

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19326

研究課題名(和文) 癌と線維芽細胞のクロストークにおけるエクソソームの役割

研究課題名(英文) The role of exosome in the crosstalk between cancer cells and fibroblast

研究代表者

林 義人 (Hayashi, Yoshito)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80647123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、癌細胞が線維芽細胞を活性化し癌関連線維芽細胞様の形質を誘導すること、その活性化機構に癌細胞から分泌されるエクソソームが重要であることを明らかにすることを目的とした。細胞株と免疫不全マウスを用いた検討により、p53機能欠損大腸癌細胞との共在により線維芽細胞が活性化され、VEGFの分泌が促進することで腫瘍増大をきたすことを示した。また、p53機能欠損大腸癌細胞から分泌されるエクソソーム中に含まれ線維芽細胞を活性化するマイクロRNAを同定した。本研究により癌細胞から分泌されるエクソソームやマイクロRNAが新規治療標的や有効なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to reveal the mechanism of the activation of fibroblasts by cancer cells and the role of cancer-derived exosomes as the communication tool between cancer cells and fibroblasts. We studied the effect of co-existence of cancer cells and fibroblasts using cell lines and nude mice. It is indicated that p53 deficiency played a pivotal role in activation of fibroblast to produce VEGF via ROS production, resulting in tumor progression. We detected the microRNAs in the cancer-derived exosome which activated fibroblasts. These raise the possibility of the cancer-driven exosome as the novel therapeutic target or the useful biomarker.

研究分野：消化器癌

キーワード：癌関連線維芽細胞 癌微小環境

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対する薬物療法の進歩は近年目覚ましいものがあるが、未だに難治性悪性腫瘍の一つである。これまでに癌細胞の特性に注目して癌細胞そのものを標的とした治療開発が進んできたが、癌の増殖には、線維芽細胞、炎症細胞、免疫細胞、血管内皮細胞など、様々な細胞と癌細胞とのクロストークが重要であり、これらは癌微小環境と総称されて、治療標的としての可能性を探る研究が進んでいる。その中でも、線維芽細胞は大きな役割を果たし、癌関連線維芽細胞と呼称され、様々な癌の浸潤や転移、予後に寄与することが明らかとなっている。しかし、癌細胞の生存・増殖を利するような環境を提供する形質を獲得するメカニズムは明らかではない。一方で、細胞間相互作用において、近年エクソソームの重要性が相次いで報告されている。我々は、p53 機能欠損癌細胞が線維芽細胞を活性化させて、その結果として癌の増殖を著明に促進させる役割を果たしている知見を得たため、p53 機能欠損大腸癌細胞と線維芽細胞との相互作用におけるエクソソームの役割に注目した。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞が線維芽細胞を活性化す

る機構を明らかにすること、さらにその機構におけるエクソソームの意義を明らかにしその機能解析を行うことを目的とし、大腸癌の新規治療標的としての可能性やバイオマーカーとしての有用性を検討することとした。

3. 研究の方法

p53 欠損癌細胞株を作成し、p53 野生型/欠損型大腸癌細胞と線維芽細胞を共在させることで、線維芽細胞の遺伝子発現の変化を解析し、ヌードマウス皮下移植腫瘍モデルを用いて腫瘍増大の有無を検討した。次に、p53 欠損・変異癌細胞より分泌されたエクソソームが、線維芽細胞の形質変化に与える影響について解析した。最後に、線維芽細胞を活性化させるエクソソーム中に含まれるマイクロ RNA を網羅的に解析し、同定したマイクロ RNA の機能解析を行った。また、p53 欠損・変異に伴うマイクロ RNA の発現制御機構を検討した。

4. 研究成果

大腸癌細胞株 HCT116 に shRNA を用いることにより p53 機能欠損大腸癌細胞株を作成した。ヌードマウスにおける皮下移植モデルにより、p53 欠損癌細胞と線維芽細胞の共接種

により腫瘍増大が有意に認められることを見出した。腫瘍を詳細に検討すると、p53 欠損癌細胞と線維芽細胞を共接種した腫瘍において微小血管が著明に増加していることが明らかとなったため、in vitro において p53 欠損癌細胞と共培養した線維芽細胞を解析すると、有意に SMA や VEGF の発現が亢進していることが明らかとなった。Tube formation assay により、p53 欠損癌細胞と線維芽細胞を共培養した際の培養上清に分泌された VEGF が血管新生能を有していることがわかり、線維芽細胞の VEGF を siRNA により抑制させると、皮下移植腫瘍モデルにおいて、p53 癌細胞と共接種した腫瘍においても腫瘍増大が有意に抑制された。

