

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15704

研究課題名(和文) 卵巣がん細胞由来エクソソームによる新規腹膜播種メカニズム解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of peritoneal dissemination mechanism by exosome from ovarian cancer and development of new treatment

研究代表者

吉川 史隆 (Kikkawa, Fumitaka)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40224985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣がんが分泌するエクソソームが、腹膜播種を促進することを発見した。同所移植マウスモデルでは、がん細胞由来のエクソソームが、腹膜転移を促進させ、腹膜中皮細胞の形態変化を起こすことを認めた。この形態変化はアポトーシス誘導によるものと判明した。抽出したエクソソームを投与した中皮細胞で有意にMMP1遺伝子が上昇していた。データベース解析より、MMP1が卵巣がんの重要な予後規定因子であることが分かった。腹水中にMMP1遺伝子を多く含むがん患者群が存在することが分かった。MMP1遺伝子を含有したエクソソームは患者予後を予測するバイオマーカーとして、また将来的な腹膜転移を抑制する治療標的として期待できる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the exosome from ovarian cancer stimulated the peritoneal dissemination. By mouse model the exosome also prompted abdominal metastasis and causes morphological change in mesothelial cells. This phenomenon was caused by induction of apoptosis. We observed that the exosome increased MMP1 expression in mesothelial cells. Using clinical data base, we observed that MMP1 is an important prognostic marker and there are ovarian cancer patients with ascites including MMP1 mRNA. In conclusion, the exosome including MMP1 mRNA may be a prognostic biomarker and a treatment target for preventing abdominal metastasis.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣癌 腹膜播種 エクソソーム MMP1

1. 研究開始当初の背景

本研究では、卵巣がんの重要な予後因子の一つである腹膜転移を対象とし、未だ明らかにされていない、新しい転移メカニズムを解明する。我々は、細胞間相互作用に關与する細胞外膜小胞であるエクソソームに着目し、最近、マウスを用いた実験系で、卵巣がん細胞が分泌するエクソソームが腹膜転移を促進させることを発見した。本研究により、腹膜転移を規定するエクソソーム関連分子を同定し、臨床検体を用いて妥当性および有効性を明らかにする。さらに同分子により、それを標的とした診断・治療等の臨床応用へと展開させることを目的とする。

2. 研究の目的

(1) 研究の学術的背景

卵巣がんは、婦人科悪性腫瘍の中で最も予後不良ながん種であり、罹患率死亡率とも上昇の一途を辿っている。卵巣がん細胞は、腹膜の主要構成細胞である中皮細胞と親和性が高く、極めて腹膜転移を起こしやすいことが知られており、腹膜転移が重要な予後因子の一つとなっている。腹膜転移に対する薬物治療は現在も確立されておらず、またその分子メカニズムもほとんど明らかにされていない。我々は、これまで卵巣がん細胞と中皮細胞の相互作用、およびその微小環境に着目し、腹膜転移メカニズム解明を目指し多くの報告を行ってきた (Yuan et al. Cancer Res 2013, Sekiya et al. Carcinogenesis 2014 他)。さらに近年、我々はその相互作用の中で microRNA が重要な役割を担うことを明らかにした (Sugiyama et al. Mol Cancer Ther 2014)。これらの研究を通じ、卵巣がんの腹膜転移のメカニズム解明のために、microRNA からさらに発展させた新しい概念である細胞外膜小胞エクソソームに着目することで、より臨床応用の確実性が高い新しい転移メカニズムが解明できると考えた。

細胞外膜小胞の一つであるエクソソームは、エンドソームに由来する直径 100nm 前後の微細な小胞であり、がん細胞のみならず様々な細胞から分泌されていることが報告されている。さらに、これらエクソソームに内包される miRNA やタンパク質などの分子が受け手となる細胞で機能することで、細胞間相互作用に關与することが報告されている (Valadi et al. Nat Cell Biol 2007 他)。このことから、卵巣がん細胞から分泌されるエクソソーム、および内包される分子の解析は、腹膜転移成立過程における、がん細胞と周囲細胞との新しい相互作用メカニズムの解明に、大きな可能性を秘めていると期待される。

