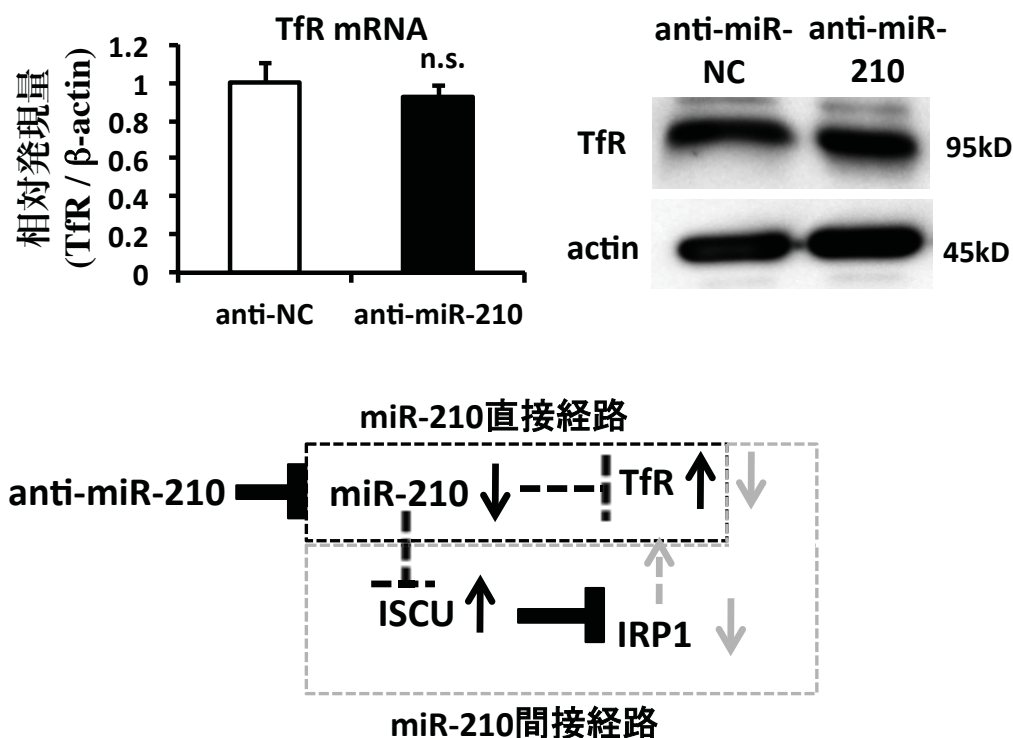


図 4-15 miR-210 の発現抑制による TfR1 の発現変化

MCF7 細胞株に anti-miR-210 を導入し、1%O₂ 条件下で 48 時間培養し、RNA と蛋白質を抽出した。qRT-PCR 法 (右) とウェスタンブロット法 (左) を用いて TfR1 の発現解析を行った (上段)。しかし、mRNA、蛋白質ともに発現変化は認められなかった。この結果は miR-210 が直接 TfR1 の発現を微調節する経路と IRP1 の活性を調節し TfR1 の発現を調節する相反する経路が存在することが原因だと考えられる (下段)。n.s.; 有意差なし。

の発現を解析した。その結果、Anti-miR-210 と Anti-miR-NC を導入した細胞群を比較しても mRNA、蛋白質量ともに発現に差は認められなかった (図 4-15)。この結果から miR-210 の TfR1 に対する発現制御は正 (間接経路) と負 (直接経路) の調節が存在し、さらに両方の発現制御は均衡を保っていると考えられる。そこで、ISCU の発現を抑制した MCF7 細

胞株を用いて、Anti-miR-210 の効果を確認した。この細胞株を用いた理由は、Anti-miR-210 による ISCU の発現上昇に伴う TfR1 の発現減少を打ち消すため、miR-210 が直接 TfR1 の発現を制御する経路のみを考えることができるからである (図 4-16)。Anti-miR-210 をこの細胞株に導入し、ウェスタンブロッティング法で TfR1 の発現を確認した (図 4-17)。コントロール群としてスクランブル配列を導入した細胞群では、anti-miR-210 の発現に変化は認められなかったが、ISCU の発現を抑制した細胞群では anti-miR-210 を導入すると TfR1 の発現上昇が認められた。つまり、miR-210 は生体内においても TfR1 の発現を直接制御していることが示された。さらに、直接経路の存在を証明するため、MCF7 細胞に IRP1 に対する siRNA を導入し、IRP1 の発現を抑制し、同様の実験を行った。IRP1 に対する siRNA を導入した細胞群において、さらに anti-miR-210 を導入した細胞群は anti-miR-NC を導入した細胞群に比べて TfR1 の発現上昇が認められた (図 4-16)。しかし、コントロール siRNA を導入した細胞群においては、anti-miR-210、anti-miR-NC のいずれを導入しても TfR1 の発現に変化はなかった。この実験結果からも、miR-210 が生体内において、直接 TfR1 の発現を制御することが示唆された。

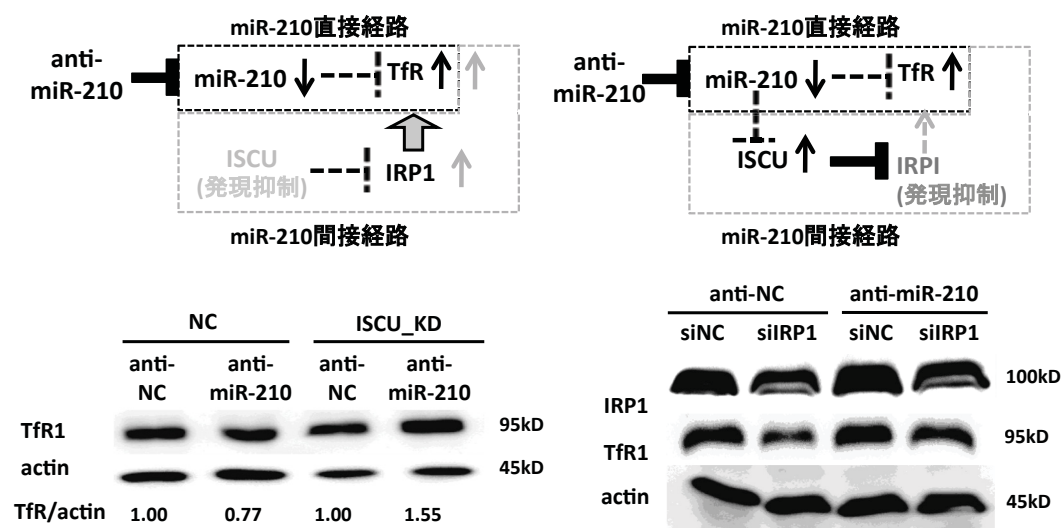


図 4-16 ISCU もしくは IRP1 の発現抑制かつ miR-210 の発現抑制に伴う Tfr1 の発現変化

ISCU の発現を恒常的に抑制した MCF7 細胞株 (左) と siRNA を用いて IRP1 の発現を抑制した MCF7 細胞 (右) に anti-miR-210 をそれぞれ導入し、Tfr1 の発現をウェスタンブロット法にて確認した (下段)。上段は Tfr1 の発現に対するそれぞれの経路を模式図とした。

4-4. 考察

前章では、miR-210 の発現制御が主に HIF-1 α によって行われていることを明らかにし、その結果を考慮して、本章では miR-210 が鉄代謝関連遺伝子 ISCU と Tfr1 の発現調節を行うことを明らかにした (図 4-17)。ISCU のみならず Tfr1 の発現も調節する理由を考察する。低酸素環境下では miR-210 は ISCU の発現を抑制し、その結果、Fe-S クラスターの減少に伴いアコニターゼが IRP1 として機能すると同時に、アコニターゼ活性が減少しミトコンドリアの機能低下に伴いエネルギー代謝が解糖系へ移行する。また、細胞内では IRP1 による鉄代謝調節が行われるが、同時に

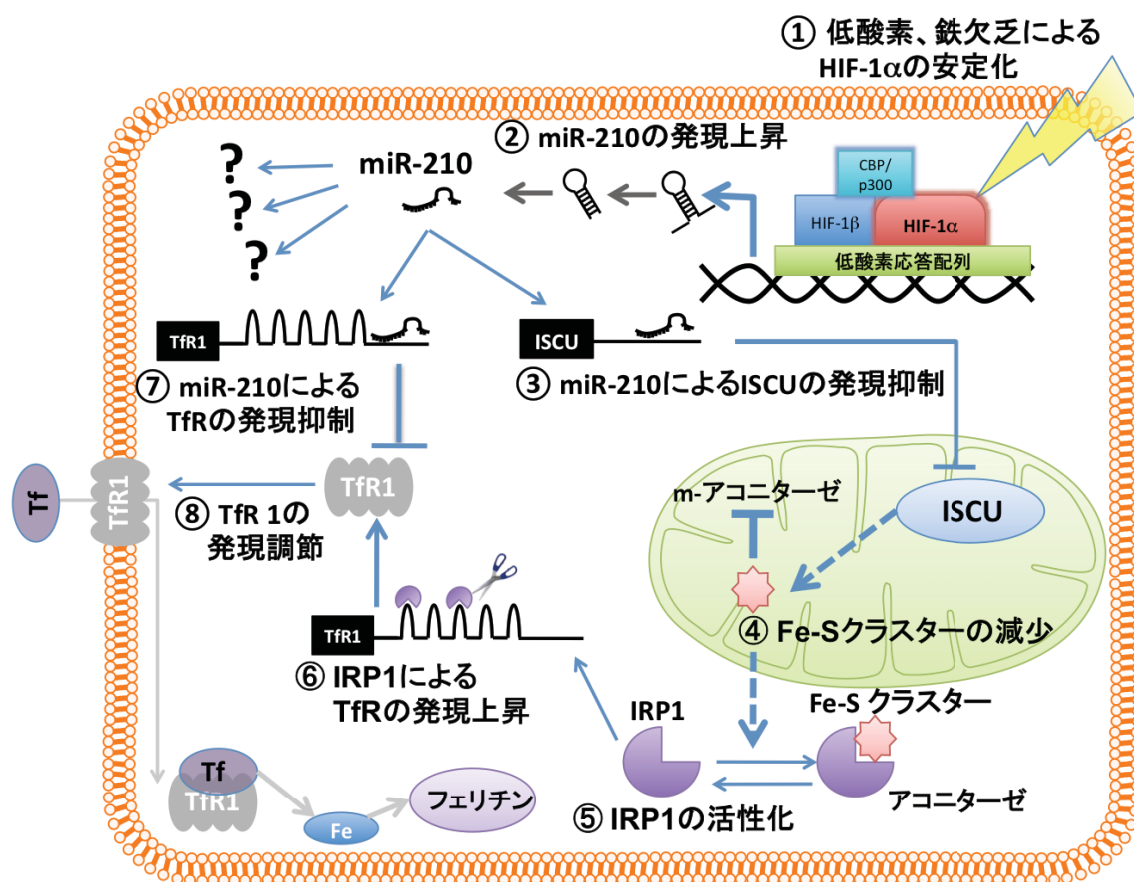


図 4-17 miR-210 による鉄代謝調節機構

①低酸素、または鉄欠乏時に HIF-1αは分解を免れ、転写因子として機能し、解糖系に必要な遺伝子や血管新生関連遺伝子、造血因子、そして鉄代謝関連遺伝子の発現を誘導して低酸素適応を担う。②miR-210は HIF-1 によって発現が誘導される。③発現が上昇した miR-210 が標的遺伝子である ISCU の 3' UTR に結合して翻訳を抑制する。④ISCU の発現が減少した結果、Fe-S クラスターの産生量が減少する。⑤ Fe-S クラスターの減少は鉄代謝調節因子 IRP1 を活性化させる。Fe-S クラスターが十分に存在する時、IRP1 は Fe-S クラスターと結合し、アコニターゼとしてエネルギー代謝に関与する。⑥IRP1 が活性化し、TfR1 の mRNA の 3' UTR に結合して、分解を防ぎ、TfR1 の発現量が増加する。⑦miR-210 は標的遺伝子である TfR1 の 3' UTR に結合して翻訳を抑制する。⑧miR-210 は ISCU の発現を抑制することで間接的に TfR1 の発現を増加するが、直接 TfR1 の発現を抑制する経路も持つ。また、TfR1 は HIF-1αにより発現が誘導される。低酸素や鉄欠乏といった周囲の環境変化により miR-210 の発現量が増加し、TfR1 の発現量の維持や微調整を行う。

miR-210 が TfR1 の発現を微調整し、細胞内の鉄濃度が過剰にならないが、

細胞増殖に必要な鉄量は確保しているのではないかと考えている。このように **miR-210** の発現量は、周囲の環境に合わせて変化し、細胞にとって最適な状態を作り出し、細胞の生存に有利に働いていると考えられる。しかし、今回はがん細胞のみの解析結果となっており、正常細胞でも同じような現象が起きているのかは不明である。特に、マウスの赤血球造血に関与することが小坂によって示唆されているが、**TfR1** の 3'UTR に **miR-210** が結合しうる予測配列はヒトとチンパンジーには存在するが、マウスをはじめ、ラットやイヌなどのほ乳類ですら、予測結合配列が存在しなかった (図 4-18)。そこで、マウス乳がん細胞株 4T1 細胞に **pre-miR-210** を導入し、**ISCU** と **TfR1** の発現を **qRT-PCR** 法で解析したところ、**ISCU** の発現減少は有意に認められたものの、**TfR1** の発現に関しては有意に上昇していた (図 4-19)。この結果は、**ISCU** の発現抑制に伴う **TfR1** の発現増加を捉えたと考えられる。つまり、今回得られた結果をマウスに還元し、マウスの赤血球造血を考えるには注意が必要である。マウスでは **miR-210** の発現上昇に伴い鉄の取り込みが促進される可能性があり、マウス赤血球造血の過程で **miR-210** の発現が上昇することにより、**TfR1** の発現を上昇させ、成熟化に向けて鉄を赤血球内取り込んでいるのではないかと推測される。