次に、p53 欠損癌細胞および p53 変異癌細胞から分泌されるエクソソームを抽出し、線維芽細胞に添加する実験を行った。野生型癌細胞のエクソソームと比較して、線維芽細胞における SMA、VEGF、TGF などの癌関連線維芽細胞関連マーカーは上昇した。エクソソームの分泌機構において重要な Rab27a の発現を癌細胞において siRNA を用いて抑制すると、線維芽細胞との共接種によって認められる皮下移植腫瘍モデルマウスの腫瘍増大は有意に抑制された。p53 野生型癌細胞と比較して、p53 欠損癌細胞や p53 変異癌細胞から

のエクソソームの量の増加は認めなかった。これらの結果から、p53 機能欠損により癌細胞から分泌されるエクソソーム中の因子が変動し、線維芽細胞を活性化し、腫瘍増大に寄与する可能性が示唆された。

そこで、p53 野生型大腸癌細胞株と p53 機能欠損大腸癌細胞株のそれぞれの培養上清から得たエクソソームからマイクロ RNA を抽出し、マイクロアレイ法を用いて網羅的に比較検討した。さらに、公開されているデータベースを用いて線維芽細胞活性化機構に寄与するマイクロ RNA を絞り込み、線維芽細胞株に添加しその活性度を検討することで、線維芽細胞を活性化させるマイクロ RNA を同定した。これらのマイクロ RNA の発現は、p53 発現を抑制した癌細胞から分泌されるエクソソーム中に増加することを見出した。

以上の結果より、p53 欠損・変異大腸癌細胞から分泌されるエクソソームが線維芽細胞を活性化させる機序が腫瘍増大に関与する可能性が示され、今後新たな治療標的や有効なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

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1件)

Yoshito Hayashi, Masahiko Tsujii, Takahiro Kodama, Tomofumi Akasaka, Jumpei Kondo, Hayato Hikita, Takuya Inoue, Yoshiki Tsujii, Akira Maekawa, Shunsuke Yoshii, Shinichiro Shinzaki, Kenji Watabe, Yasuhiko Tomita, Masahiro Inoue, Tomohide Tatsumi, Hideki Iijima, Tetsuo Takehara (2016) p53 functional deficiency in human colon cancer cells promotes fibroblast-mediated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis*. 37: 972-984. 査読有.

〔学会発表〕(計6件)

林義人、辻井正彦、竹原徹郎 . p53 機能欠損大腸癌における線維芽細胞の役割 . 第 101 回消化器病学会総会 . 2015 年 4 月 24 日 . 仙台 .

Yoshito Hayashi, Masahiko Tsujii, Takuya Inoue, Yoshiki Tsujii, Akira Maekawa, Tetsuji Fujinaga, Kengo Nagai, Syunsuke Yoshii, Hayato Hikita, Satoshi Hiyama, Shinichiro Shinzaki, Hideki Iijima, Tetsuo Takehara. (2015) A possible mechanism of fibroblasts to be involved in progression of p53-deficient tumors. DDW2015. Washington, USA, May 19.

林義人、辻井正彦、竹原徹郎 . p53 不活性化大腸癌における癌微小環境 . 第 26 回消化器癌発生学会 2015 年 11 月 20 日 . 米子 .

林義人、辻井正彦、竹原徹郎 . p53 機能欠損大腸癌の微小環境における VEGF の役割 . 第 102 回日本消化器病学会総会 . 2016 年 4 月 23 日 . 東京 .

林義人、井上貴功、木村圭一、疋田隼人、重川稔、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎 . 大腸癌微小環境において、線維芽細胞由来 IL-11 は腫瘍進展に寄与する . 第 75 回日本癌学会総会 . 2016 年 10 月 7 日 . 横浜 .

Yoshito Hayashi, Shunsuke Yoshii, Yoshiki Tsujii, Takanori Inoue, Keiichi Kimura, Akihiko Sakatani, Kengo Nagai, Tetsuji Fujinaga, Satoshi Hiyama, Shinichiro Shinzaki, Kenji Watabe, Hideki Iijima, Tetsuo Takehara. (2017) Exosomes derived from colon cancer cells promote tumor progression via the activation of fibroblasts in tumor microenvironment. DDW 2017. Chicago, USA, May 7.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

該当なし

取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ等：

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/research_a.html

データ更新中

6．研究組織

(1)研究代表者

林 義人 (Yoshito Hayashi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80647123