(2) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

最近、我々は動物実験において、卵巣がん細胞が分泌するエクソソームが腹膜転移を促進させることを発見した。本研究の期間内

に、腹膜転移を規定するエクソソーム関連分子を同定するとともに、その生物学的作用を明らかにし、臨床検体を用いてその妥当性を示す。その上で標的分子に対する治療戦略を開発する。

(3) 当該分野における本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義

本研究は国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野 (落谷孝広研究室) との共同研究であり、同研究グループはエクソソーム研究において国内随一の実績を持つ。最近でもがん転移に関する重要な研究成果を報告しており (Tomimaga et al. Nat Commun 2015 他) エクソソームの取り扱いおよび実験方法に習熟している。エクソソームのがん転移に関するメカニズム解明の歴史は浅く、腹膜転移におけるエクソソームの機能解析は未だ報告がない。本研究により、腹膜転移を規定するエクソソーム関連分子が同定されれば、その意義は当該分野のみにとどまらず、がんの生物学特性に対する制御機構の解明についても、新たな展開をもたらすものとなる。

3. 研究の方法

我々は最近、卵巣がん細胞が分泌するエクソソームがマウスの実験系で腹膜転移を促進させることを発見し、さらに、エクソソームの受け手と考えられる腹膜中皮細胞の形態変化を起こすことを発見した。腹膜中皮を単層に培養し腹膜を模倣させた後、卵巣がん細胞由来のエクソソームを添加することで、その模倣腹膜を破壊できることが分かった。さらに、我々はごく最近、中皮細胞内での遺伝子発現解析 (マイクロアレイ解析) を行い、がん細胞由来エクソソームによる中皮細胞内の発現変化を確認した。これらの結果から、卵巣がん細胞由来エクソソームが何らかの悪性形質を有しており、腹膜転移の際に促進的に働くことが強く示唆された。

我々はエクソソーム構成分子の中でも特に microRNA などの核酸に着目し、遺伝子変化を引き起こした原因分子を同定する。具体的には、中皮細胞の遺伝子発現解析の結果を、独立した実験系で再評価し、有意に変化した遺伝子を選定する。パスウェイ解析を並行して行い、エクソソームに含まれる分子の中で、中皮細胞の遺伝子変化を引き起こしうる分子を絞り込む。その際、核酸に着目する場合はエクソソームのマイクロアレイ解析、蛋白に着目する場合はエクソソームのプロテオーム解析の施行を検討する。絞り込んだ遺伝子の中皮細胞内で過剰発現もしくは発現抑制させ、その妥当性を評価する。その際、エクソソーム内の原因分子の制御も行い、評価を追加する。エクソソームに関する機能解析ではどれも標準的な方法であり、エクソソーム関連分子の同定は十分可能と考える。エクソソーム関連原因分子を同定した後、臨床検体による検討を行う。最終的な計画とし

て治療のツールとして用いることを想定すると、同定した分子が実際に卵巣がん患者由来サンプルで同様に存在していることが不可欠である。対象はエクソソームを豊富に含み、がん細胞も媒介する腹水を主な対象とし、血清などでも検討する。名古屋大学附属病院、および国立がん研究センター中央病院の卵巣腫瘍にて手術を行う症例から、本人を含めた家族との同意と、施設倫理審査委員会の承認のもと、収集を行う。エクソソームは現在、超遠心法を用いて分離を行うのが一般的であるが、腹水からの回収の場合、脂質の量や血液の混入度合いなど、その性状が一定でないため、より安定的に効率よくエクソソームを単離する方法を確立させる必要がある。段階的な遠心法、適切なサイズのフィルターの併用、密度購買を利用した単離、もしくは今日各社が市販を開始している、エクソソーム回収キットの検討など、より理想的な方法を、国立がん研究センターと共同で確立する。

臨床検体での検討は単に発現確認ではなく、必ず、患者のオミックス情報とリンクさせ、より臨床的に有意義な疾患バイオマーカーとしての可能性も検討する。腹膜転移と関わる分子が得られると思われるため再発との関連や予後予測、卵巣がんの特徴である多彩な組織型との関連も検討する。エクソソームは複合的構造体であるため、単一の分子のみならず複数の分子を認識することで、より特異性の高い標的が得られる可能性を秘めている。共同で研究を行う国立がん研究センターのグループは Exoscreen というアッセイ方法を有しており、これはエクソソーム上の二つタンパクを認識して検知することができる (Yoshioka et al. Nat Commun 2014)。この技術の利用を視野に入れつつ、同定分子の疾患バイオマーカーとしての可能性を検討する。

