

# 老化細胞が分泌する細胞外小胞の機能解析

岡田 恵 (博士課程 2014年4月入学 社会人)

主指導教員 田原 栄俊

## 【序論】

体細胞は分裂に伴って加齢し、持続的な分裂停止の状態である細胞老化 (replicative senescence) を迎えることが知られている。一方、細胞が酸化ストレスや放射線等の DNA ダメージを受けた場合も閾値を超えた DNA ダメージを修復することが不可能な場合にはアポトーシスを誘導するか、不可逆的な分裂停止の状態に陥る。したがって、細胞老化はアポトーシスとともに、修復不能な遺伝情報の異常を有する細胞の増殖を抑制し、がん化を防ぐための重要ながん抑制機構の一つと考えられている。生体内においても、前がん病変部 (がんの初期状態) で細胞老化特異的なマーカーが検出されることから、発がんストレスに反応して細胞老化が誘導されるということが示唆される。一方で、老化細胞は SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) と総称されるサイトカイン類を分泌し生体内で炎症を引き起こし、がんの発生に対して促進する方向に働いていることも報告されている。

本研究は、細胞老化を新たな視点から探求することを目的として、細胞間コミュニケーションに機能する細胞外小胞に注目した。細胞外小胞とは、50 - 300 nm 程度の脂質二重膜に覆われた細胞分泌性小胞の総称で、多種のタンパク質や mRNA さらに microRNA (miRNA) を含有しており、ホルモンのように他の細胞に作用して機能することから、細胞間情報伝達のメディエーターとして働いていることが知られている。これまでの研究から、細胞外小胞はがんの転移や免疫系の維持・応答に重要であることが示されているが、細胞老化における働きは明らかになっていない。

我々は老化細胞が細胞外小胞を介して、周辺の細胞に作用して細胞非自律的な働きかけを行っているのではないかと仮説を立て、老化細胞由来細胞外小胞の性状、及び機能解析を行った。本研究では、老化細胞特異的な細胞外小胞の産生・分泌経路を明らかにすると共に、細胞外小胞に含まれる因子を同定し細胞外小胞が有する生物活性を明らかにすることにより、細胞老化における細胞外小胞の生物学的意義を検討した。

## 【実験方法】

### 1) 本研究に使用した細胞

TIG-3 : ヒト胎児肺線維芽細胞 (本研究では、80回程度分裂を繰り返して細胞老化を迎え、分裂を停止して培養ディッシュ上で2週間以上生存した細胞を老化細胞と定義した。)

SiHa : ヒト子宮頸がん細胞

MDA-MB-231 : 高転移型ヒト乳腺がん細胞

### 2) 細胞外小胞の精製 : 無血清培地に交換して24時間培養してコンディショニングを行なった培養上清を回収し、

2,000 xg とその後の 12,000 xg による遠心分離操作で細胞片を除去した後、110,000 xg で70分間の超遠心分離にかけられた pellet を細胞外小胞画分とした。

3) 細胞外小胞の分析 : 粒子計測機器 qNano を用いて細胞外小胞のサイズの分析を行った。細胞外小胞がナノサイズの細孔を通過する際に発生する電気抵抗ナノパルス測定することで小胞粒子径と密度を計測した。

4) 培養細胞への siRNA、miRNA の導入 : 培養細胞に、導入試薬 RNAi MAX を用いて各人工合成 siRNA、miRNA を forward transfection にて導入した。

5) 発現ベクターを用いた過剰発現 : 培養細胞に Maspin または CHMP4C 発現ベクター を lipofection 法にて導入した。

6) 老化細胞から分泌される細胞外小胞が、がん細胞の浸潤能に与える影響の検証 : 予めマトリゲルをコートした cell culture insert に、無血清培地に懸濁した MDA-MB-231 細胞を  $1.0 \times 10^5$  個播種し、播種直後に細胞外小胞画分を添加した。12時間毎に細胞外小胞画分を新しく添加しながら、一定時間経過後の insert を回収し、マトリゲルを通過した細胞を計数した。

7) 老化細胞から分泌される細胞外小胞が、がん細胞の増殖能に与える影響の検証 : MDA-MB-231 細胞を  $5 \times 10^4$  個

24 well plate に播種し、播種直後に細胞外小胞画分を添加した。12時間毎に細胞外小胞画分を新しく添加し一定時間経過後に全細胞数を計数した。

8) 老化細胞から分泌される細胞外小胞が、がん細胞の生存率に与える影響の検証：SiHa 細胞を 6 well plate に 250個播種し、毎日新たな細胞外小胞画分を添加して培養を続け7日目に形成されたコロニー数を数えた。

9) 細胞外小胞中に存在する miRNA の発現量解析：細胞外小胞から miRNA を抽出し逆転写反応を行なった後、特異的なプライマー及び SYBR Green を用いた real-time PCR によって発現量を解析した。

10) 細胞外小胞に含まれる miRNA が、がん増殖抑制効果に与える影響の検証：MDA-MB-231 細胞に対し、各人工合成 LNA miRNA inhibitor を導入する。24時間後に再播種し、その際に細胞外小胞画分を添加する。12時間毎に新たな細胞外小胞画分を添加して、一定時間経過後の全細胞数を計数した。