また、低素環境における **miR-210** 機能を考えた時に、ミトコンドリアのエネルギー産生に関わる **NDUFA4** を標的遺伝子の候補に挙げたが、**miR-210** が 3'UTR に結合しうることは明らかにしたが、生体内での発現変化が認められなかったため、除外した。**NDUFA4** の発現変化が認めら

れなかった理由としては、解析した MCF7 細胞において NDUFA4 の発現が元々低いことが挙げられる。正確な量的関係を述べることは本研究からは難しいが、qRT-PCR の解析結果を参考にすると β -actin に比べて 1000 倍～5000 倍程度発現が低いのではないかと思われる。しかし、結合しうると結論付けた 3'UTR アッセイにおいては、NDUFA4 の 3'UTR を繋いだルシフェラーゼ遺伝子は T7 プロモーターの下流に存在し、発現量が生体内の内因性 NDUFA4 とは比較できないほど発現していることが伺える。つまり、標的遺伝子の発現量が低ければ、miRNA の発現制御を受けにくい可能性があるということであり、量的関係を考慮しなければならないといけないうだろう。

miR-210の結合部位

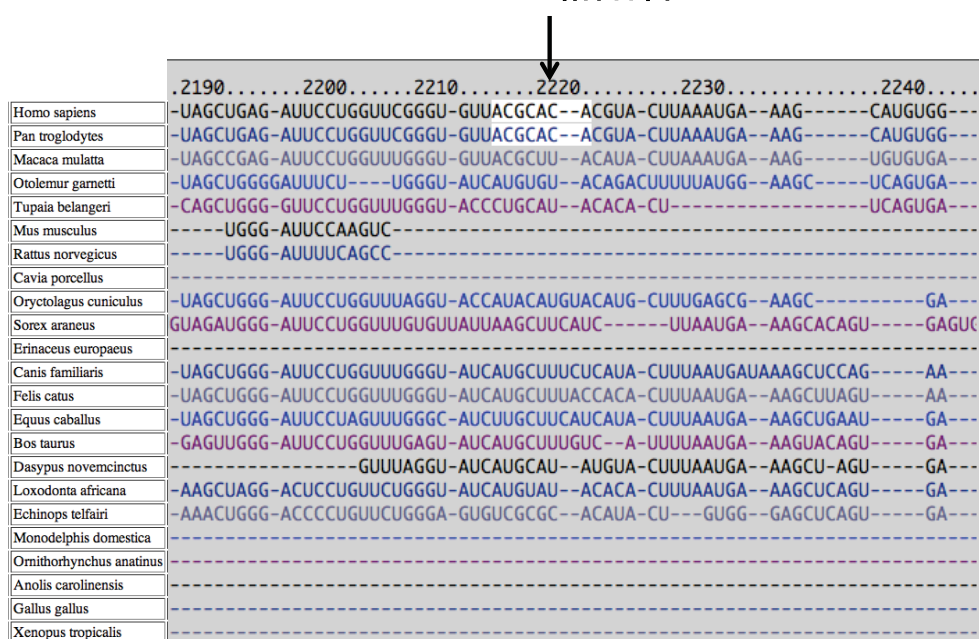


図 4-18 種間における Tfr1 と miR-210 の予測結合部位

様々な種における miR-210 と Tfr1 の mRNA の予測結合部位を白抜きで示した。ヒトとチンパンジーにしか、この配列は存在しない。(TargetScan より引用)

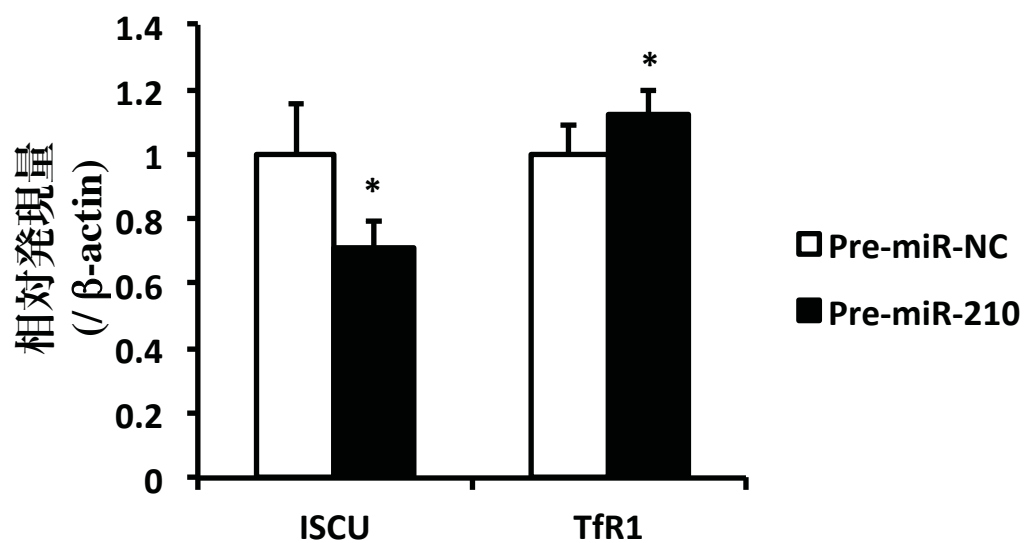


図4-19 マウス乳がん細胞株4T1細胞を用いたmiR-210の標的遺伝子の発現解析

マウス乳がん細胞株4T1細胞にPre-miR-210を導入し、48時間後にRNAを抽出、ISCUとTfR1の発現をqRT-PCR法を用いて解析した。内部標準は β -actinを用いた。*Pre-miR-NC導入した細胞培養群と比較して $p < 0.05$ 。

[第 5 章] 細胞が分泌する小胞

5-1. 序論

1983 年、Johnstone らは脂質二重膜構造を有する 100nm ほどの小胞が細胞から分泌されることを発見し (Pan and Johnstone, 1983)、その小胞は「Exosome」と名付けられた (Johnstone *et al.*, 1987)。しかし、当時、Exosome は細胞から分泌されるゴミ袋 (garbage bags) として、細胞内、細胞膜の余分なタンパク質を細胞外に捨てる役割だと考えられていた。彼女らはヒツジの赤血球成熟過程において、網状赤血球がヘモグロビン合成時には必要であったトランスフェリンレセプターを細胞外に排出することを発見し、Exosome は不要になったものを排出する役割があると結論付けたためである。しかし、のちに Exosome はゴミ袋ではなく、機能を持つ小胞であることが免疫学を中心に分かってきた (Raposo *et al.*, 1996, Bobrie *et al.*, 2011)。さらに Exosome には miRNA が含まれることを 2007 年に Valadi らが報告したことを契機に (Valadi *et al.*, 2007)、Exosome 研究が活気づいた。

5-2. 細胞外小胞の歴史と呼び名

Johnstone らによる Exosome の発見は 1983 年であるが (名付けられてのは 1987 年)、それ以前に Ronquist らが Protasome という 40~500nm ほどの大きさで脂質二重膜構造を有する細胞外小胞を発見している

(Ronquist and Hedström, 1977)。Prostosome は前立腺上皮細胞から分泌され、酸性下における精子の保護と運動能獲得に寄与していると現在は考えられている。また、このような細胞外小胞には様々な呼び名が付けられており、microvesicle、ectosome、microparticle、shedding vesicle、そして exosome と様々な呼び名があり、時には同じものを指していることがあるが、由来する細胞や粒子径、分泌経路などの曖昧な定義付けで区別されることもあり、非常に困惑する現状である。その背景には様々なグループが個別に研究を進めてきたことがある。さらに Exosome とは RNA 分解酵素複合体を指す名称でもあり、全く別の物と呼び名が同じであることは非常に困惑する。そこで、2011 年、新たに国際学会 ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) が設立され、とりあえず Extracellular vesicles (細胞外小胞) という呼び名で統一を図ろうとしている。今後、様々な定義もこの学会で決められ、体系化される可能性があるが、本研究では現在推奨されている Extracellular vesicles (EVs) という呼び名を使用し、100nm 前後の小胞を指すこととする。

5-3. EVs の分泌機構

EVs の分泌経路は以下のような経路が提唱されている (Raposo and Stoorvogel, 2013)。まず、エンドサイトーシスによって形成されたエンドソームの内側で出芽するように形成される膜小胞、intraluminal membrane vesicle (ILV) を多数含む multivesicular body (MVB) が細胞膜と融合して細胞外へ放出される ILV が Exosome とされている。さ

らに前述した *microvesicle*、*shedding vesicle* と呼ばれる類いのものは細胞膜からちぎれるように放出される小胞とされているが、まだ解明には至っておらず、分泌経路の明確な区分が難しく、分泌機構の詳しい解析は今後の研究に期待される。しかし、いくつか分泌に関わる因子が報告されている。一つは、 Ca^{2+} であり、赤白血病細胞株 **K562** と肥満細胞において細胞内の Ca^{2+} 濃度が増加すると EVs の分泌が引き起こされることが報告されている (Savina *et al.*, 2003, Raposo *et al.*, 1997)。さらに分泌には多くの分子の関与が示唆されている。特に ILV の形成に関与する *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) 複合体のコンポーネント蛋白質や Alix などが EVs の分泌に関わることが報告されている (Géminard *et al.*, 2004, Baietti *et al.*, 2012, Tamai *et al.*, 2010) しかし、この ESCRT 複合体による経路は EVs の分泌に必要ないという報告もある (Trajkovic *et al.*, 2008)。この報告では脂質セラミド産生酵素 *neutral sphingomyelinase 2* (nSMase2) が EVs の分泌を制御することを明らかにしている。他にもいくつかの GTP 変換酵素の Rab ファミリー遺伝子が分泌に関わっており、Rab11、Rab27a、Rab27b、Rab35 などが EVs の分泌に関与していることが報告されている (Savina *et al.*, 2002, Ostrowski *et al.*, 2010, Hsu *et al.*, 2010)。このように多くの分子や因子が関与することで EVs は産生、分泌されることが明らかになってきたが、全容解明には至っていない。

5-4. EVs と miRNA

上述したように EVs 研究をさらに活気づけた報告が、EVs の中に miRNA が含まれる、というものであった。2007 年に Valadi らはマウス肥満細胞株 MC/9 とヒト肥満細胞株 HMC-1 由来の EVs に RNA が含まれること、さらにマイクロアレイを用いて MC/9 細胞由来 EVs に約 1300 種類の mRNA と 121 種類の miRNA が含まれることを報告した (Valadi *et al.*, 2007)。彼らは EVs に含まれる RNA が細胞間を移動することを証明するために、MC/9 細胞株由来の EVs、つまりマウス由来の EVs をヒトの細胞株である HMC-1 細胞に添加し、タンパク質の発現を二次元電気泳動法と質量分析法で解析した。その結果、HMC-1 細胞内にマウスのタンパク質の存在が認められた。そのうち 3 つのタンパク質については MC/9 細胞株由来の EVs には含まれていないが、それらの mRNA はマイクロアレイで検出されていたものであった。つまり、供与側の MC/9 細胞由来の mRNA が EVs で運ばれて、受容側の HMC-1 細胞内で翻訳された可能性を示している。彼らは「mRNA」の細胞間移動は示したが、「miRNA」の細胞間の移動や移動した miRNA の機能を示していなかった。

EVs に含まれる miRNA が「ゴミ」であるのか、それとも細胞間を移動し、受容側の細胞で機能するものなのか、これに関しては 2010 年、同時期に 3 本の論文が報告された。まず、Pegtel らは EBV (Epstein-Barr Virus) に感染したリンパ芽球様細胞株 LCL と EBV に感染していない単球由来の樹状細胞を非接触型共培養し、EVs が細胞間を移動することを確認した。その結果、EBV に感染していない単球由来の樹状細胞において、EBV がコードする miRNA が検出され、標的遺伝子の発現を抑制し、機能してい

ることを明らかにした (Pegtel *et al.*, 2010)。また、Zhang らはヒト単球系細胞株 THP-1 が LPS や過酸化水素などの外部の刺激に反応して miR-150 を特異的に EVs 内に封入して細胞外に分泌し、それが血管内皮細胞株 HMEC-1 の細胞内に取り込まれることを明らかにした。その結果、取り込んだ EVs 中の miR-150 が c-Myb の発現を抑制することで、遊走能を上昇させることを示した (Zhang *et al.*, 2010)。小坂らは EVs を介した miRNA の機能を証明するため、前立腺がんの細胞増殖を抑制することがすでに報告されている miR-146a (Lin *et al.*, 2008) を用いて研究を行った (Kosaka *et al.*, 2010)。まず、miR-146a をヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 とアフリカミドリザル腎由来細胞株 COS-7 細胞内で強発現させると、強発現させた miR-146a は細胞内のみならず培養上清中においても存在量が増加することを明らかにした。次いで、COS-7 に miR-146a を強発現させ培養上清を回収し、回収した培養上清を前立腺がん細胞株 PC3M に添加すると細胞の増殖抑制効果を示し、miR-146a の標的遺伝子の一つである ROCK1 の発現減少が認められた。以上の結果から、細胞から分泌された miRNA は、細胞間を移動し、受容側の細胞内でも機能することが証明された。さらに小坂らは細胞が miRNA を分泌する機構についても同時に報告している。この時、分泌された miRNA は EVs に含まれることが判明したので、EVs の分泌経路との関連を調べた。EVs の分泌経路にはエンドソーム内部小胞形成や細胞質分裂時に選別輸送、細胞膜切断を行う複合体 ESCRT が関与する経路が知られており、この経路に関与している Alix タンパク質の発現を (Hurley *et al.*, 2010)、siRNA を用い

