

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09051

研究課題名(和文) 抗がん剤による膵がん細胞の浸潤形質獲得の分子機構の解明とがん治療への応用

研究課題名(英文) The elucidation of the molecular mechanism about the acquisition of pancreatic cancer invasion ability and application to cancer therapy

研究代表者

島崎 猛夫 (SHIMASAKI, Takeo)

金沢医科大学・総合医学研究所・准教授

研究者番号：50377420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生物学においてエクソソームを含めた細胞外小胞が各種細胞のコミュニケーションに大きな役割を果たしていることが明らかになり、論文数は劇的に増加している。エクソソームは、自然な細胞の相互作用のキープレイヤーの一つであり、真にその役割を解析するには、生体内で起きている現象を再現し、相互作用についての研究を行う必要がある。これまでに共培養を利用した研究は多く行われているが、現時点で共培養技術を利用したエクソソーム研究は、比較的少ない。また、エクソソームの動態と抗癌剤の関係は明らかとなっていない。我々は、エクソソームの動態に対する抗癌剤の影響について新しい共培養容器を使用して解析を行った。

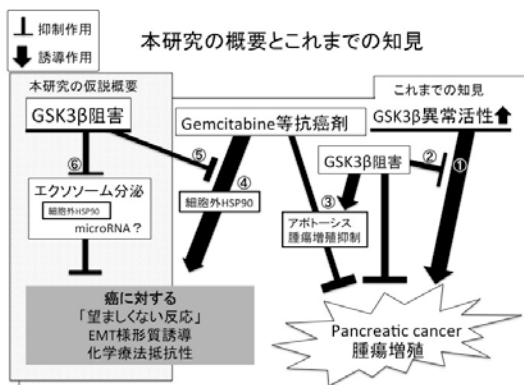
研究成果の概要(英文)：In biological systems, extracellular vesicles including exosomes have been recently revealed to play a significant role in the communication between various cells, and the number of papers in this subject has dramatically increased. Exosomes are only one of many key players in natural cellular interactions. Reproducing the phenomena occurring in vivo and investigating the interactions is required in order to fully examine their role. For exosome research, observing natural interactions is co-culturing technique. While the co-culturing technique has been used in many studies thus far, its application to exosomes research has been limited. Also, the relation between exosome dynamics and anti-cancer drug are uncertain. Therefore, we analyzed about the effect of the anti-cancer agent on dynamics of exosome using new co-culture plate.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：エクソソーム 抗癌剤 共培養

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は強度の浸潤、転移性と各種治療に抵抗性を示す難治癌である。化学療法、放射線治療、各種分子標的薬剤が治療に導入されているが、最新の治療成績を持ってしても切除不能膵癌の全生存期間は、1年以内である。このため、膵癌の診断と治療の改善には、その高度の浸潤性や抗癌剤抵抗性に関わる分子病態の理解は重要であり、膵癌の生物学的特性に立脚した新しい治療法の開発が望まれる。一方、抗がん剤や放射線治療に伴い癌細胞に膵癌細胞の浸潤に好都合な形態、機能変化である epithelial-mesenchymal transition(EMT)などの浸潤性形質変化が起きることは膵癌、大腸癌や乳癌などで報告さ



れている。これらは、腫瘍の浸潤や化学療法抵抗性と関与している可能性が指摘されており、「望ましくない反応」といえる。

我々は、これまでの研究にて、膵癌の抗癌剤である Gemcitabine により、膵癌培養細胞に EMT を誘導することを見出し、膵癌の治療薬が、化学療法抵抗性と関係し、望ましくない治療抵抗性を一部誘導している可能性に着目した。そして、それらの作用機序や治療抵抗性解除のための分子標的を見出すために検討を行うこととした。これまでの研究にて、Gemcitabine により膵癌細胞から培養上清に Heat Shock Protein90 (HSP90) が誘導されることを明らかにしていたことと、それらの分泌がある阻害剤により抑制されることを見出していた<sup>文献1、2</sup>。その Gemcitabine による EMT 誘導効果の作用機序を明らかにするためにエクソソームの関与について着目した。エクソソームは、近年注目されている細胞から分泌される 50nm~300nm の大きさで、内部にタンパク質や DNA、RNA、マイクロ RNA などの機能性物質を包含するとされている。エクソソームには、HSP90 が含まれていることが報告されており、我々は、これまでに見出した知見が、エクソソームを介した反応ではないかと考えるようになった。これまでにエクソソーム中に含まれるマイクロ RNA や蛋白などの物質を介して、転移や浸潤と関係していることが示唆されてきた。しかし、これまで

