

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 28 年 4 月 1 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名 国立研究開発法人国立がん研究センター
職 名 研究員
研 究 代 表 者 吉岡 祐亮

下記のとおり平成 27 年度の共同研究成果を報告します。
記

(課題番号:15002)

1. 共同研究課題名	内分泌機能としての Exosomal microRNA の働き-生体調節系への新たな関与因子の発見			
2. 共同研究目的	がん細胞が細胞外に分泌する microRNA を含むエクソソームを新たな生体調節に関わる因子として解析するとともに、microRNA をエクソソームにソーティングすると考えられる遺伝子の解析を共同で実施する。			
3. 共同研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ～ 平成 28 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 吉岡 祐亮	分子細胞治療研究分野	研究員	研究の総括およびエクソソームの解析	
(分担研究者) 落谷 孝広	同上	主任分野長	研究助言	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	ゲノム科学リソース分野	氏 名	畑田出穂

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

我々はがん細胞から分泌されるエクソソームが、セラミド産生酵素の1つである中性スフィンゴミエリナーゼ2(nSMase2)の働きにより分泌されることや、がん細胞が分泌する microRNA が血管内皮細胞に取り込まれ、血管新生を促進させ、がんの転移を促進することを明らかにした。この後さらに分泌機構や生理的役割、疾患における関与を明らかにしていく。また複数存在すると考えられているエクソソームの分泌経路や microRNA の詰め込みに関するメカニズムがどのようになされているかも重要な課題であり、共同研究にて CRISPE-Cas9 の系を用いて関与する遺伝子の寄与を解析する。
本年度は、エクソソームの分泌に関与する microRNA の同定およびその標的遺伝子を同定することを目的とし、これら遺伝子について解析する。

7. 共同研究の成果

エクソソームの分泌を阻害する microRNA (Exosome Secretion-Suppressive microRNAs: ESS-miRNAs) を同定するため、miRNA ライブラリを用いてスクリーニングを行った。乳がん細胞株 MDA-MB-231-D3H2LN 細胞 (MM-231LN) に各 microRNA を導入し、培養上清中に分泌される CD9 または CD63 陽性のエクソソーム量を解析した。解析方法は以前、我々が開発したハイスループットなエクソソーム検出系 ExoScreen 法を用いた。ExoScreen 法は修飾を施した2種類の抗体を用いてエクソソーム膜状タンパク質を認識し、2種類の抗体が近接する場合のみシグナルが発生する。スクリーニングの結果から複数の候補 microRNA を挙げ、さらに候補を絞り込むため、それぞれの候補 microRNA を MM-231LN に過剰発現させ、培養上清中に分泌される粒子数を、ナノ粒子トラッキングシステムを用いて測定した。これら実験結果から、エクソソームの分泌を抑制する microRNA を同定した。次いで、その microRNA の標的遺伝子を同定するため、microRNA を発現抑制または過剰発現させた細胞内の mRNA の網羅的遺伝子発現解析を行い、データベースと統合し有意な標的遺伝子を複数個同定した。現在、この標的遺伝子の機能解析を行うため、CRISPE-Cas9 の系を用いてゲノム編集を行っている。今後、ゲノム編集された細胞株を樹立して、解析を進める。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)