て抑制した。しかし、miRNA の分泌量に変化はなく、この経路は miRNA の分泌に関与していない可能性が示された。一方で、上述した細胞膜に存在する脂質の一つであるセラミドを産生する酵素である、nSMase 2 が EVs の分泌に関わるという報告もあることから (Trajkovic *et al.*, 2008)、siRNA を用いて nSMase 2 の発現を抑制、もしくは酵素活性阻害剤 GW4869 を添加したところ、分泌される miRNA の量が減少した。また、細胞内における発現に変化は見られなかったことから、miRNA の分泌にのみ関与していることが示唆された。しかし、この酵素の活性を阻害しても完全に分泌がなくなるわけではなく、他の経路や遺伝子が関与している可能性があり、今後の研究が待たれる。

5-5. EV マーカー蛋白質

EVs に miRNA が含まれることが分かったのは近年であり、EVs 発見当初は EVs に含まれる蛋白質に注目が集まっていた。特に、EVs に共通に含まれる EV マーカーと言われる蛋白質は、EVs の存在を証明する一つの証拠として用いられてきた。しかし、含まれる蛋白質の種類は多く (図 5-1)、1 種類の細胞が分泌する EVs から 100 種類以上もの蛋白質が検出されるため、EVs マーカーと言われるものの種類は多い。また、それらマーカーがどのような細胞から得られた EVs にも含まれるかを詳しく解析した報告はない。

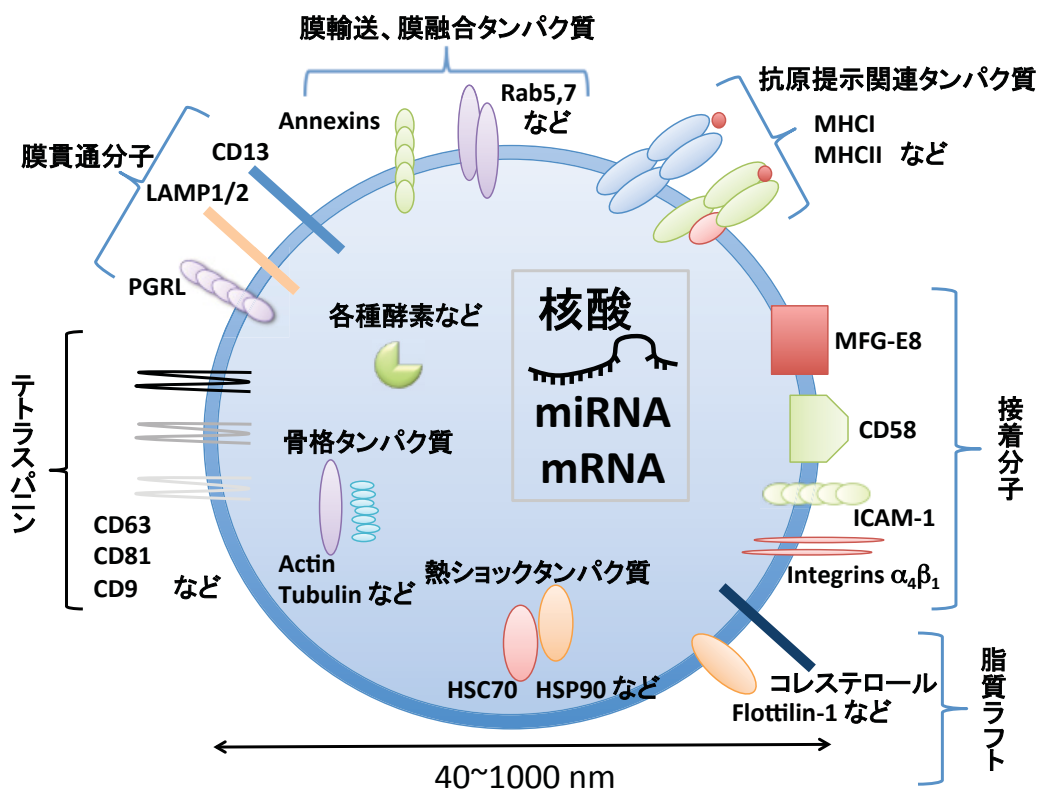


図 5-1 EVs に含まれる蛋白質

EVs には多くの蛋白質が含まれ、代表的な蛋白質にはテトラスパニンファミリーや熱ショック蛋白質、接着分子、抗原提示関連蛋白質など多種多様な蛋白質が含まれている。

[第 6 章] Extracellular vesicles に含まれる蛋白質のマーカー探索

6-1. 序論

5 章で述べたが、細胞が分泌する EVs には核酸や蛋白質が多く含まれる。しかし、どのような核酸や蛋白質が EVs に詰め込まれるかは分泌する細胞によって異なる。つまり、EVs に含まれる核酸や蛋白質を解析することで、どのような細胞が分泌したものか分かる可能性もあるということである。また、その逆で、異なる細胞種から分泌される EVs にも共通に含まれる核酸や蛋白質の存在が示唆される。例えば、テトラスパニンファミリーの CD63 や CD9、熱ショック蛋白質 HSP70、そして Tumor susceptibility gene 101 (TSG101) などが、古くから Exosome marker と呼ばれている。しかし、様々な細胞由来の EVs を比較して、EVs における存在量を比較するような報告はなく、各研究者が個別に異なる細胞から分泌された EVs を集めて、その存在を確認したものを信頼してマーカーとして使用しているにすぎない。そこで、本研究では、がん細胞と非がん細胞を含む複数の前立腺細胞株と乳腺細胞株由来の EVs を比較し、いわゆる”EVs Marker”が本当にどの細胞株由来の EVs にも含まれるのか検討した。そのような分子を探索することは EVs の存在確認を含め、およそその収量を把握するのに役立つと考えられる。また、EVs の性質を特徴付ける良い材料になるのではないかと期待し、研究に取り組んだ。

6-2. 材料および実験方法

6-2-1. 使用した細胞株と培養方法

前立腺細胞は前立腺がん細胞株、PC3、PC-3M-luc (PC3M)、22Rv1 として前立腺上皮細胞株 PNT2 を用いた。乳腺細胞は、乳がん細胞株

MDA-MB-231-luc-D3H1 (MM231)、MDA-MB-231-luc-D3H2LN

(MM231LN)、MCF7、MCF7-ADR として乳腺上皮細胞株 MCF10A を用いた。PC3 細胞は前立腺がんステージ IV の患者から樹立された細胞株で骨への転移が認められる。PC3M は PC3 を親株として、さらに転移能が高まった細胞株である。22Rv1 細胞は Prostate Specific Antigen を発現し、アンドロゲンレセプター陽性である。PNT2 細胞は正常前立腺上皮細胞を SV40 による不死化させ、樹立された細胞である。MM231 細胞は乳がん患者の転移先、胸水から樹立された乳がん細胞株であり、さらにマウスに移植して転移能を高めた細胞株であり、マウスへの移植で肺や脳への転移が認められる。さらに MM231LN は MM231 を親株として、転移能が高められた細胞株であり、マウスへの移植において短期間でほぼ 100% の確立で転移が認められる。MCF7 細胞も MM231 細胞同様に乳がん患者の転移先、胸水から樹立された乳がん細胞株であるがマウスへの移植において造腫瘍能は低く、エストロゲンレセプター陽性である。

MCF7-ADR 細胞株は MCF7 細胞を親株として、タキサン系抗がん剤ドセタキセルに抵抗性を示す細胞株である。MCF10A 細胞株は乳腺上皮細胞を長期間血清無添加、高カルシウム濃度の培養液で培養し、樹立された。MCF10A 以外は RPMI 1640 medium、10%FBS、antibiotic-antimycotic を含む培養液で培養し、MCF10A 細胞は MEM、1% GA-1000、50 µg/ml

hydrocortisone、1 $\mu\text{g/ml}$ hEGF、500 $\mu\text{g/ml}$ insulin、と 4% BPE (Lonza) を添加し、それぞれの細胞を 37 度 5%CO₂ のインキュベーター内で培養した。

6-2-2. EVs の回収方法

EVs は各種細胞の培養上清から回収した。それぞれの細胞を 15cm ディッシュに 80%コンフレント程度で播種する。翌日、細胞が接着したことを確認してから、FBS 不含の Advanced RPMI1640 (Invitrogen) に antibiotic-antimycotic と L-グルタミン酸を終濃度 2mM になるように添加した培養液に交換する。その後、48 時間培養し、培養上清を回収し、2,000Xg、4 度で 10 分間遠心して細胞破片などを取り除き、さらに 0.22 μm のフィルターを用いてフィルトレーションを行った。フィルトレーション済みの培養上清を超遠心機 (Optima XE-90: BECKMAN COULTER) で 110,000xg 以上で 70 分遠心後、PBS を加えて同様の遠心操作を行い、得られた沈殿物は EVs を含む画分として回収した。回収した EVs は Quant-iT™ Protein Assay with Qubit®2.0 Fluorometer (Invitrogen) システムを用いて蛋白質濃度を測定し、それら蛋白質濃度をもとにしてウェスタンブロット等を行った。

6-2-3. 抗体

ウェスタンブロットに用いた抗体は下記の表にまとめた。二次抗体はペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヒツジ抗体 (GE Healthcare) もしくはペ

ルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ロバ抗体 (GE Healthcare) を用いた。
 なお、CD63、CD9、CD81、Integrin beta 1 は非還元状態で泳動し、検出した。

表6-1 ウェスタンブロットに用いたEVマーカーに対する抗体一覧

認識抗原	販売会社	クローン名	希釈倍率	ホスト
CD63	BD Biosciences	H5C6	1/200	マウス
Hsp70	BD Biosciences	7/HSP70	1/1000	マウス
Flotillin-1	BD Biosciences	18/Flotillin-1	1/500	マウス
Caveolin 1	BD Biosciences	2297/Caveolin 1	1/1000	マウス
Cytochrome c	BD Biosciences	7H8. 2C12	1/500	マウス
Tsg101	Gene Tex	4A10	1/1000	マウス
CD9	SantaCruz Biotechnology	ALB 6	1/200	マウス
CD81	SantaCruz Biotechnology	5A6	1/200	マウス
Rab-5b	SantaCruz Biotechnology	A-20	1/200	ウサギ
Annexin 2	SantaCruz Biotechnology	C-10	1/200	マウス
Integrin beta 1	abcam	12G10	1/1000	マウス
Actin	Millipore	C4	1/1000	マウス

6-2-4. Nano particle tracking analysis (NTA) を用いた粒子径の測定
 NTA は Nanosight LM10HS とブルーレーザーを用いて測定した。NTA
 の測定原理は照射したレーザー光をナノ粒子に当てて、反射光を利用して
 可視化して 60 秒間ビデオ撮影したものを粒子のブラウン運動をもとに粒
 子径や数をソフトウェア上で解析する。測定には EVs を PBS で適宜希釈
 して測定した。

6-3. 結果

6-3-1. 回収した EVs の位相差電子顕微鏡による形態観察

前立腺細胞株 4 種類と乳腺細胞株 5 種類の培養上清から EVs を超遠心法
 にて回収し、その中から、PC3、22Rv1、PNT2、MM231LN、MCF7 MCF10

細胞株由来 EVs を位相差電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡による EVs の観察は従来から回収した EVs の存在を確認する方法として用いられてきた。得られた顕微鏡画像からは 50 nm から 400 nm の粒子を確認することができた (図 6-1)。しかし、細胞種ごとに EVs を確認してみると、22Rv1 細胞由来や MCF7 細胞由来の EVs は、そのサイズがほぼ均一に観察されたが、他の細胞株由来の EVs は不均一なサイズを示し、特に PC3 細胞由来 EVs には 400 nm ほどの楕円形の粒子が観察されるなど、細胞種ごとに形態やサイズが異なることが分かった。