に薬剤とエクソソームの関連を明らかにした報告は、数少なく、相互作用の観点を含めてエクソソームを評価した研究は少ない。そこで、本研究では、抗癌剤によるエクソソームの発現変動及びある阻害剤によるエクソソームの発現変化について検討を行うこととした。

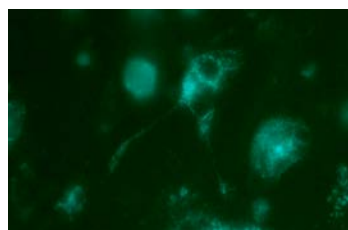
### 2. 研究の目的

本研究では、一過性の抗癌剤により早期に誘導される浸潤形質の一つの EMT 誘導効果に対する特性を理解し、新しい膵癌治療法開発の分子基盤を明らかにする。

- (1) 膵癌細胞内外のエクソソームについて、数や大きさ、形成過程などの動態を生細胞のタイムラプス蛍光顕微鏡観察により明らかにする。
- (2) 各種抗癌剤、ある阻害剤の各種刺激によるエクソソームの分泌に及ぼす影響を明らかにする。
- (3) 我々が開発した連結式相互作用観察培養プレートを使用して、相互作用しあう両方の細胞を可視化しながら、薬剤に暴露された時の相互作用について明らかにする。特に薬剤による変化について、エクソソームは、細胞自身が産生した内来性エクソソームと、隣の細胞が産生した外来性ソームの両者が存在することから、その両者を識別しながら、エクソソームの動態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

エクソソームには CD63 が好発現している



ことから、CD63-GFP 融合遺伝子を用いて CD63 融合 GFP/luciferase 発現安定膵癌細胞株 (ePANC-1) を樹立した (左写真)。

これらの細胞により、細胞内でのエクソソームの挙動を明らかにすることができる。これら新たに樹立した ePANC-1 をはじめとする複数の膵癌細胞株と、既に所有している膵管上皮由来の正常細胞 PE を用いて解析を行った。これらの細胞株に対して、膵癌で使用される抗癌剤 (GEM、5FU) を作用させ、エクソソームの状態の変化を観察した。

本研究の特徴には、その解析方法にも特徴がある。



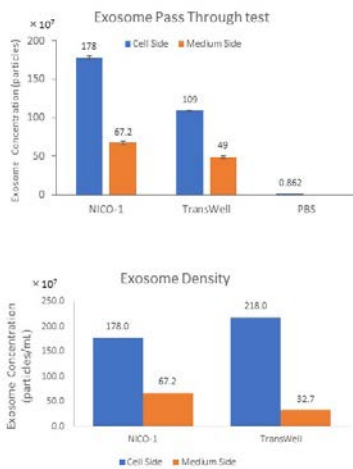
細胞間相互作用の評価について、相互作用解析に研究代表者が開発した横方向連結式相互作用観察培養プレート（左写真）

を用いて解析した。従来の研究ツールと異なり、横方向で細胞上清を共有するタイプの培養容器であり、その底面は顕微鏡観察が可能になっているという特徴を持つ。そのため、両者ともに顕微鏡で観察が可能であり、また、両者の細胞の底面の素材が同一で、間にフィルターを介して液性因子の交流が可能であるという特徴を持つ。フィルターの孔径を変えれば、行き来する細胞間物質をコントロールできるという特徴を持つ。また、従来の上下タイプの共培養プレート（トランスウェルあるいはセルカルチャーインサートと呼ばれる）では、上側の細胞培養容器の細胞数がコンフルエントになると、上下での培養液中の各種因子の交流は、細胞自身によりブロックされることにより、低下する。そのため、共培養効果が時間とともに低下するというデメリットが存在した。新しい培養容器では、共培養の効果が高いため、相互のエクソソーム授受の効果を確認するためには、有利である。そのため、今回の研究では、主に横方向での連結式共培養容器を用いて、癌細胞同士、各種正常細胞との組み合わせで検討を行った。

