

論 文 内 容 要 旨

Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration

(エクソソーム型 microRNA-143 は骨肉腫細胞に移行し遊走を抑制する)

Biochemical and Biophysical Research Communications, 445 :
381–387, 2014.

主指導教員：越智 光夫 教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹 教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

副指導教員：安達 伸生 准教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

新保 慶輔

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

骨肉腫は、小児悪性骨腫瘍の60%を占め、大部分が10歳代に発症する。肺転移は、骨肉腫の最も重要な合併症で、1970年代までは5年生存率が12-20%と最も予後不良な腫瘍の1つであったが、その後の多剤化学療法を導入により徐々に予後は改善し、現在では四肢発生で初発時に転移がない症例の5年生存率は70%以上にまで向上している。しかしながら、転移がある症例では、30%未満と未だ予後不良である。近年多くの骨軟部悪性腫瘍において特殊な染色体および遺伝子異常が発見され、その異常を検出することが診断に有用であることがわかってきた。しかし、現状では、その遺伝子異常をターゲットとした治療は確立しておらず、骨軟部悪性腫瘍の治療における、従来とは異なる新たな治療法の確立が望まれている。近年、ノンコーディングRNAであるmicroRNA (miRNA) が新しい遺伝子制御因子として細胞の増殖、分化、アポトーシスなどといった生命現象や疾患に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。miRNAは、約20塩基のタンパク質に翻訳されない小分子RNAであり、細胞内において標的とするmRNAの主に3'非翻訳領域に配列相補的に結合し、その標的遺伝子の発現を抑制する。これまで、miR-143の導入により骨肉腫マウスの肺転移を抑制することや、骨肉腫細胞の増殖を抑制することが報告されている。これらmiRNAは、これまで細胞内で機能し、速やかに分解されると考えられていたが、最近miRNAは、exosome (エクソソーム) といったエンドソーム由来の小胞顆粒に包まれた形で細胞外に分泌し、血漿など体液中に存在し、循環していることが明らかになってきた。そして、がん患者で高発現している分泌miRNAが報告され、診断マーカーとしての可能性も示されている。さらに興味深いことは、細胞より分泌されたmiRNAは、標的細胞内へ移動し、遺伝子発現を制御することで標的細胞の機能に関与していることが報告された。本研究において我々は、新たなドラッグデリバリーシステムとしてのエクソソームに注目し、エクソソーム型miR-143による骨肉腫細胞への影響に対し検討を行った。

方法は、導入miR-143が分泌されるかどうかを明らかにするために、間葉系幹細胞(MSC)に合成miR-143を導入後、その培養上清中のmiR-143をリアルタイムPCRで解析した。さらに、培養上清をヒト骨肉腫細胞株(143B)へ添加し、骨肉腫細胞におけるmiR-143の発現と細胞増殖能や遊走能について解析を行った。次に、培養上清中のエクソソームが骨肉腫細胞へのmiR-143の導入に関与しているかを明らかにするために、miR-143を導入したMSCの培養上清を超速心法によりエクソソーム画分とエクソソームを含まない上清画分に分離した。それらを骨肉腫細胞の培地へ添加し、同様に解析を行った。最後に、MSCを用いたエクソソーム型miR-143による骨肉腫細胞への導入法と既存のliposome (リポソーム)による導入法で、導入効率や細胞毒性などを比較した。

結果は、MSCに合成miR-143を導入すると培養上清中に分泌された。この培養上清を骨肉腫細胞に添加するとmiR-143が骨肉腫細胞に導入され、その遊走能を抑制した。そして、MSCの培養上清中に分泌されたmiR-143はエクソソーム画分に存在し、エクソソーム型miR-143として骨肉腫細胞に移入し、遊走を抑制していることが明らかになった。MSCを用いたエクソソーム型miR-143による骨肉腫細胞への導入法は、リポソームによる導入法と

比較し、導入効率は低下するが、遊走能の抑制効果に差はなく、細胞毒性の面からもリポソームによる導入法より効果的であることが示された。

以上の結果から、本論文は、合成 miR-143 を MSC へ導入することでエクソソーム型 miR-143 として分泌され、そのエクソソーム型 miR-143 は骨肉腫細胞に容易に取込まれ、遊走能を抑制するなど骨肉腫細胞の機能を制御することを示した。MSC より分泌させた抗腫瘍作用を持つ miR-143 は、エクソソームに内包された分泌型として骨肉腫細胞へ取り込まれ、増殖低下や転移の抑制に作用する新規のドラッグデリバリーシステムとして期待される。