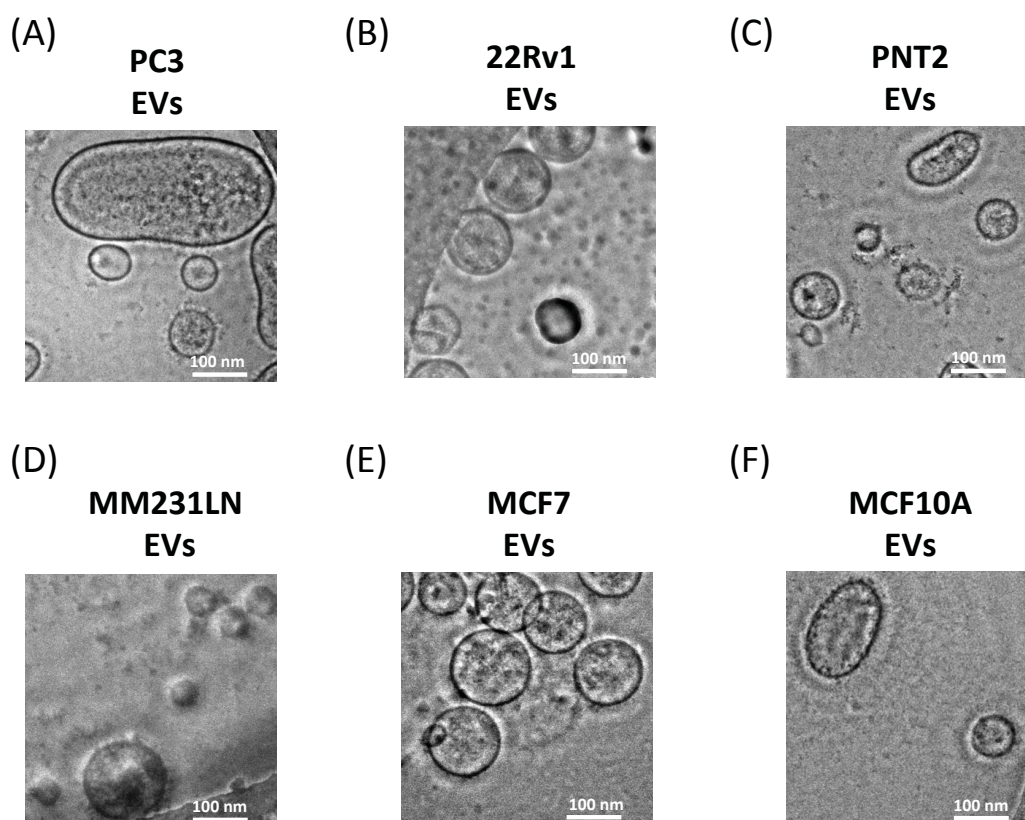


図 6-1 位相差電子顕微鏡による EVs の形態観察

位相差電子顕微鏡を用いて EVs を観察した。(A) PC3 細胞由来 EVs、(B) 22Rv1 細胞由来 EVs、(C) PNT2 細胞由来 EVs、(D) MM231LN 細胞由来 EVs、(E) MCF7 細胞由来 EVs、(F) MCF10A 細胞由来 EVs。スケールバー; 100 nm

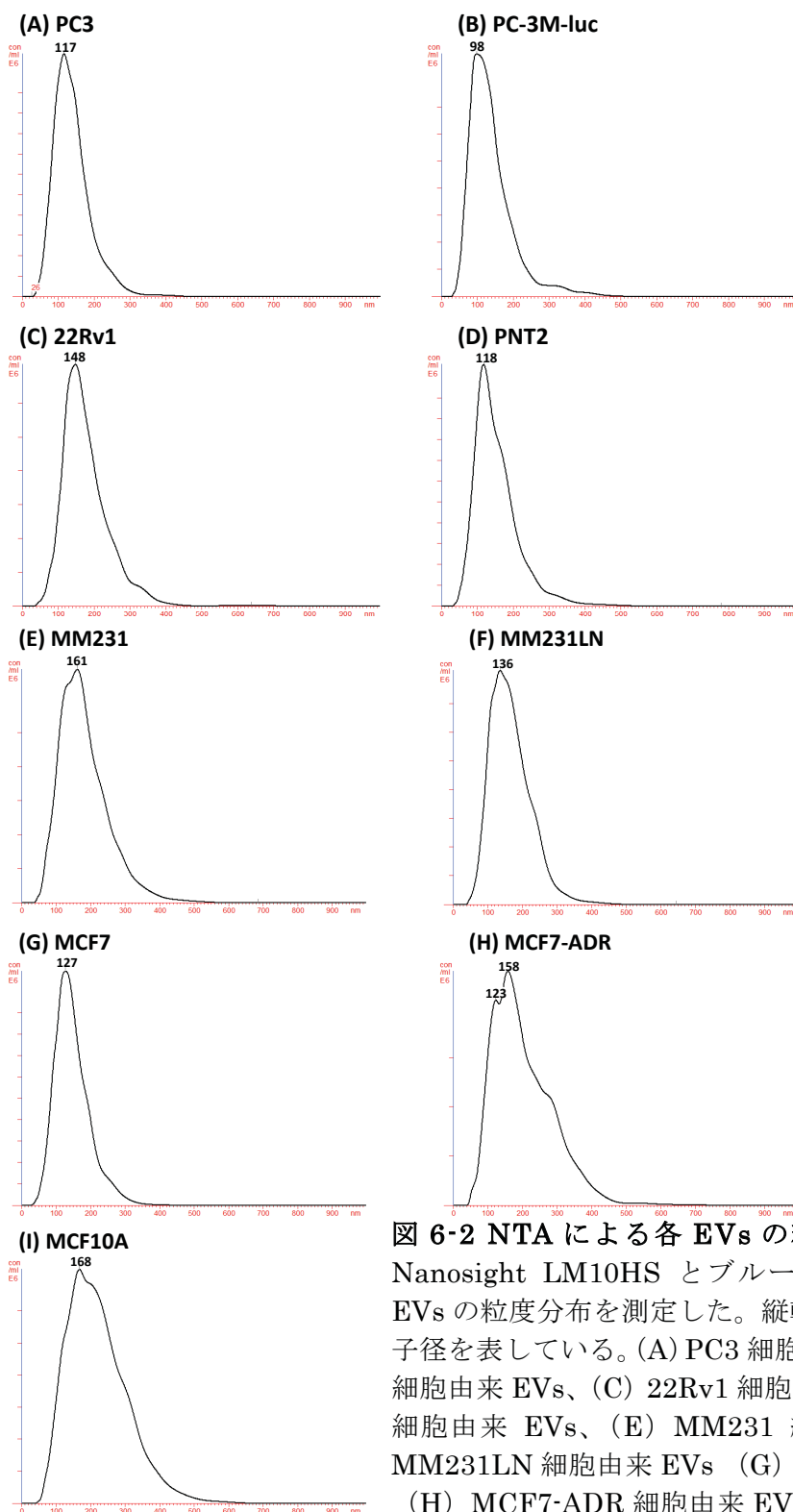


図 6-2 NTA による各 EVs の粒度分布解析

Nanosight LM10HS とブルーレーザーを用いて各 EVs の粒度分布を測定した。縦軸は濃度を、横軸は粒子径を表している。(A) PC3 細胞由来 EVs、(B) PC3M 細胞由来 EVs、(C) 22Rv1 細胞由来 EVs、(D) PNT2 細胞由来 EVs、(E) MM231 細胞由来 EVs、(F) MM231LN 細胞由来 EVs (G) MCF7 細胞由来 EVs、(H) MCF7-ADR 細胞由来 EVs、(I) MCF10A 細胞由来 EVs グラフ中の数字は粒度分布のピークの粒子径を表している。

6-3-2. Nano particle tracking analysis (NTA) を用いた粒子径の測定
回収した 9 種類の EVs、全てを Nanosight LM10HS とブルーレーザーを用いてその粒子径を測定した (図 6-2)。この機器を用いることで、形態の観察は行えないが、濃度と粒度分布を短時間で簡便に測定することが可能である。この測定結果から、およそ 100 nm から 170 nm の間にピークを検出し、大きい粒子では 300 nm ほどのものが存在することが示唆された。また、電子顕微鏡の観察結果と同様に細胞種ごとに粒度分布が異なることが示された。例えば、MCF7-ADR、MCF10A 細胞由来 EVs は粒度分布に幅を持ち不均一な粒子径であると言え、全体的に乳腺細胞由来 EVsの方が前立腺細胞由来 EVs と比較して粒度分布に幅を持つことが示されている。

6-3-3. 銀染色による EVs に含まれる蛋白質の特徴付け

回収した EVs に含まれる蛋白質は細胞種による違いが見られるか、銀染色を行い確認した (図 6-3)。2-メルカプトエタノールを添加し、還元した EVs 蛋白質、細胞抽出物、非添加による非還元 of EVs 蛋白質、細胞抽出物をそれぞれ EVs は 500 ng/レーン、細胞抽出物は 5 µg/レーンで電気泳動を行った。その結果、前立腺細胞由来の 4 種類の EVs を比較すると、22Rv1 細胞由来の EVs は他の 3 種類に比べて異なるバンドパターンを示した。例えば、還元下で主なバンドは約 70kDa、30kDa、22kDa であるが、それらバンドは他の 3 種類ではほぼ確認できない。他の 3 種類では約 140kDa、120kDa、60kDa などに主なバンドが観察され、全体的に蛋白

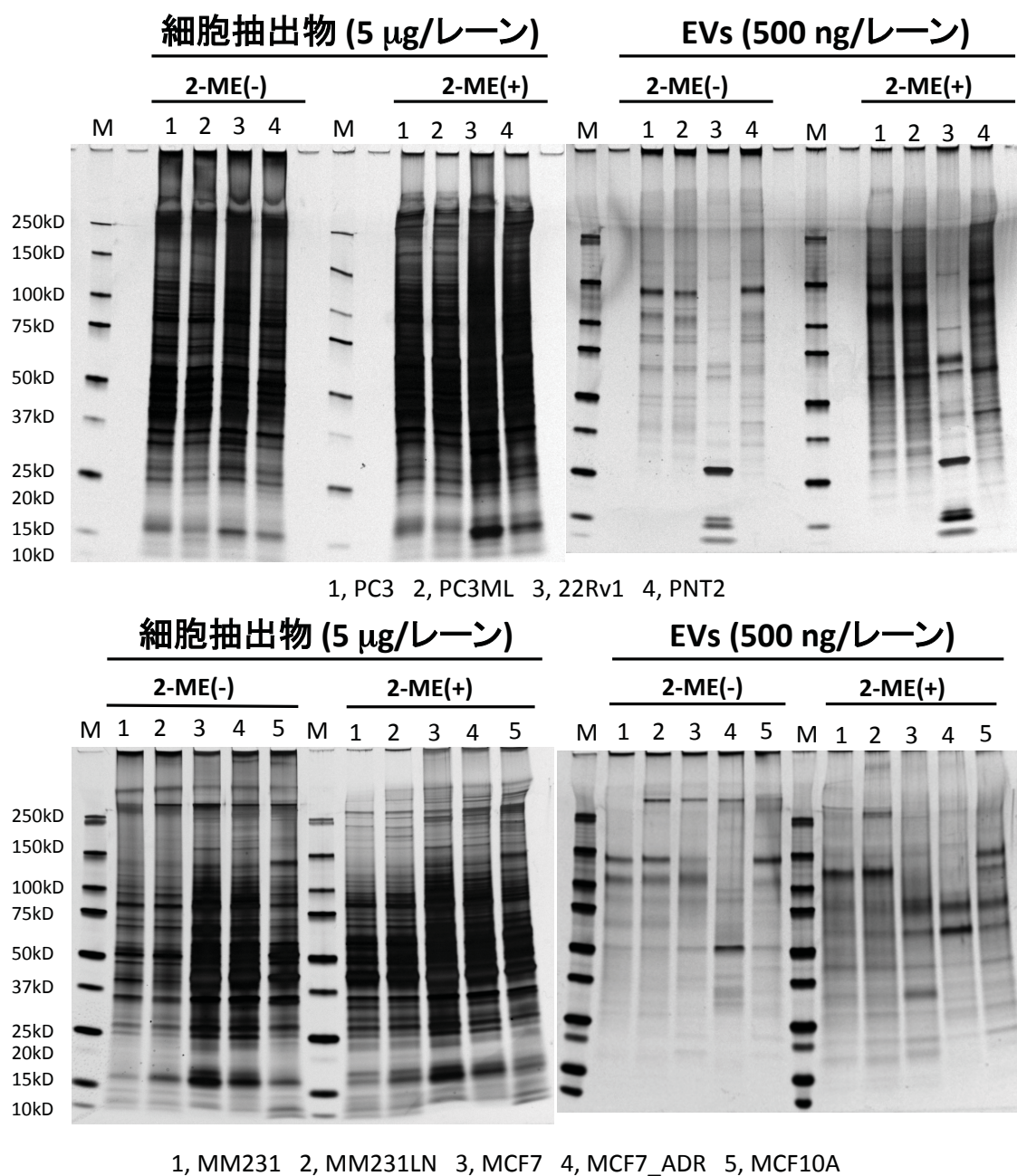


図 6-3 銀染色法による細胞抽出物と EVs に含まれる蛋白質の解析

細胞抽出物 5 μg と EVs 500 ng をそれぞれ 2-メルカプトメタノール存在下、非存在下で電気泳動後、銀染色を行った。上段が前立腺細胞株で 1; PC3 細胞、2; PC3ML 細胞、3; 22Rv1 細胞、4; PNT2 細胞、下段が乳腺細胞株で、1; MM231 細胞、2; MM231LN 細胞、3; MCF7 細胞、4; MCF7-ADR 細胞、5; MCF10A 細胞。M; マーカー

質の種類も多く確認できる。また乳腺細胞株では概ね類似したバンドパタ

ーンを示したが、特に MM231 細胞由来と MM231LN 細胞由来、MCF7 細胞由来と MCF7-ADR 細胞由来は強い類似パターンを示し、親株とその亜株由来の EVs に含まれる蛋白質は類似する可能性が高い。

6-3-4. ウェスタンブロット法による EV マーカーの比較

回収した各種 EVs における EV マーカーの存在量を、ウェスタンブロット法を用いて比較した。はじめに細胞の破片などのコンタミネーションの有無を調べるため、ミトコンドリア内膜に存在する Cytochrome C 蛋白質を細胞抽出物と EVs に含まれる量を比較した。ミトコンドリア内膜に存在する Cytochrome C 蛋白質は細胞質には局在せず、EVs には含まれないとされている。そのため、本研究で得られた EVs の質を確認するために行ったウェスタンブロット法では 1 μ g の細胞抽出物では Cytochrome C の存在を確認できたが、同量の EVs では確認できなかった (6-4)。