### 研究結果について

今回、新しい培養容器を用いて、エクソソームの相互作用を観察することから、まずは、従来の培養容器との比較実験を行った。

### NICO-1/Trans Well比較実験



上図「NICO-1/Trans Well 比較実験」の結果に示すように、同じ細胞数の細胞から分泌されたエクソソームが、対側の培養容器でどれくらいエクソソームが 48 時間後に検出さ

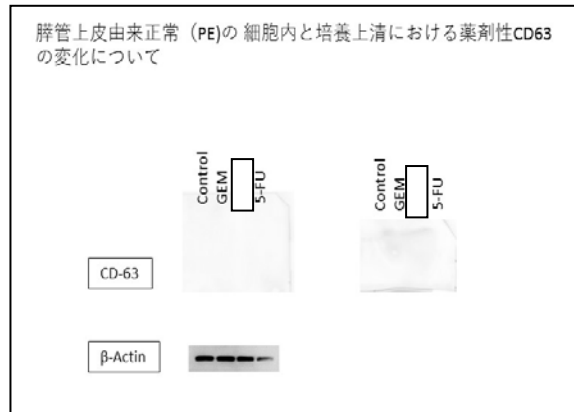
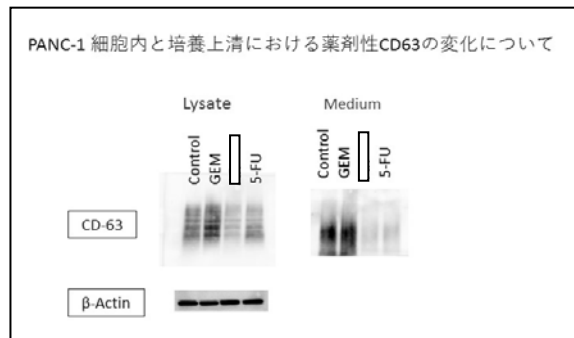
れるかについて、粒子測定装置 Nano Sight を用いて測定した。対側容器で検出されるエクソソームの個数（上グラフ）と、そのエクソソームの密度（下グラフ）を示す。横方向の共培養容器 NICO-1 は、上下タイプの容器と比較して、そのエクソソームの密度では、2 倍の密度であり、エクソソーム共培養研究においては、上下タイプより横方向の共培養容器の方が有利であることが明らかとなった。

次に、薬剤によるエクソソーム産生・分泌への影響についての評価を行った。

エクソソームには、エンドソーム関連蛋白質 (GTPase, annexins, flotillin) や MBV 形成機構に関わる蛋白質 (Alix, TSG101)、表面にはテトラスパニン類 (CD9, CD63, CD81)、熱ショック蛋白質 (HSP70, HSP90)、脂質関連蛋白質、ホスホリパーゼなどの存在が報告されている<sup>文献3, 4)</sup>。なかでも、エクソソーム表面のテトラスパニンは、エクソソームのマーカーとして考えられており、我々も、これらの指標を一つのエクソソーム産生や分泌の指標として評価を行った。

下図の如く、膵癌細胞株 PANC-1 に対して、抗癌剤 Gemcitabine 及び 5FU 及びある阻害剤（特許出願の関係で現在は匿名化した）を IC70 の濃度で作用させたところ、エクソソーム表面マーカーである CD63 の発現が変動した。

Gemcitabine (1nM) では、発現が増強し、5FU (20 μM) では、発現は同程度であった（下図）（測定条件は、それぞれ細胞数を同じに揃え、β-actin の発現量にて同量の検体であることを確認した）。



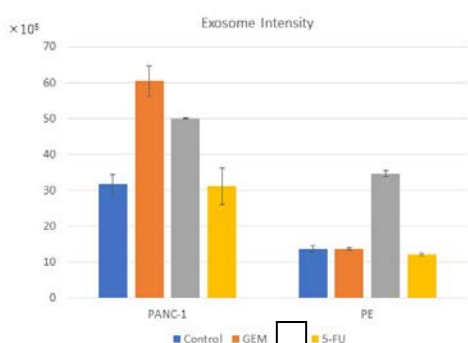
一方、正常膵管上皮由来細胞 PE では、CD63

の発現は認めず、また薬剤による変動も認めなかった。PE は、CD63 の発現は認めないものの、CD81 は発現しており、細胞の種類によって、表面マーカーとなるテトラスパニン類の発現量に大きな違いがあることが明らかとなった。

