



Title	Exosomal microRNAs derived from colon cancer cells promote tumor progression by suppressing fibroblast TP53 expression
Author(s)	吉井, 俊輔
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76193
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 吉井 俊輔			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授	竹原 敏一郎
	副 査	大阪大学教授	土岐 祐一郎
	副 査	大阪大学教授	南 誠 章
論文審査の結果の要旨 線維芽細胞は癌微小環境の主要な構成細胞であり、p53の発現が抑制された線維芽細胞は腫瘍増殖の促進に寄与することが報告されている。しかし、癌微小環境における線維芽細胞のp53発現制御機構については明らかではなかった。一方で、癌細胞におけるp53変異は大腸癌を含む悪性腫瘍において最もよく認められる遺伝子異常の一つであり、これまでに癌細胞のp53機能欠損は癌微小環境において血管新生や間質反応の促進を介して腫瘍増大に関与することが報告されている。本論文では、p53機能欠損癌細胞が周囲の線維芽細胞に影響を与える機序のひとつとして癌細胞由来エクソソームに着目し、線維芽細胞のp53抑制機構における役割を明らかにすることを目的に研究を行った。ヒトの大腸癌細胞株および線維芽細胞株を用いた検討により、p53機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームは線維芽細胞を介して腫瘍増大に寄与すること、また大腸癌細胞のp53機能欠損により、分泌されるエクソソーム中のmicroRNA発現プロファイルが変化し、発現上昇したmicroRNAが線維芽細胞のp53発現を抑制しうることを見出した。以上の論文内容につき、学位に値すると考える。			

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	吉井 俊輔
論文題名 Title	Exosomal microRNAs derived from colon cancer cells promote tumor progression by suppressing fibroblast <i>TP53</i> expression(大腸癌細胞由来エクソソームは線維芽細胞p53発現抑制を介して腫瘍増大を促進する)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 線維芽細胞は癌間質の主要な構成細胞であり、癌の進展を多面的に促進させる点で正常組織の線維芽細胞と異なるとされる。癌間質の <i>TP53</i> 発現と <i>ACTA2</i> (α-SMA) 発現が逆相関し、<i>TP53</i> 抑制線維芽細胞は腫瘍増殖を促進することが報告されているが、癌微小環境における線維芽細胞の <i>TP53</i> 遺伝子発現制御機構については明らかになっていない。 一方で、癌細胞 <i>TP53</i> 変異は大腸癌を含む悪性腫瘍において最もよく認められる遺伝子異常の一つである。これまでに、癌細胞のp53機能欠損は癌微小環境において周囲の細胞にも影響を与え、血管新生や間質反応の促進を介して腫瘍増大を亢進することを報告したが、p53発現変化が周囲の細胞に影響を与える機序のひとつとして、癌細胞が分泌するエクソソームが受容した線維芽細胞の遺伝子発現に影響し、腫瘍増大を促進させる可能性が考えられる。 今回、大腸癌細胞-線維芽細胞間のクロストークにおける癌細胞由来エクソソームの意義を癌細胞p53機能欠損に着目して検討した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ヒト大腸癌細胞株 (p53野生型HCT116)、線維芽細胞株 (CCD-18Co, WI-38) を用いた。癌細胞のp53機能欠損の意義を検討するため、shRNAを用いてp53抑制HCT116を作成し、野生型HCT116と比較した。エクソソームは癌細胞培養上清より超遠心法を用いて回収した。In vivoでの腫瘍増大はXenograft皮下接種モデルで検討した。エクソソーム中miRNAの発現変化をマイクロアレイ解析で検討した。 p53抑制HCT116との分離共培養で線維芽細胞の <i>TP53</i> 発現は抑制され、細胞増殖は亢進した。Xenograftモデルにてp53抑制HCT116は線維芽細胞共接種で野生型HCT116に比して有意な腫瘍増大を認めたが、癌細胞Rab27Aを抑制し、エクソソーム分泌を抑制すると、その腫瘍増大は有意に抑制された。次にp53野生型HCT116由来、p53抑制HCT116由来エクソソームをそれぞれ線維芽細胞に添加したところ、p53抑制HCT116由来エクソソームによって線維芽細胞の <i>TP53</i> 発現は抑制され、細胞増殖は亢進した。p53野生型HCT116由来、p53抑制HCT116由来エクソソームを比較すると、同一細胞数の野生型HCT116とp53抑制HCT116から回収されたエクソソームでタンパク量や粒子数に有意差を認めず、粒子径や線維芽細胞への取り込みにも差を認めなかった。そこで、野生型HCT116由来とp53抑制HCT116由来エクソソームに内包されるmiRNAを比較するために、miRNAマイクロアレイ解析を行った。エクソソームに内包される多くのmiRNA発現量が癌細胞p53抑制によって変動していることが明らかになり、その中でmiRDBデータベースを用いて <i>TP53</i> 遺伝子を標的としうるmiRNAを検索したところ、41個のmiRNAが該当した。これら <i>TP53</i> 遺伝子を抑制しうるmiRNAのほとんどがp53抑制HCT116由来エクソソームで増加していた。そこでさらに発現比、発現量、<i>TP53</i> 標的指向性 (miRDBデータベースにおけるTarget score) をもとに3つのmiRNA (miR 1249-5p, miR 6737-5p, miR 6819-5p) に着目して機能解析を行った。これらのmiRNAを強制発現させると線維芽細胞のp53は抑制された。また、これらのmiRNA特異的阻害剤を導入し、miRNA発現を抑制することで、線維芽細胞p53発現は回復することが分かった。 〔総 括(Conclusion)〕 p53機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームは線維芽細胞を介した腫瘍増大に寄与していた。また、大腸癌細胞のp53機能欠損により、エクソソーム中miRNA発現が変化し、エクソソームを受容した線維芽細胞p53発現抑制を介して腫瘍進展に寄与する可能性が示唆された。	