次に、EV マーカーと言われている 11 種類の蛋白質の存在を、ウェスタンブロット法にて解析した (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011, Atay *et al.*, 2011, Bhatnagar *et al.*, 2007, Bobrie *et al.*, 2012, Clayton *et al.*, 2004, Demory Beckler *et al.*, 2013, Logozzi *et al.*, 2009, Lu *et al.*, 2009, Lv *et al.*, 2012, Peinado *et al.*, 2012, Qu *et al.*, 2009, Bobrie A *et al.*, 2012 (2))。11 種類の蛋白質とは、CD9、CD81、Rab-5b、Actin、TSG101、CD63、Annexin 2、Integrin beta1、Heat Shock Protein 70 (HSP70)、Flotillin-1、Caveolin-1 である。これら蛋白質の細胞内の発現、そして、EVs に含まれる量をそれぞれの細胞株で比較した。ウェスタンブロット法の結果から、

今回解析した細胞株由来の EVs に関して、用いた EVs マーカーを4つに分類した。

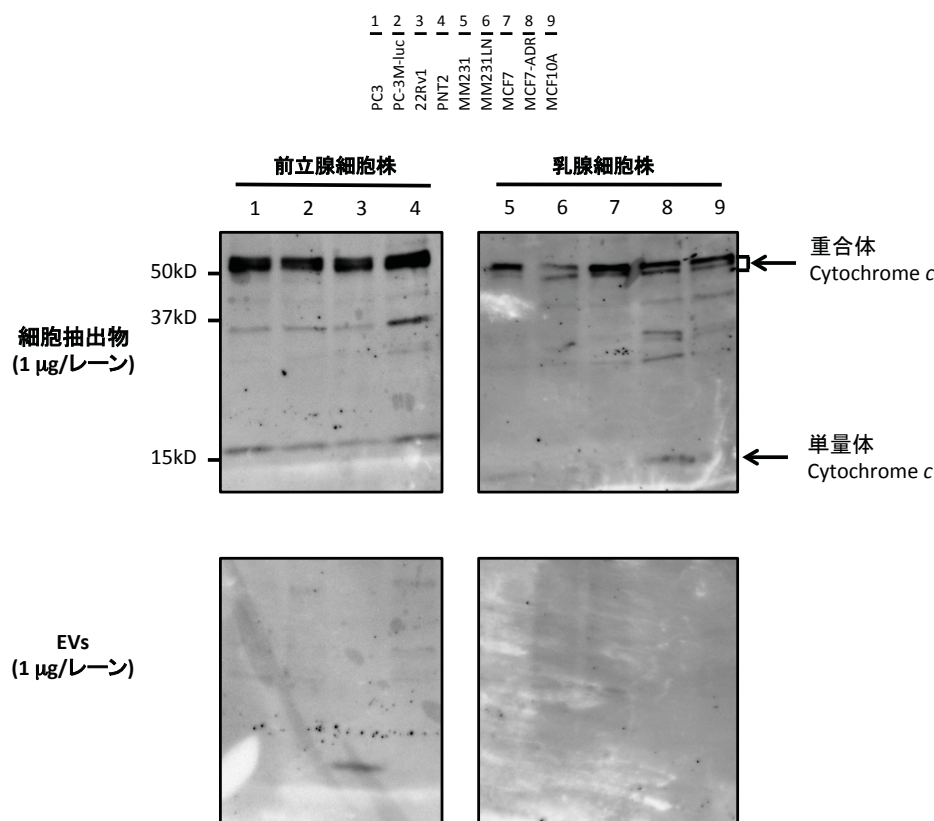
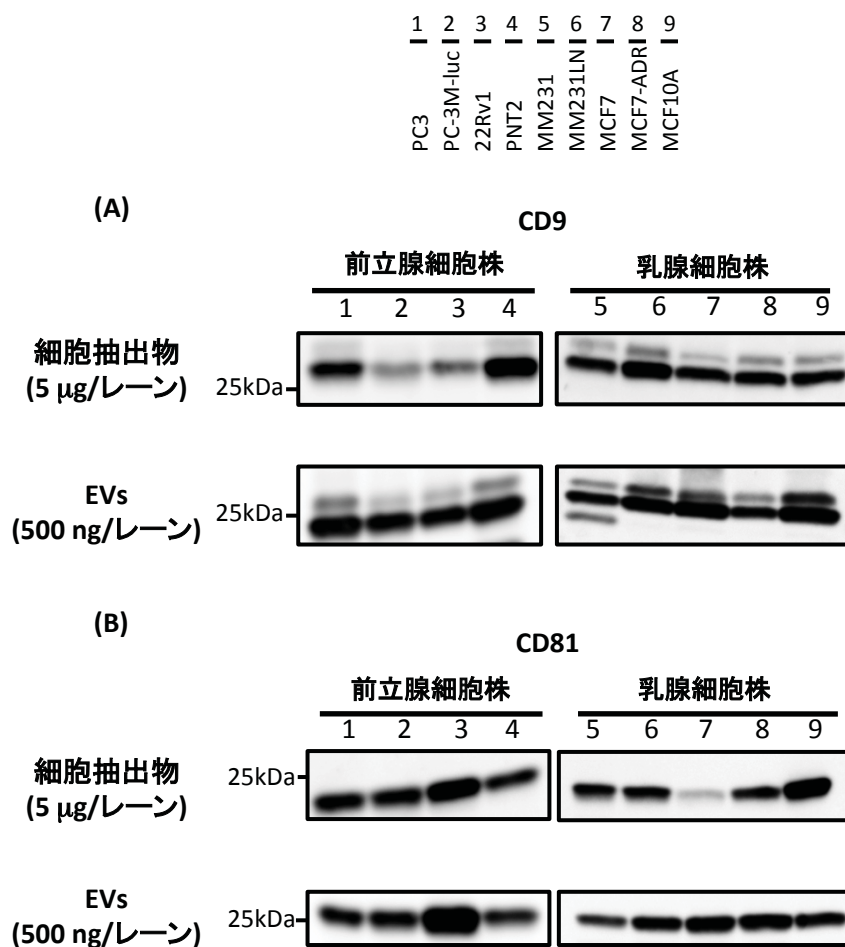


図 6-4 回収した EVs の品質評価

ウェスタンブロット法を用いて cytochrome c の発現を解析した。Cytochrome c は EVs 内には含まれないと考えられている。細胞抽出物 (上段) と EVs (下段) は 1 µg 泳動している。1; PC3 細胞、2; PC3ML 細胞、3; 22Rv1 細胞、4; PNT2 細胞、5; MM231 細胞、6; MM231LN 細胞、7; MCF7 細胞、8; MCF7-ADR 細胞、9; MCF10A 細胞。

1 つ目は 9 種類全ての EVs で多い存在量を示す CD9 と CD81 である (図 6-5)。細胞内の発現には細胞株間で差が認められるものの、EVs に関しては他の EVs マーカーと比べても差が少なく、細胞抽出物に比べて EVs では濃縮されていることが分かる (表 6-2)。これら蛋白質は、EVs を回収した際に、回収が行えているか確認するために適した蛋白質である。さら

に、今回解析した細胞株に限ってはほぼ等量含まれていることが特徴であ



る。

図 6-5 EVs マーカーの存在量の解析 (1)

ウェスタンブロット法を用いて (A) CD9 と (B) CD81 の細胞内と EVs の発現を解析した。細胞抽出物 (上段) は 5 mg を、EVs (下段) は 500 ng を泳動している。1; PC3 細胞、2; PC3ML 細胞、3; 22Rv1 細胞、4; PNT2 細胞、5; MM231 細胞、6; MM231LN 細胞、7; MCF7 細胞、8; MCF7-ADR 細胞、9; MCF10A 細胞。CD9、CD81 とともに非還元下で検出している。

2 つ目は EVs でその存在は確認できるが、由来する細胞株によって量が異なる、もしくは細胞内に比べて量が少ない蛋白質であり、Rab-5b、Actin、TSG101、CD63 である (図 6-6)。これら蛋白質は EVs の存在を確認す

るための解析に用いることが可能であるが、細胞種によってはその量が異なることを留意しなければならない。

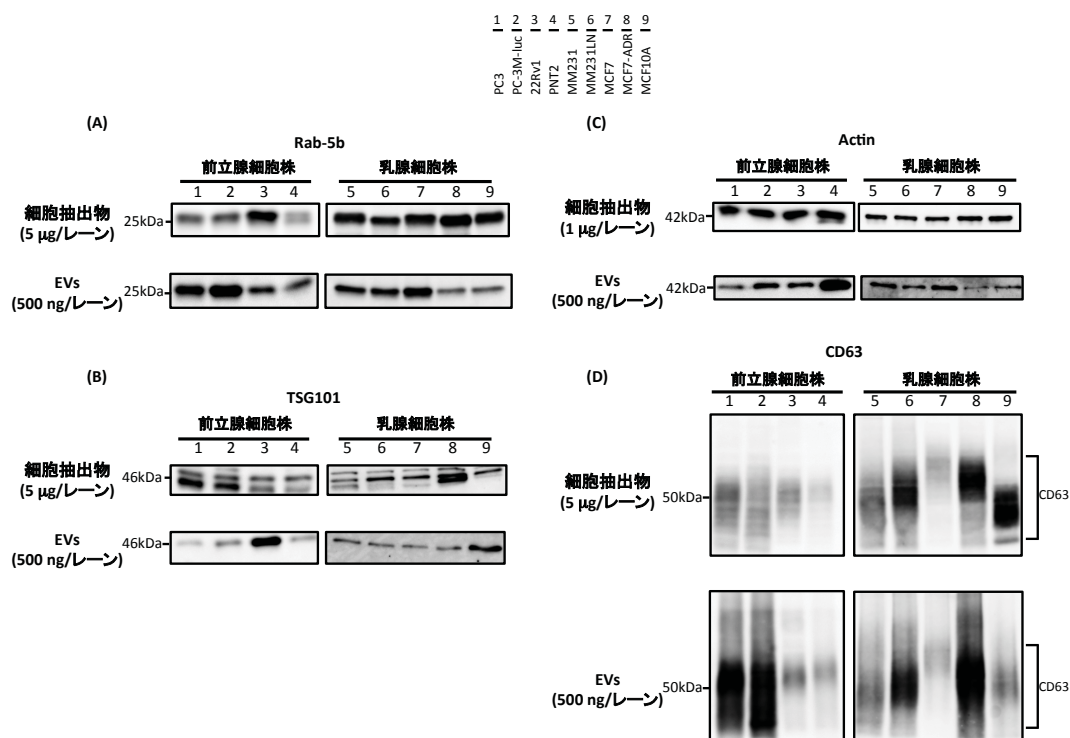


図 6-6 EVs マーカーの存在量の解析 (2)

ウェスタンブロット法を用いて (A) Rab-5、(B) TSG101、(C) actin、(D) CD63 の細胞内と EVs の発現を解析した。細胞抽出物 (上段) は 5 µg (actin は 1 µg) を、EVs (下段) は 500 ng を泳動している。1; PC3 細胞、2; PC3ML 細胞、3; 22Rv1 細胞、4; PNT2 細胞、5; MM231 細胞、6; MM231LN 細胞、7; MCF7 細胞、8; MCF7-ADR 細胞、9; MCF10A 細胞。CD63 のみ非還元下で検出している。

3 つ目はほとんど EVs において存在を確認することができず、さらに細胞内においてもその発現がほとんど確認できない蛋白質であり、Annexin 2 と Integrin beta1 が該当する (図 6-7)。例えば、Annexin 2 は 22Rv1 細胞と MCF7 細胞においては EVs、細胞抽出物のどちらも、その存在が極端に少ない。よって、これら EV マーカーを使用して EVs の存在を確認しようとする、回収できているにも関わらず、見落とす可能性がある。

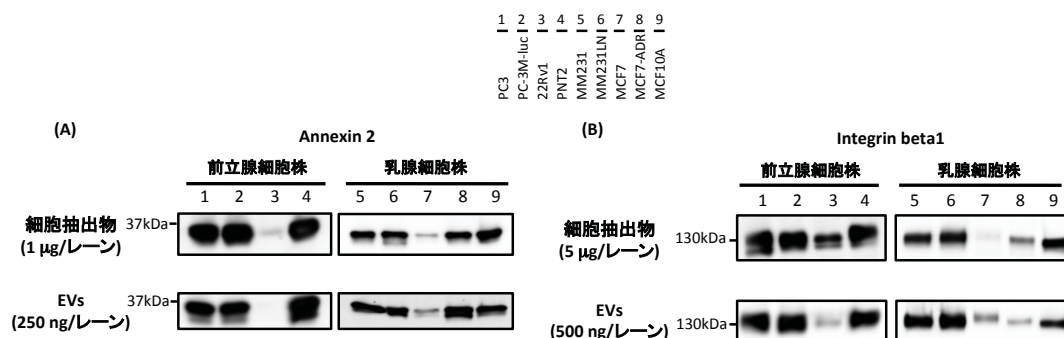


図 6-7 EVs マーカーの存在量の解析 (3)