次に培養上清における実際のエクソソーム数における変化について粒子数測定装置を用いて測定した。

下グラフに示す如く、これまでと同様に Gemcitabine によりエクソソームの粒子数も増加し、5FU では変化を認めなかったことから、エクソソーム表面マーカーCD63 の変動と同じ結果であった。Gemcitabine は 5FU と同

### エクソソーム粒子数の薬剤による変化



系統の核酸アナログによる抗癌剤であるが、そのエクソソームに対する影響は異なることが明らかとなった。一方、ある阻害剤では、培養上清のエクソソーム数は増加したが、CD63 の発現は減少していることから、単純にエクソソーム数に対する影響だけではなく、エクソソームの生成や分泌に対する動態に影響を与えている可能性が示唆された。

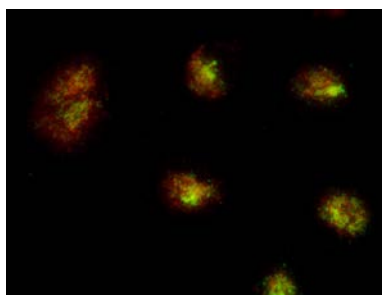
これらの結果は、癌細胞では薬剤によってエクソソームの産生量を増加させる薬剤や変化を与えない薬剤が存在することが判明した。一方、正常系細胞ではそのような変化を認めなかったことから、我々のこれまでの仮説である「抗癌剤による癌細胞の望ましくない反応」がエクソソームレベルでも存在することが明らかとなった。

### エクソソームの由来の識別について

エクソソームを可視化するには、表面マーカーに GFP 等の蛍光ラベルを付加する方法が用いられる。しかし、エクソソームに蛍光ラベルを付加するだけでは、蛍光観察されるエクソソームは、自身の細胞が産生したエクソソームと、隣の細胞が産生したエクソソームの 2 種類のエクソソームが存在する。薬剤によるエクソソーム動態に与える影響について観察する場合は、これから出ていこうとする内来性エクソソームと、受け取ったエクソソームを区別する必要がある。そのため、我々は、共培養容器で、それぞれの容器に

別々の蛍光ラベルを付加した細胞を培養することにより、エクソソームの由来を区別することを試みた。

下写真に示す如く、GFP (緑) でラベルされた細胞に、RFP (赤) のエクソソームの取り込みを観察することに成功した。一つの細胞内に内来性エクソソームと外来性エクソソームが存在し、一部それらが重複して黄色になっている部分が存在することから、これらの結果は、外来性エクソソームの蛋白を再利用している可能性を示唆すると思われた。これらについては、今後の更なる解析が必要である。



### 4. 研究成果

(1) がん細胞内のエクソソーム量と培養上清に検出されるエクソソームは、相関していることが明らかとなった。

(2) 抗癌剤の種類により、細胞内エクソソーム量と培養上清に分泌されるエクソソームの量が増加することが明らかとなった。特に同じ系統の薬剤でも、Gemcitabine ではエクソソームは増量し、5FU では同程度～やや減少した。

(3) 細胞内エクソソームの局在については、Gemcitabine では、糸状突起変化の先端部分に検出されたのに対し、5FU では、細胞内での集中像を認めた。

(4) ある阻害剤では、細胞内 CD63 量は増加したが、培養上清に検出される CD63 量は減少した。ところが、培養上清のエクソソーム数は増加していたことから、エクソソームの組成に影響を与えている可能性が示唆された。

(5) エクソソームの分泌・取り込みを評価するために共培養容器を用いて、内来性エクソソームと外来性エクソソームを分けて観察することに成功した。

### 本研究の趣旨について

本研究では、エクソソームの分量の変化のみで組成や機能の解析は、結果として報告できるまでには至っていない。エクソソームの評価方法等が難しく、それらの解析技術を確立することと、代表研究者の病気療養のために、予定していた研究範囲より少なくなりました。

しかし、これまでにエクソソームの分泌量が、薬剤や細胞の状態によりどのように変化



するかという基本的な点については、ほとんど明らかにされていない。実際は、このような基本的な解析がなされていない状態で、その組成や機能の変化が、「がんとエクソソーム」として論じられており、単純にエクソソームの数が増えた結果であるのか、エクソソームの数は増えていないが、その組成が大きく変わったのかという違いは、科学的には重要な課題である。そのため、組成の変化についての解析を行う前に、基本的な分泌動態を解析して、その前提を確認した上で組成や機能解析を行う必要があると考えた。また、これらの研究にあたり、当初 IC50 付近で実験を行った。エクソソームは細胞が壊れると上清に多量に検出されるようになる。もともと抗癌剤であり、かなりの細胞が死ぬような量で実験を行っても、細胞が壊れた結果を見ていることになり、エクソソームの動態に与える影響を観察できないため、細胞が死なない IC70~90 前後での機能解析を行った。

