

論文内容要旨

活性型ビタミンD₃誘導体ED-71による exosomal
microRNA を介した扁平上皮癌細胞の増殖制御

主指導教員：岡本哲治教授

(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：高田隆教授

(医歯薬保健学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

副指導教員：林堂安貴講師

(広島大学病院 顎・口腔外科)

檜垣 美雷

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

研究目的

HBp17/FGFBP-1 (heparin binding protein17/fibroblast growth factor binding protein-1)は、外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 の conditioned medium (CM)より分離精製された 17kDa の分泌タンパクで、扁平上皮細胞で特異的に発現され、FGF-1, -2 と可逆的に結合し、FGFs のスイッチ分子として FGFs の安定性・遊離・活性化に深く関与していると考えられている。さらに、同分子は、口腔扁平上皮癌(OSCC)で高発現し、その増殖や血管新生に密接に関与していることが報告されている。

活性型ビタミン D₃(1 α ,25(OH)₂D₃ (VD₃))は骨代謝において重要な働きをするとともに、心臓病や癌の予防効果も報告されている。また、VD₃ は、NF- κ B 経路を抑制することで上皮細胞の増殖を制御していることが知られている。著者の所属する研究室の先行研究で、VD₃ および誘導体 ED-71(中外製薬より供与)は、ビタミン D レセプター(VDR)—NF- κ B 経路を介し HBp17/FGFBP-1 の発現を抑制することで *in vitro* および *in vivo* で SCC の増殖を抑制することを報告してきた。

従来、増殖因子などの蛋白因子、ホルモンや脂質が regulatory chemical messenger (RCM)として正常あるいは癌細胞の autocrine あるいは paracrine 制御に重要な機能をしているとして考えられてきたが、近年、細胞が細胞外に分泌/放出する exosome も RCM として機能していることが明らかにされてきている。

本研究では、ED-71 の扁平上皮癌に対する治療薬としての有用性をさらに明らかにすることを目指して、ED-71 による SCC/OSCC 細胞における HBp17/FGFBP-1 の発現低下や増殖抑制における exosomal microRNAs (exo-miRs)の発現とその機能解析を行った。

研究方法

OSCC 由来細胞株 HO-1-N-1 (NA)、KO、Ca9-22 および A431 を用いた。細胞培養は DMEM と Ham-F12 培地を 1:1 の比率で混合した DF 培地に、insulin (10 μ g/ml), transferrin (5 μ g/ml), 2-mercaptoethanol (10 μ M), 2-aminoethanol (10 μ M), sodium selenite (10nM), oleic acid (4.7 μ g/ml)の 6 因子を加えた無血清培地 DF6F を用いた。

CM の採取および濃縮は以下の方法で行なった。80%コンフルエントまで DF6F で A431 を培養し、DF 基礎栄養培地のみでさらに 48 時間培養後、CM を採取し、限外濾過法にて 50 倍に濃縮した。A431-CM 中の exosome は、Phosphatidylserine アフィニティー法で精製し、ウェスタンブロット法および走査型電子顕微鏡 (SEM) で exosome を評価した。

Exosome 中の miR (exo-miR)の発現に及ぼす ED-71 の影響を明らかにするため、各 exosome よりフェノール/グアニジン法で miR を抽出後、miR マイクロアレイにて網羅的解析を行ない、ED-71 により A431 および Ca9-22 で発現上昇する exo-miRs を同定した。

HBp17/FGFBP-1 遺伝子の 3'-untranslated region (UTR)の配列を含んだルシフェラーゼレポーターと、同定した miR mimic を SCC/OSCC 細胞に共導入し、HBp17/FGFBP-1 発現が抑制されるか否かをレポーターアッセイ法で評価した。次に、同 miR の各細胞における発現量を

定量 RT-qPCR 法 (qPCR) で検討した。また、miR-mimic および対照として scramble RNA-mimic を SCC/OSCC 細胞に導入し、細胞増殖能、コロニー形成能、HBp17/FGFBP-1 および FGF-2 の発現を検討した。

結果

1. A431-CM-exosome は、CD9 陽性を示し、SEM 解析では 50~100nm の小胞様構造物の存在が認められた。
2. miR マイクロアレイ解析の結果、ED-71 で発現上昇する exosomal miR として miR-6887-5p を同定した。
3. HBp17/FGFBP-1 遺伝子の 3'UTR 配列を遺伝子導入した SCC/OSCC 細胞を用いたレポーターアッセイ法で、miR-6887-5p mimic は約 20~40%ルシフェラーゼ活性を抑制した。
4. ED-71 は、A431 および Ca9-22 における exosomal-miR-6887-5p の発現上昇を誘導した。
5. miR-6887-5p は、OSCC 細胞株の増殖能およびコロニー形成能を有意に抑制したが、A431 では細胞増殖およびコロニー形成能の抑制はみられなかった。
6. miR-6887-5p は、全細胞株における HBp17/FGFBP-1 の mRNA・蛋白発現を抑制したが、FGF-2 の mRNA・蛋白発現には影響を示さなかった。

考察

VD₃ および ED-71 は、SCC / OSCC 細胞に対して、VDR-NF- κ B 経路を介した増殖抑制機構に加えて、regulatory chemical messenger として exosomal miR-6887-5p の CM 中への分泌・産生を上昇させ、腫瘍細胞自身および周囲細胞に働き、HBp17 / FGFBP-1 の発現を制御することで増殖を抑制していることが考えられた。したがって、VD₃/ED-71 活性が代謝消失後も、exosomal miR-6887-5p が autocrine 的に機能するだけでなく、周囲細胞に対しても paracrine 的に機能する bystander 効果が期待され、ED-71 の扁平上皮癌に対する治療薬としての有用性がさらに示唆された。