ウェスタンブロット法を用いて (A) Annexin 2 と (B) Integrin beta1 の細胞内と EVs の発現を解析した。細胞抽出物 (上段) は Annexin 2 は 1 μg、Integrin beta1 は 5 μg を、EVs (下段) は、Annexin 2 は 250 ng、Integrin beta1 は 500 ng を泳動している。1; PC3 細胞、2; PC3ML 細胞、3; 22Rv1 細胞、4; PNT2 細胞、5; MM231 細胞、6; MM231LN 細胞、7; MCF7 細胞、8; MCF7-ADR 細胞、9; MCF10A 細胞。Integrin beta1 は非還元下で検出している。

4 つ目は細胞内の発現が EVs のプロファイルに反映されていない蛋白質であり、HSP70 と Flottilin-1 である (図 6-8)。これら蛋白質は特に 22Rv1 細胞抽出物では、発現が確認できるにも関わらず、EVs にはその存在を確認することが出来なかった。一般的に EVs に含まれる蛋白質は細胞内の発現を反映すると言われており (Vallhov *et al.*, 2011, Aliotta *et al.*, 2012, Segura *et al.*, 2005)、22Rv1 細胞は特殊な分泌機構が存在する可能性もある。Caveolin-1 に関しては PC3 細胞、PC-3M-luc 細胞株由来 EVs のみ存在を確認できた (図 6-8)。MCF10A 細胞抽出物でも発現は確認できたが、EVs に関しては存在を確認できなかった。

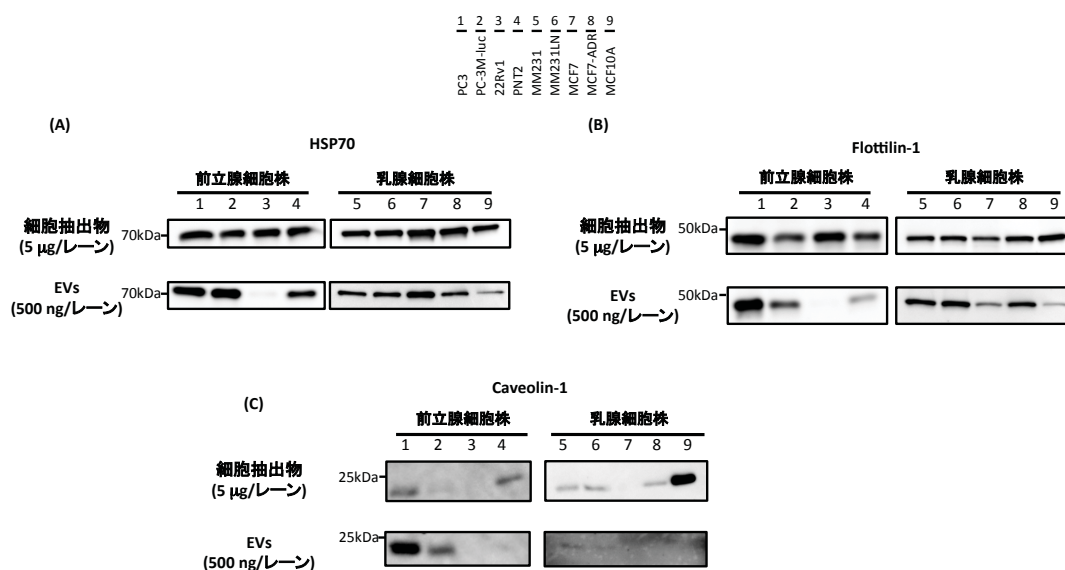


図 6-8 EVs マーカーの存在量の解析 (4)

ウェスタンブロット法を用いて (A) HSP70、(B) Flottilin-1、(C) Caveolin-1 の細胞内と EVs の発現を解析した。細胞抽出物 (上段) は 5 µg、EVs (下段) は、500 ng を泳動している。1; PC3 細胞、2; PC3ML 細胞、3; 22Rv1 細胞、4; PNT2 細胞、5; MM231 細胞、6; MM231LN 細胞、7; MCF7 細胞、8; MCF7-ADR 細胞、9; MCF10A 細胞。

6-4. 考察

前立腺細胞株と乳腺細胞株、合わせて 9 種類の細胞株由来の EVs を用いて、いわゆる EVs マーカーと言われる蛋白質の存在について解析した。その結果を表にまとめた (表 6-3)。この表からも分かるように、全てに“同量”含まれるようなマーカーを決定するのは難しいだろう。しかし、EVs に多く存在し、細胞株間において存在量に大きな差がないのは CD9 と CD81 であった。もちろん、本研究で用いた細胞株は前立腺細胞株と乳腺細胞株のみであるが、体中には多くの種類の細胞が存在することから、本研究で得られた結果が全て反映されるとは限らない。さらに EVs には数百種類もの蛋白質が含まれるとされており、解析した蛋白質は 11 種類に

すぎない。しかし、少なくとも本研究で用いた細胞株ですら、EVsに含まれる量が細胞株によって大きく異なる、もしくは全く含まれないEVマーカーが存在した。特にCD63は古くからマーカーとして利用されてきたが、本研究から、がんの悪性度の高いような細胞由来のEVsに多く含まれることが分かった。例えば、PC3細胞やPC-3M-luc細胞、転移能の高いMM231LN細胞、薬剤耐性能の高いMCF7-ADR細胞から分泌されるEVsには多く含まれるが、非がん細胞株であるPNT2細胞やMCF10A細胞由来のEVsに含まれる量は少ない。CD63はtissue metalloprotease inhibitor protein-1と作用し、integrin beta1との結合を促進し、細胞増殖を活性化させ、アポトーシスを防ぐ働きがあることが、乳がん細胞株を用いた研究から報告されており (Jung *et al.*, 2006)、がん細胞の増殖に関与することが明らかとなっている。しかし、肺がんではCD63の発現と予後が逆相関しているとの報告もあり (Kwon *et al.*, 2007)、がんの悪性度との関連を明らかにするには、さらなる研究が必要であるが、EVマーカーとして使用するには注意しなければならない。Caveolin-1に関して、PC3細胞とPC-3M-luc細胞由来のEVsのみ検出できたのは、PC3細胞由来のProstasomeにCaveolin-1が含まれることが報告されており (Llorente *et al.*, 2004)、本研究でもProstasome由来のCaveolin-1を検出したと考えられる。超遠心法で回収してきたEVsにはProstasomeが含まれる可能性は高く、本研究でPC3細胞培養上清から回収したEVsの電子顕微鏡撮影の結果からも、400 nmほどの大きな粒子や形態などからProstasomeと思われる粒子も含まれている (Poliakov *et al.*, 2009)。ま

た、CD9やCD81は多種のEVsに多く含まれていることから、EVsの分泌過程で含まれた可能性が高く、生合成や分泌機構に関与する蛋白質であることも考えられる。HSP70やFlottilin-1は22Rv1細胞内では発現しているにも関わらず、EVsには含まれていないことから、EVsには選択的に蛋白質を詰め込む機構が存在することがこの結果からも分かる。このように、EVマーカーを探索する上でも、EVsの生合成や分泌過程を知ることとはとても重要であり、今後行われる研究によって、より良いEVマーカーが見つかるかもしれない。その結果、ローディングコントロールに相応しい蛋白質が同定されることで、EVs研究の幅が広がるかもしれないが、本研究から、現在はCD9やCD81がローディングコントロールに近い存在であることを結論する。

表6-2 各マーカーにおける細胞内発現量とEVsにおける存在量の比較

	CD9	CD81	Rab-5b	Actin	TSG101	CD63	Annexin 2	Integrin beta1	HSP70	Flottilin-1	Caveolin-1
PC3	51.87	67.86	3.24	0.52	2.38	39.55	4.05	3.35	6.04	11.47	29.16
PC-3M-luc	78.84	78.28	5.26	0.91	4.98	55.43	4.17	2.86	10.39	7.80	29.61
22Rv1	68.16	105.86	0.68	0.85	44.87	12.99	4.10	10.73	0.08	0.07	2.58
PNT2	30.49	77.81	1.78	5.57	5.33	22.61	15.92	3.51	3.10	3.05	2.89
MM231	41.89	29.38	2.31	1.61	3.37	11.85	6.48	21.07	0.27	3.66	0.73
MM231LN	44.01	56.12	3.18	0.83	1.63	14.75	4.76	19.68	0.33	4.70	0.25
MCF7	88.87	693.37	4.59	2.25	1.87	12.09	4.25	60.41	0.84	1.27	4.19
MCF7-ADR	34.60	86.36	0.70	0.51	0.95	26.76	7.06	4.57	0.17	2.33	0.11
MCF10A	144.92	12.85	1.26	0.40	9.78	4.75	3.74	6.24	0.08	0.22	0.02

ウェスタンブロット法にて検出したバンドのシグナル強度をImage Reader LAS-3000 Software (FUJIFILM)を用いて測定し、単位蛋白質質量あたりに換算した結果をEVsと細胞内で比較した。表は細胞内に対するEVsのシグナル強度を表している。

表6-3 ウェスタンブロット法による各マーカーの存在量の比較

細胞株/マーカー蛋白質	CD9	CD81	Rab-5b	Actin	TSG101	CD63	Annexin 2	Integrin beta1	HSP70	Flottilin-1	Caveolin-1
PC3	+++	++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
前立腺細胞株 PC-3M-luc	+++	++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	++	+
22Rv1	+++	+++	++	++	+++	+	-	-	-	-	-
PNT2	+++	++	+	+++	+	+	+++	+++	++	+	-
MM231	++	++	++	++	+	+	+++	+++	++	++	-
乳腺細胞株 MM231LN	+++	+++	++	++	+	++	++	+++	++	++	-
MCF7	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+++	+	-
MCF7-ADR	++	+++	+	+	+	+++	+++	+	++	++	-
MCF10A	+++	+++	+	+	++	+	++	++	+	+	-

-: 検出不可, +: 弱, ++: 中程度, +++: 強

[第7章] 統括と展望

1952年、Alfred Hershey と Martha Chase は T2 ファージを用いた実験で、遺伝物質は DNA であることが裏付けた (Hershey and Chase, 1952)。翌年には James Watson と Francis Crick らが DNA の二重らせん構造が提唱した (Watson and Crick, 1953)。それから 50 年後、様々な知見の蓄積、そして技術の発達により DNA 配列全体であるヒトゲノムが完全に解読され (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004)、生命を制御する“情報”は全て手に入れることができた。この出来事は生命科学や医療にとって大きな進歩であろう。しかし、ゲノムプロジェクトは始まりであり、生命現象が全て理解できたかと言えば、そうではなく、生命現象の階層性の根幹となる情報が分かっただけである。つまり、ゲノム DNA から mRNA へ転写、そして蛋白質への翻訳というセントラルドグマのもとであり、さらにそこから細胞、組織、器官、個体となるには、様々な要因が必要であり、それはゲノム情報だけでは分からない。外部との相互作用、刺激による環境的要因などによってどのようなゲノム情報を使うか、またその調節が重要であり、細胞がどのような遺伝子を用いて外部刺激に対応するかは非常に興味深い。本研究では、細胞が外部の刺激や環境変化に応答し、miRNA がどのように遺伝子発現を微調節するか、さらには近年注目されている細胞間のコミュニケーションツールである細胞外小胞に関する研究を行った。

第3章より、miR-210 は低酸素環境下、鉄欠乏時に HIF-1 α によって発現

誘導され、マウスのゼノグラフトモデルの解析により、実際の腫瘍組織の低酸素環境下で発現が上昇していることを示した。しかし、通常酸素下では E2F ファミリー遺伝子によって発現誘導されているため、完全に発現していないわけではない。よって miR-210 の発現誘導は環境によって異なり、周囲の環境により異なる遺伝子を標的としていることも考えられる。つまり、同じ miRNA にも関わらず、細胞が置かれている環境によって、発現を微調節する遺伝子を変えることで、より複雑な発現制御ネットワークを構築しているのだろう。本研究では周囲の環境による標的遺伝子の選択性などは明らかに出来なかったが、今後の miRNA 研究で明らかになることを期待したい。

本研究では miRNA が環境変化によって発現が変動する一例を示し、第4章では miR-210 は少なくとも 2 つの鉄代謝関連遺伝子の発現を直接制御することを明らかにした。少なくとも、と記載した理由は miR-210 の標的遺伝子を全て解析できたわけではないからである。miRNA の標的遺伝子は複数存在し、複数遺伝子の発現を制御することで一つのパスウェイを調節することは理にかなっており、それこそ生体における miRNA の利点ではないだろうか。生物の進化において、蛋白質をコードする遺伝子数が顕著に増加し、生物の複雑さが増す、というような過程は辿らなかった。その代わりに、すでに存在する遺伝子の発現を複雑に調節することで、複雑さを形成してきたが、その一部を担うのが non-coding RNA、とりわけ miRNA ではないだろうか。それは1章でも述べたようにゲノム中の蛋白質をコードする領域の割合をヒトと線虫で比較すれば、ヒトの方がはるか