## 【結果、考察】

### 1、継代早期及び老化ヒト線維芽細胞が分泌する細胞外小胞の性状比較

老化細胞が分泌する細胞外小胞の性状を明らかにするために、継代早期 TIG-3 細胞 (PDL40-50代) 由来細胞外小胞との比較を行った。小胞の大きさは両細胞において、110-135nm とほとんど変わらなかったが、1細胞あたりの分泌粒子数と細胞外小胞画分のタンパク質量は、老化細胞由来細胞外小胞が継代早期由来と比較して約5倍に増加していることが明らかになった (Fig. 1A-C)。

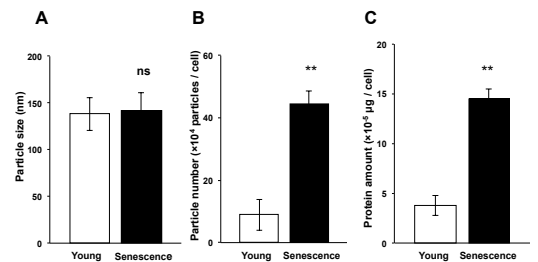


Figure 1. 継代早期の細胞 (young) と老化細胞 (senescence) から分泌される細胞外小胞の比較 \*\*  $p < 0.01$  vs young

### 2、老化細胞に特異的な細胞外小胞の分泌経路

細胞あたりの分泌粒子数と細胞外小胞画分のタンパク質量は、老化細胞 DNA ダメージを受けた細胞では、p53 依存的に細胞外小胞の分泌が亢進していることが報告されている。p53 は細胞老化誘導因子の 1 つであり、細胞老化によって発現上昇が認められることから、我々は p53 の下流遺伝子であり、細胞外小胞分泌との関連が報告されている Maspin、CHMP4C に着目し、これらの因子が老化細胞における細胞外小胞の分泌亢進に関与しているのではないかと仮定した。発現解析の結果、老化細胞では p53 の標的で老化関連遺伝子である p21 の発現が上昇すると同時に、Maspin と CHMP4C が発現上昇していることが分かった (data not shown)。次に、siRNA を用いて、Maspin、CHMP4C をそれぞれノックダウンすると、1細胞あたりから分泌される細胞外小胞数が有意に減少した (Fig. 2A)。また、発現ベクターを用いて、Maspin、あるいは CHMP4C をそれぞれ過剰発現すると、1細胞あたりから分泌される細胞外小胞の分泌が有意に増加した (Fig. 2B)。以上の結果から、老化細胞における細胞外小胞分泌亢進には、p53 の標的遺伝子である Maspin、CHMP4C の細胞老化に伴う発現上昇が関与していることが示唆された。

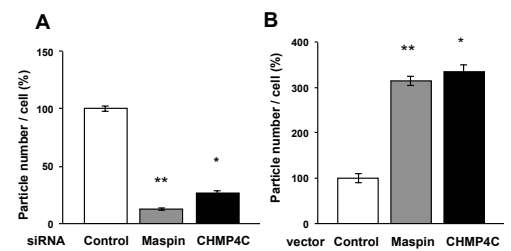


Figure 2. 細胞外小胞の分泌亢進に対する、Maspin と CHMP4C の関与の検討 \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  vs young

### 3、老化細胞由来細胞外小胞の生物学的意義の探索

細胞老化において細胞外小胞の分泌亢進が生物学的にどのような意味があるのかを明らかにするために、がん細胞に対する生物活性解析を行った。

培養上清から調製した細胞外小胞を乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞に添加したところ、老化細胞から分泌された細胞外小胞は、浸潤能を約70%抑制し (Fig. 3A)、増殖能を約35%抑制した (Fig. 3B)。またコロニー形成率から、子宮頸部がん細胞株 SiHa 細胞の生存能を約45%抑制した (Fig. 3C)。一方、継代早期の TIG-3 細胞由来の細胞外小胞を添加した場合には、SiHa 細胞のコロニー形成能にほとんど影響を与えなかった (data not shown)。

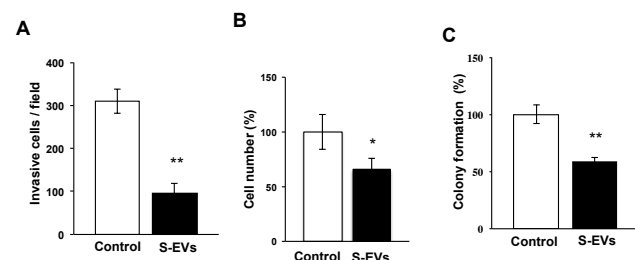


Figure 3. 老化細胞由来細胞外小胞の生物活性解析 \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  vs control