本研究の理論的背景は、抗癌剤を投与しても、がん細胞が集団で存在しているために、すべての細胞に IC20~30 のような高濃度の抗癌剤に暴露させることができず、一部の細胞には IC80~90 程度にしかならないことを想定して、そのような場合に起きる現象を確認する必要があると考え、実験を行った。

#### 引用文献)

- 1) Kitano A, Shimasaki T, Minamoto T, et al. Aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. *PLoS One*. 8 (2): e55289, 2013. Epub 2013 Feb 8.
- 2) Shimasaki T, Kitano A, Minamoto T, et al. Aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in the development of pancreatic cancer. *J Carcinog*. 11(1):15, 2012.
- 3)J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Conde-Vancells. Proteome Res*. 2008; 7: 5157–5166.
- 4) SubraC, GrandD, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*. 2010; 51: 2105–2120.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Takeo Shimasaki, Satoko Yamamoto, Tomiyasu Arisawa. Exosome research and co-culture study. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 1311–1321 (2018). 査読有
- 2) 島崎猛夫、源利成、他。特集：膵がん研究の Cutting Edge, 膵癌の悪性形質 (増殖、浸潤と治療不応性) を繋ぐ治療標的 GSK3 $\beta$ , 肝胆膵 2017 査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ① 島崎猛夫、山本聡子、源利成、他。膵癌細胞の

エクソソーム動態の解析、第 48 回日本膵臓学会、2017 年

- ② 島崎猛夫、山本聡子、源利成、他。抗癌剤による膵癌細胞のエクソソーム動態への影響、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
- ③ 島崎猛夫、山本聡子、源利成、他。Influence of anti-cancer drug against exosome dynamics and production in pancreatic cancer cells. 金沢大学がん進展制御研究所 50 周年記念国際シンポジウム、2017 年
- ④ 島崎猛夫、山本聡子。膵がん細胞における抗癌剤によるエクソソーム動態の変化、第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2017 年
- ⑤ 島崎猛夫、山本聡子、源利成、他。抗癌剤による膵癌細胞のエクソソーム動態への影響、第 28 回日本消化器癌発生学会総会、2017 年
- ⑥ 島崎猛夫、源利成、他。抗癌剤により膵癌細胞に誘導される EMT 促進因子の同定と機能解析：GSK3 $\beta$  阻害による制御、第 46 回日本膵臓学会、2015 年
- ⑦ 山本聡子、島崎猛夫、源利成、他。Investigation of intercellular communication in cancer via exosomes with a new special device NICO-1. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年
- ⑧ 島崎猛夫、山本聡子、源利成、他。抗癌剤により膵がん細胞に誘導される分子とエクソソームを介した細胞間相互作用の解析。第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

名称：細胞培養容器

発明者：島崎猛夫、他

権利者：学校法人金沢医科大学、伸晃化学株式会社

種類：特許

番号：特願 2014-135535

取得年月日：平成 30 年 6 月 12 日

国内外の別：国内

名称：膵臓癌治療剤

発明者：島崎猛夫、源利成、他

権利者：学校法人金沢医科大学、国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特願 2013-093072

取得年月日：平成 29 年 5 月 19 日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 猛夫 (SHIMASAKI, Takeo)

金沢医科大学・総合医学研究所・准教授

研究者番号：50377420

(2) 研究分担者

石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：20232275

中村 有香 (NAKAMURA, Yuka)  
金沢医科大学・総合医学研究所・助手  
研究者番号：00565632

山本 聡子 (YAMAMOTO, Satoko)  
金沢医科大学・総合医学研究所・助手  
研究者番号：00768161

(3)連携研究者

源 利成 (MINAMOTO, Toshinari)  
金沢大学・がん進展制御研究所・教授  
研究者番号：50239323

落谷 孝広 (OCHIYA, Takahiro)  
独立行政法人国立がん研究センター・分子細胞  
治療研究分野・分野長  
研究者番号：60192530