に割合は低く、それは non-coding RNA が多く存在することを示している。実際に報告されている miRNA の数は線虫に比べてヒトではその数が 5 倍以上にもなる。本研究では細胞内鉄代謝制御に関して相反する遺伝子の発現調節を一つの miRNA が行う例を示したが、相反する作用を持つ遺伝子を制御しているため、miR-210 自身の発現変動が生体内で起こりえない量となる場合、つまり、pre-miR-210 を細胞に導入した際には注意が必要であった。pre-miR-210 を細胞に導入した際は直接標的遺伝子としている TfR1 の発現減少が見られるが (図 4-9)、これは ISCU-IRP1 経路の間接的な発現上昇よりも直接経路の抑制が強く働くためだと考えられる。一方で、低酸素環境下で miR-210 の発現を抑制した場合には、TfR1 の発現に変化は認められず、生体内で起こりうる上昇では TfR1 の発現を変えないような仕組みになっているのだろう (図 4-15)。また、pre-miR-210 を細胞に導入した際に起る TfR1 の発現抑制の結果、細胞増殖を抑制することも見出している (図 7-1)。この結果が示すことは、環境変化による細胞の適応に有利に働くと考えられる miRNA ですら、生体内の量を見逃した発現上昇は、細胞に害を及ぼしかねず、周囲の環境に合わせた適切な発現量の調節が求められるということである。また、がん細胞は正常な細胞に比べて増殖するために TfR1 の発現が高い必要があり (図 7-2)、pre-miR-210 による TfR1 の発現抑制は治療に利用できる可能性がある。しかし、核酸 (pre-miR-210) のデリバリーシステムのさらなる開発や、正常細胞への影響が皆無とも言えないため、腫瘍組織への特異的なデリバリーが求められる。

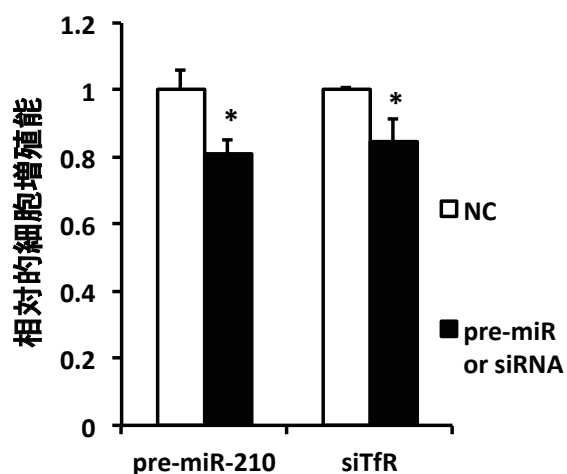


図 7-1 TfR1 の発現抑制による細胞増殖能への影響

MCF7細胞に pre-miR-210 もしくは TfR1 に対する siRNA (siTfR) を導入し、72 時間後に細胞増殖能を、MTS を用いた比色定量法にて測定した。*Pre-miR-NC または siNC を導入した細胞培養群と比較して $p < 0.05$ 。

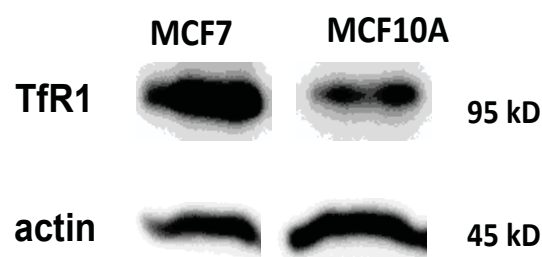


図 7-2 がん細胞と正常細胞における TfR1 の発現解析

ウェスタンブロット法を用いて MCF7 細胞 (左) と MCF10A 細胞 (右) における TfR1 の発現を確認した。ローディングコントロールは actin を用いた。

細胞が小胞顆粒を分泌することが明らかになって、30 年以上が経過するが、未解明な部分が多い。それは、細胞が排出するゴミ袋だと考えられたりして、注目されるのが遅かったことや、その大きさゆえに回収方法や解析方法が限られていたことなどがあるのではないだろうか。しかし、近年では EVs に miRNA が含まれている発見や診断マーカーとしての有用性が検証されているなど、注目を集める知見や事象が報告され始めた。さらに技術開発も進み、Nanosight のような機器や超遠心機を使用せず EVs を回収する試薬などが登場し、研究の幅を持たせたことで、EVs がより身

近な存在になり、近年の EVs 研究の勢いは目を見張るものがある。本研究では、その中でも EVs に含まれる蛋白質に着目し、今後の EVs 研究に役立つようなマーカー探索を行った。その結果、前立腺細胞と乳腺細胞由来の EVs の検討結果から、CD9 と CD81 はマーカーとして有用である可能性が示された。一方で、従来マーカーと言われていた蛋白質でも、その発現は由来する細胞株によって確認できないものもあり、EVs の多様性を垣間見ることができた。今後は、多様な EVs が環境変化によって分泌される、その構成成分に変化があるのかなどに着目した研究に取り組み、細胞が環境変化に応答する際に EVs をどのように利用するのか明らかにしたい。

以上をまとめると、転写因子やサイトカインなどは調節系を一方向に動かすのに対し、個々の miRNA は同時に複数の遺伝子発現を多方向に制御するが、本研究では、miR-210 が 2 つの分子を標的にして鉄代謝系で相反する作用を発揮することにより、緻密な制御、すなわち微調節 (micromanaging) を担うことを示した。しかも miRNA はエクソソームに内包されて、細胞・組織間を移動する。本研究は、このような新たなクラスの調節因子による新たな調節の様式を詳らかにし、生物が構築する複雑な調節系の仕組みを理解するための新知見を与えた。

[謝辞]

本研究を遂行するにあたり、丁寧な御指導御鞭撻を頂いた早稲田大学 大学院先進理工学研究科の加藤尚志教授ならびに国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野の落谷孝広分野長に心より感謝申し上げます。両先生方には、多くのことを学ばせて頂き、さらに発表や執筆に関する多くの機会を頂きました。

学位論文審査において、貴重な御指導、御助言を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科の並木秀男教授、園池公毅教授に深く感謝致します。

小坂展慶博士には、研究室に配属されてから、右も左も分からない私を指導して頂き、さらに国立がん研究センター研究所に所属してからも指導を続けて頂き深く感謝致します。実験の手技のみならず、研究に対する考え方など多くのことを学ばせて頂きました。

また、早稲田大学 加藤研究室の杉浦圭一氏には1年間ではありましたが、研究室に配属されてから学部卒業論文まで、様々な基礎的実験手技を教えてくださいました。山本雄介博士には議論やアドバイスを通じて指導して頂きました。本研究は多くの加藤研究室の先輩、後輩方のご協力があり、特に同期のみなさまには研究のみならず、研究室生活を行っていく上で大変お

世話になりました。同期の永澤和道氏には実験手法に関する様々なアドバイスを頂き、感謝します。

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野の竹下文隆博士、川又理樹博士、井口晴久博士をはじめとする同研究分野のみなさまにも多くの御指導を頂き、また、研究者のあるべき姿を見せて頂き、大変刺激を受けたことを感謝申し上げます。

[引用・参考文献]

Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu YT, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H, Toyokuni S. (2012) . Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. *PLoS One*. 7(8):e43403.

Aliotta JM, Lee D, Puente N, Faradyan S, Sears EH, Amaral A, Goldberg L, Dooner MS, Pereira M, Quesenberry PJ. (2012) . Progenitor/stem cell fate determination: interactive dynamics of cell cycle and microvesicles. *Stem Cells Dev*. 21 (10) :1627-1638.

Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, Cooper JM. (2011) . Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis*. 42 (3) :360-367.

Atay S, Gercel-Taylor C, Kesimer M, Taylor DD. (2011) . Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Exp Cell Res*. 317 (8) :1192-1202.

Attwooll C, Lazzerini Denchi E, Helin K. (2004) . The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J*. 23 (24) :4709-4716.

Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G. (2012) . Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*. 14 (7) :677-685.

Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. (2012) . Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in

zebrafish. *Science*. 336 (6078) :233-237.

Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. (2007) . Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*. 110 (9) :3234-3244.

Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C. (2012) . Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*. 1: 18397

Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, Ostrowski M, Théry C. (2012) . Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res*. 72 (19) :4920-4930.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004) . MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (32) :11755-11760.

Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J. (2008) . hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 14 (5) :1340-1348.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. (2005) . MicroRNA-21 is an

antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65 (14) :6029-33.

Clayton A, Turkes A, Dewitt S, Steadman R, Mason MD, Hallett MB. (2004). Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J.* 18 (9) :977-979.

Croce CM. (2009) . Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 10 (10) :704-714.

Czech B and Hannon GJ. (2011) . Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet.* 12 (1) :19-31.

Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. (2008) . SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature.* 454 (7200) :56-61.

De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. (2008) . Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(1):72-81.

Demory Beckler M, Higginbotham JN, Franklin JL, Ham AJ, Halvey PJ, Imasuen IE, Whitwell C, Li M, Liebler DC, Coffey RJ. (2013) . Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics.* 12 (2) :343-355.

Denko NC. (2008) . Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer.* 8 (9) :705-713.

Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK,

Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kokocinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Duttagupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood MJ, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P, King B, Kingswood C, Luo OJ, Park E, Persaud K, Preall JB, Ribeca P, Risk B, Robyr D, Sammeth M, Schaffer L, See LH, Shahab A, Skancke J, Suzuki AM, Takahashi H, Tilgner H, Trout D, Walters N, Wang H, Wrobel J, Yu Y, Ruan X, Hayashizaki Y, Harrow J, Gerstein M, Hubbard T, Reymond A, Antonarakis SE, Hannon G, Giddings MC, Ruan Y, Wold B, Carninci P, Guigó R, Gingeras TR. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 89 (7414) :101-108.

Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper A, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Loulseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabbinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 435 (7038) :43-57.

Fenton H. J. H. (1894) . Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.* 65 (65) :899-910.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) . Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9 (2) :102-114.

Géminard C, De Gassart A, Blanc L, Vidal M. (2004) . Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic.* 5 (3) :181-193.

Generali D, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Wigfield S, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S, Gandolfi V, Dogliotti L, Bottini A, Harris AL, Fox SB. (2006) . Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 12 (15) :4562-4568.

Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, Li C, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Weber BL, Simon C, Coukos G, Zhang L. (2008) . miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* 7 (2) :255-264.

Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H. (2010) . Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer.* 126 (1) :73-80.

Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, Hornstein E, Tabin CJ.

(2005) . The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102 (31) :10898-10903.

Hershey AD and Chase M. (1952) . Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol*. 36 (1) :39-56.

Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Grønberg M, Möbius W, Rhee J, Barr FA, Simons M. (2010) . Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *J Cell Biol*. 189 (2) :223-232.

Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. (2009) . Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax*. 64 (12) :1082-1089.

Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rózycki B. (2010) . Membrane budding. *Cell*. 143 (6) :875-887.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2004) . Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 21;431 (7011) :931-945.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. (1987) . Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) . *J Biol Chem*. 262 (19) :9412-9420.

Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR. (2006) .

Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* 25 (17) :3934-3942.

Kasai H. (1997) . Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res.* 387 (3) :147-163.

Kina T, Ikuta K, Takayama E, Wada K, Majumdar AS, Weissman IL, Katsura Y. (2000) . The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol.* 109, 280-287.

Komatsu N, Nakauchi H, Miwa A, Ishihara T, Eguchi M, Moroi M, Okada M, Sato Y, Wada H, Yawata Y, Suda T, Miura Y. (1991) . Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res.* 51:341-348.

Komatsu N, Yamamoto M, Fujita H, Miwa A, Hatake K, Endo T, Okano H, Katsube T, Fukumaki Y, Sassa S and Miura Y. (1993) . Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/EPO, derived from human leukemia cell line, UT-7. *Blood.* 82:456-464.

Komatsu N, Kunitama M, Yamada M, Hagiwara T, Kato T, Miyazaki H, Eguchi M, Yamamoto M, Miura Y. (1996) . Establishment and characterization of the thrombopoietin-dependent megakaryocytic cell line, UT-7/TPO. *Blood.* 87:4552-4560.

Komatsu N, Kirito K, Shimizu R, Kunitama M, Yamada M, Uchida M, Takatoku M, Eguchi M, Miura Y. (1997) . In vitro development of

erythroid and megakaryocytic cells from a UT-7 subline, UT-7/GM. *Blood*. 89, 4021-4033.

Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, Ochiya T, Kato T. (2008) . Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *Br J Haematol*. 142 (2) :293-300.

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. (2010) . Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 285 (23) :17442-17452.

Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M. (2007) . A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 27 (5) :1859-1867.

Kwon MS, Shin SH, Yim SH, Lee KY, Kang HM, Kim TM, Chung YJ. (2007) . CD63 as a biomarker for predicting the clinical outcomes in adenocarcinoma of lung. *Lung Cancer*. 57 (1) :46-53.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) . Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294 (5543) :853-858.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) . The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75 (5) :843-854.

Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. (2008) . Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA*. 14 (3) :417-424.

Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004) . An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (26) :9740-9744.

Llorente A, de Marco MC, Alonso MA. (2004) . Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line. *J Cell Sci*. 117 (Pt 22) :5343-5351.

Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S. (2009) . High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One*. 4 (4) :e5219.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. (2005) . MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 435 (7043) :834-838.

Lu Q, Zhang J, Allison R, Gay H, Yang WX, Bhowmick NA, Frelix G, Shappell S, Chen YH. (2009) . Identification of extracellular delta-catenin accumulation for prostate cancer detection. *Prostate*. 69 (4) :411-418.

Lv LH, Wan YL, Lin Y, Zhang W, Yang M, Li GL, Lin HM, Shang CZ, Chen YJ, Min J. (2012) . Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *J Biol Chem*. 287 (19) :15874-15885.

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. (2007) . MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. 317 (5845) :1764-1767.

Milani M and Harris AL. (2008) . Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *Eur J Cancer*. 44 (18) :2766-2773.

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. (2001) . Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 (15) :8780-8785.

Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. (2010) . Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 12 (1) :19-30.

Pan BT, Johnstone RM. (1983) . Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 33 (3) :967-978.

Pasquinelli AE. (2012) . MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*. 13 (4) :271-282.

Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. (2010) . Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107 (14) :6328-6333.