以上より、老化細胞から分泌される細胞外小胞には、がん細胞の浸潤能・増殖能・生存能を抑制する機能があることが示唆された。

#### 4、細胞外小胞に内包される miRNA の、がん細胞抑制効果への関与の検討

我々は老化細胞由来細胞外小胞のがん細胞抑制的な機能には、細胞外小胞に内包されている miRNA が関与しているのではないかと仮定し、その関与を検討した。次世代シーケンサーを用いて、小胞中の miRNA を網羅的に解析した結果、継代早期の TIG-3 細胞由来の細胞外小胞と比較して老化細胞由来の細胞外小胞には、miR-127-3p と miR-134-5p が多く含有されていることが分かった(data not shown)。また、real-time PCR にて老化細胞由来の細胞外小胞中の各 miRNA の相対的な存在量を解析したところ、これらの miRNA の存在量は継代早期の TIG-3 細胞由来と比較して、存在量が有意に多いことが明らかとなった (Fig. 4A)。次に、これらの miRNA を MDA-MB-231 細胞に導入し増殖能と浸潤能に対する影響を観察した。その結果、miR-127-3p、miR-134-5p はともに有意に MDA-MB-231 細胞の増殖 (data not shown) と浸潤を抑制した (Fig. 4B)。また、MDA-MB-231 細胞に12時間毎に老化細胞由来の細胞外小胞を添加したところ、48時間後において miR-127-3p、miR-134-5p の細胞における発現量が有意に上昇していたことから、細胞外小胞の添加によって小胞中の miRNA が MDA-MB-231 細胞に取り込まれたことが示唆された (Fig. 4C)。最後に、小胞中の miR-127-3p、miR-134-5p ががん細胞の増殖抑制に関与しているかを検討するため、miRNA を阻害する効果のある、LNA microRNA Inhibitor (LNA) を用いた実験を行なった。予め LNA-miR-127-3p と LNA-miR-134-5p を導入した MDA-MB-231 細胞に対し細胞外小胞を添加したところ、control と比較して増殖能の阻害が有意に抑制された (Fig. 4D)。

以上のことから、老化細胞からは、がん細胞の増殖や浸潤を抑制する効果のある細胞外小胞が分泌されており、それは内包された miR-127-3p と miR-134-5p が関与している可能性が示唆された。

#### 【総括】

本研究によって、細胞老化に伴いヒト正常線維芽細胞 TIG-3 では、細胞外小胞の分泌が約5倍に亢進し、この分泌亢進には細胞老化の誘導に関与するがん抑制遺伝子 p53 に依存して発現上昇する Maspin、CHMP4C が関与していることが明らかになった。また、老化細胞由来細胞外小胞はがん細胞の浸潤能や増殖能、生存能を抑制したことから、老化細胞による分泌性小胞を介したパラクリン性のがん抑制機構が示唆された。さらに、老化細胞由来細胞外小胞中には、がん細胞抑制的な機能を有する miR-127-3p と miR-134-5p がより多く含有されており、それらの miRNA が、小胞のがん抑制機構に関与していることが示唆された。

以上の様に、複製老化により増加する細胞外小胞ががんの進展に抑制的に機能し、その働きが、含有されている miRNA によって引き起こされているという本研究の結果は、がんの微小環境における細胞分泌性小胞を用いた細胞間コミュニケーションの重要性を示す知見である。

#### 【基礎となる原著論文】

Megumi Okada, Shigeyuki Teranishi, Kimiyoshi Yano, Hiroshi Suzuki, Yuki Yamamoto, Masaki Kinehara, Mariko Ikuo, Akira Shimamoto, and Hidetoshi Tahara  
Senescence-associated extracellular vesicles from fibroblast cells repress tumor growth.  
manuscript in preparation.

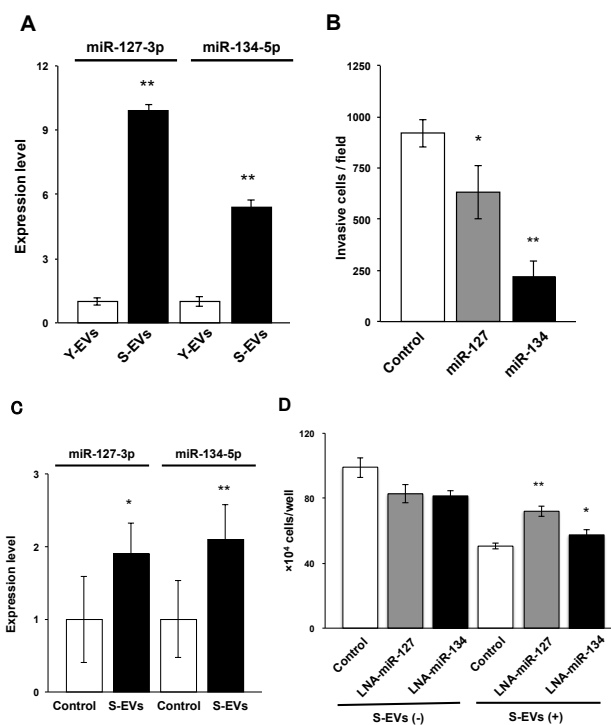


Figure 4. 細胞外小胞に内包される miRNA のがん細胞抑制効果への関与の検討  
\* p < 0.05 \*\* p < 0.01 vs control