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. (2012) . Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 18 (6) :883-891.

Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. (2009) . Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate.* 69 (2) :159-67.

Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, Teng YE, Zhang Y, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP. (2009) . Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis.* 41 (12) :875-880.

Raposo G and Stoorvogel W. (2013) . Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 200 (4) :373-383.

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. (1996) . B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 183 (3) :1161-1172.

Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. (1997) . Accumulation of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules in Mast Cell Secretory Granules and Their Release upon Degranulation. *Mol Biol Cell.* 8 (12) :2631-2645.

Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, Jansson PJ, Lovejoy DB. (2009) . Cancer cell iron metabolism and the development of potent

iron chelators as anti-tumour agents. *Biochim Biophys Acta*. 1790 (7) :702-717.

Rigoutsos I. New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. (2009) . *Cancer Res*. 69 (8) :3245-3248.

Ronquist G and Hedström M. (1977) . Restoration of detergent-inactivated adenosine triphosphatase activity of human prostatic fluid with concanavalin A. *Biochim Biophys Acta*. 483 (2) :483-486.

Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, Barshack I. (2008) . MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*. 26 (4) :462-9.

Rouault TA. (2006) . The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol*. 2 (8) :406-414.

Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG. (2008) . A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol*. 10 (8) :987-993.

Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. (2003) . Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*. 278 (22) :20083-20090.

- Savina A, Vidal M, Colombo MI. (2002) . The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci.* 115 (Pt 12) :2505-2515.
- Sayed D and Abdellatif M. (2011) . MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev.* 91 (3) :827-887.
- Schofield CJ and Zhang Z. (1999) . Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 9 (6) :722-731.
- Segura E, Amigorena S, Théry C. (2005) . Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis.* 35 (2) :89-93.
- Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. (2009) . Modulation of microRNA processing by p53. *Nature.* 460 (7254) :529-533.
- Szymański M, Barciszewski J. (2002) . Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs. *Genome Biol.* 3 (5)
- Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. (2010) . Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 399 (3) :384-390.
- The ENCODE Project Consortium. (2012) . An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 489 (7414) :57-74.
- The FANTOM Consortium. (2005) . The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science.* 309 (5740) :1559-1563.

Thermann R and Hentze MW. (2007) . *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*. 447 (7146) :875-878

Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. (1999) . Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*. 147 (3) :599-610.

Tong WH and Rouault TA. (2006) . Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab*. 3 (3) :199-210.

Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. (2008) . Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*. 319 (5867) :1244-1247.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. (2007) . Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 9 (6) :654-659.

Vallhov H, Gutzeit C, Johansson SM, Nagy N, Paul M, Li Q, Friend S, George TC, Klein E, Scheynius A, Gabrielsson S. (2011) . Exosomes containing glycoprotein 350 released by EBV-transformed B cells selectively target B cells through CD21 and block EBV infection in vitro. *J Immunol*. 186 (1) :73-82.

Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M. (1991) . Oxygenation of

human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 51 (12) :3316-3322.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. (2006) . A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (7) :2257-61.

Wang GL and Semenza GL. (1995) . Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 270 (3) :1230-1237.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. (1995) . Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (12) :5510-5514.

Watson JD and Crick FH. (1953) . Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 171 (4356) :737-738.

Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. (2005) . Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE.* 2005 (306) :re12.

Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. (2010) . Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell.* 39 (1) :133-44.

Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. (2007) .

Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 129 (2) :303-17.

【研究業績】

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 data-bbox="277 524 1476 667">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 data-bbox="277 712 1476 815">○ 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 data-bbox="277 860 1476 1003">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 data-bbox="277 1048 1476 1151">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 data-bbox="277 1196 1476 1375">5. MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression. Mol Ther. 2011, 19(6):1123-30. Mitsuhiro 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 data-bbox="277 1420 1476 1599">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 data-bbox="277 1644 1476 1747">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 data-bbox="277 1792 1476 1895">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.

論文 (続き)	<p>9. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "Exocure" is another choice for cancer treatment. <i>Adv Drug Deliv Rev.</i> 2013, 65(3):376-82. 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. <i>PLoS ONE</i> 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>11. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. <i>Sci Rep.</i> 2013, 3: 1197. Takeshi Katsuda, Reiko Tsuchiya, Nobuyoshi Kosaka, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Kentaro Takagaki, Katsuyuki Oki, Fumitaka Takeshita, Yasuyuki Sakai, Masahiko Kuroda, Takahiro Ochiya.</p> <p>12. Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell Metastasis. <i>J Biol Chem.</i> 2013, 288(15):10849-59. Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, Keitaro Hagiwara, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.</p>
講演 (口演発表)	<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>

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 続き)	<p>8. 赤血球産生因子エリスロポエチンにより誘導されるマイクロ RNA の同定. 第 70 回 日本血液学会 京都 2008 年 10 月, 小坂展慶, 杉浦圭一, 山本雄介, <u>吉岡祐亮</u>, 宮崎洋, 小松則夫, 落谷孝広, 加藤尚志.</p> <p>9. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells in vitro and in vivo. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 神戸, 2010 年 12 月, Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.</p> <p>10. Secretory mechanism and intercellular transfer of microRNAs in living cells in vitro and in vivo. International workshop on exosomes 2011, Paris France January 2011, Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.</p> <p>11. nSMase2 regulates metastatic ability of breast cancer cells through the regulation of exosome secretion. Exosomes and Microvesicles 2011 Orlando, USA October 2011, Nobuyoshi Kosaka, <u>Yusuke Yoshioka</u>, and Takahiro Ochiya.</p> <p>12. 分泌型がん抑制性のマイクロ RNA によるがん悪性化抑制機構の解明. 第 3 回 日本 RNAi 研究会 広島, 2011 年 8 月, 小坂展慶, <u>吉岡祐亮</u>, 萩原啓太郎, 落谷孝広. (学会賞受賞)</p> <p>13. 骨肉腫のがん幹細胞様性質を制御する microRNA の同定. 第 3 回 日本 RNAi 研究会 広島, 2011 年 8 月, 藤原智洋, 小坂展慶, <u>吉岡祐亮</u>, 高橋陵宇, 竹下文隆, 川井章, 尾崎敏文, 落谷孝広.</p> <p>14. Molecular mechanisms regulating the phenotype of Tumor Initiating Cells of Osteosarcoma. 第 70 回 日本癌学会学術総会 名古屋, 2011 年 10 月, 藤原智洋, 高橋陵宇, 小坂展慶, <u>吉岡祐亮</u>, 竹下文隆, 川井章, 尾崎敏文, 落谷孝広.</p> <p>15. Micromanaging of microenvironmental endothelial cells by breast cancer cells via exosomal microRNAs. International Society for Extracellular Vesicles, Gothenburg, Sweden, April 2012, Nobuyoshi Kosaka, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.</p> <p>16. ゲノムコピー数変化を指標としたヒト乳がん細胞株の薬剤耐性獲得に関与する microRNA の探索. 第 4 回 日本 RNAi 研究会 広島, 2012 年 8 月, 竹下文隆, 山本雄介, <u>吉岡祐亮</u>, 箕浦加穂, 高橋陵宇, 田谷敏貴, 小坂展慶, 落谷孝広.</p> <p>17. 天然化合物による microRNA 発現制御機構の解明. 第 4 回 日本 RNAi 研究会 広島, 2012 年 8 月, 萩原啓太郎, 小坂展慶, <u>吉岡祐亮</u>, 竹下文隆, 落谷孝広.</p> <p>18. ヒト脂肪由来間葉系幹細胞による機能的ネプリライシンを備えたエクソソームの分泌とアルツハイマー病治療への応用. 第 4 回 日本 RNAi 研究会 広島, 2012 年 8 月, 勝田毅, 土屋玲子, 小坂展慶, <u>吉岡祐亮</u>, 高垣謙太郎, 隠岐勝幸, 竹下文隆, 酒井康行, 黒田雅彦, 落谷孝広.</p>

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 続き）	19. Stilbene family promotes Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity in breast cancer cells. 第 71 回 日本癌学会学術総会 札幌, 2012 年 9 月, Keitaro Hagiwara, Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yoshioka, Ryo-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.
講演 （ポスター 発表）	<p>20. 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>21. 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>22. 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> <p>23. 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>24. 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>25. miR-210 Maintains Iron Homeostasis in Cancer Cells by Down-Regulating ISCU and TfR. RNAi & miRNA Europe 2011 Munich, Germany, September 2011, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Nobuyoshi Kosaka, Takashi Kato, and Takahiro Ochiya. (<u>Poster Award Winner</u>)</p> <p>26. 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>27. Expression of miR-188 and miR-362 Induced by Erythropoietin Stimulation in a Human Erythrocytic Leukemia Cell Line. 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 2007, Keiichi, Sugiura, Nobuyoshi, Kosaka, Yusuke Yamamoto, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Hiroshi, Miyazaki, Norio Komatsu, Takahiro Ochiya, and Takashi Kato.</p> <p>28. Reconstruction of c-myc translocated Immunoglobulin gamma gene. 第 82 回 日本生化学会大会 神戸, 2009 年 10 月, Maki Ikeda, Takako Ishida, Tatsuhisa Sugai, <u>Yusuke Yoshioka</u>, and Takashi Kato.</p>

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 (ポスター 発表続き)	<p>29. Secretary mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells in vitro and in vivo. Keystone Symposia, (British Columbia, Canada), March 2010, Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, Fumitaka Takeshita, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Yasushi Matsuki, and Takahiro Ochiya.</p> <p>30. Sphingomyelin phosphodiesterase 3 (SMPD3) regulates metastatic ability of breast cancer cells. 40th Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Colorado, USA, March 2011, Haruhisa Iguchi, Nobuyoshi Kosaka, <u>Yusuke Yoshioka</u>, and Takahiro Ochiya.</p> <p>31. A POSSIBLE ROLE OF MICRORNA REGULATING THE PHENOTYPE OF TUMOR INITIATING CELLS OF OSTEOSARCOMA. 2011 Combined Meeting of the Connective Tissue Oncology Society (CTOS) and Musculoskeletal Tumor Society (MSTS), Chicago, USA, October, 2011, Tomohiro Fujiwara, Nobuyoshi Kosaka, Ryo-u Takahashi, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Fumitaka Takeshita, Akira Kawai, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya.</p> <p>32. Identification of lung metastasis inhibitory miR-143 target genes in human osteosarcoma cells. 第34回 日本分子生物学会年会 横浜, 2011年12月, Yui Sugimoto, Mitsuhiko Osaki, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Fumitaka Takeshita, Nobuyoshi Kosaka, Mitsuo Oshimura, and Takahiro Ochiya.</p> <p>33. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete neprilysin-bound exosome-like vesicles. International Society for Extracellular Vesicles, Gothenburg, Sweden, April 2012, Takeshi Katsuda, Reiko Tsuchiya, Nobuyoshi Kosaka, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Kentaro Takagaki, Katsuyuki Oki, Fumitaka Takeshita, Yasuyuki Sakai, and Takahiro Ochiya.</p>
講演 (招聘)	<p>1. Secretary mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in cancer cells. 第69回 日本癌学会学術総会 大阪, 2010年9月, Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya.</p> <p>2. がん悪性化における分泌型マイクロRNAの意義. 第84回 日本生化学会 京都, 2011年9月, 小坂展慶, <u>吉岡祐亮</u>, 萩原啓太郎, 竹下文隆, 落谷孝広.</p> <p>3. Functional importance of extracellular microRNAs in cancer development. 第70回 日本癌学会学術総会 名古屋, 2011年10月, Nobuyoshi Kosaka, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.</p> <p>4. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. 第71回 日本癌学会学術総会 札幌, 2012年9月, Nobuyoshi Kosaka, <u>Yusuke Yoshioka</u>, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya.</p>

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 (招聘続き)	5. A Novel Therapeutic Strategy against Tumor-initiating Cells of Osteosarcoma: microRNA Inhibition with Current Treatment. 第 71 回 日本癌学会学術総会 札幌, 2012 年 9 月, Tomohiro Fujiwara, Nobuyoshi Kosaka, Ryo-u Takahashi, <u>Yusuke Yoshioka</u> , Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, Daisuke Kubota, Tadashi Kondo, Akira Kawai, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya.
講演 (その他)	6. 低酸素環境がもたらす microRNA によるがん代謝制御. がん代謝シンポジウム 2013 東京, 2013 年 1 月, <u>吉岡祐亮</u> , 小坂展慶, 落谷孝広. 1. 造血の分子制御機構: アフリカツメガエル肝臓における血球産生, 早稲田大学 ハイテク・リサーチ・センター整備事業 第 1 回成果報告シンポジウム「早稲田大学が目指す新しい医・理・工学融合研究の展開」, 2009 年 8 月, 奥井武仁, 永澤和道, 目黒瑞枝, <u>吉岡祐亮</u> , 前川峻, 小坂(野川)菜美, 上田しのぶ, 加藤尚志.
学術雑誌 等又は商 業誌にお ける解説、 総説	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. 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. 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. 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. 5. 分泌型 microRNA による新たな細胞間コミュニケーション: エクソソームを用いた microRNA 治療への挑戦. 遺伝子医学 MOOK 23 号 P157-162, 2012 年 9 月, 小坂展慶, 萩原啓太郎, <u>吉岡祐亮</u> , 落谷孝広. 6. 細胞間を移動する miRNA の役割. 感染・炎症・免疫 第 42 巻 第 4 号 P35-43, 2013 年 1 月, <u>吉岡祐亮</u> , 小坂展慶, 落谷孝広. 7. 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.