卵巣がんの腹膜転移は、化学療法に一時は奏功しつつも、その後再発を繰り返すといったケースが多い。また腹膜転移をしていても、基本的にはどこかで外科的切除を行う。エクソソーム関連の治療法はこれらの柱となるような治療にとって代わるものでなく、その効果を補完するような、現行の治療をより強化する目的で使用されることが想定される。

エクソソームに関連した治療法は、その研究の歴史が浅いためか、現在のところ存在しない。しかし、エクソソームを同定する技術、特定のエクソソームを認識する技術は確実に進化しており、エクソソームに関連した疾患の理解が進めば、必ずや近い将来登場する新規治療法となると考えられる。

具体的には、同定した分子を標的として、卵巣がんマウスモデルを用いて、がん由来エクソソームの阻害を試みる。同定した分子次第でその戦略は変わるが、まずは標的分子の抗体などを用いて、腹腔内投与より検討を開始する。腹腔内投与には白金製剤の腹腔内投与の歴史が物語るように、副作用との関連が

問題となる。しかし、より特異性の高い分子が同定できれば、副反応はより抑えられると考えられ、エクソソームの阻害という戦略は副作用の点においても、有利と考えられる。動物実験では同時に血管内投与も行う。動物実験の系で良好な結果が得られれば、臨床検体に阻害剤を作用させるといった、臨床検体を *in vitro* で評価する計画である。その後、臨床試験に向けて研究を展開していく。エクソソームを標的とした治療モデルが確立できれば、その意義は世界的にも極めて大きなものとなり、必ずや将来的に臨床現場に還元されるものとなる。

本研究では、卵巣がんの重要な予後因子の一つである、腹膜転移に関わるエクソソーム関連分子を同定し、その妥当性を評価しつつ、治療開発へと展開する。具体的な研究の進め方は (1)動物実験で転移を促進した卵巣がん細胞由来エクソソームを対象として、中皮細胞との相互作用に着目した *in vitro* の実験系による検討を用いつつ、原因分子の同定を行う。(2)同定した分子の妥当性を示すために、臨床検体での評価を行う。特に腹水中のエクソソームに関しては、そのエクソソーム分離に関する取り扱いの最適方法を確立する。また、同分子の疾患バイオマーカーとしての可能性も検討する。(3)同定分子に対する阻害による効果等を、動物実験を用いて検討し治療モデルを開発する。

4. 研究成果

本研究では、卵巣がん細胞が分泌するエクソソームが、腹膜播種性転移を促進することを発見した。初めに、卵巣がん細胞同所移植マウスモデルの実験系において、高転移能を有する卵巣がん細胞由来のエクソソームが、腹膜転移を促進させることがわかった。さらに、エクソソームの受け手と考えられる腹膜中皮細胞に着目し同細胞の形態変化を起こすことを同定した。また、中皮細胞の形態変化はアポトーシス誘導によるものとカスパーゼ活性試験や他の事象より判明した。同様の現象がマウスの腹膜でも起こることを、マウス腹膜の組織切片を作成することで証明した。エクソソームの腹膜に与える影響は電子顕微鏡による解析により詳細に把握することができた。また、TUNEL 染色を行うことでアポトーシスが起きていることも確認した。これら事象の原因となる遺伝子を特定すべく、種々のエクソソームを投与した中皮細胞から RNA を抽出し、メッセンジャーRNA マイクロアレイ解析を行った。結果、高転移能を有する卵巣がん細胞 ES-2 細胞から抽出したエクソソーム (ES-2exo) を投与した中皮細胞で有意に MMP1 遺伝子が上昇していることが分かった。この上昇の原因を同定すべく検討をした結果、ES-2exo には intact な MMP1 遺伝子が内包されていることを発見した。すなわち、中皮細胞内の MMP1 の発現上昇はエクソソームによる直接輸送であることが分

かった。さらに、MMP1 が受け手の中皮細胞内でタンパク質へ翻訳されることや、MMP1 の発現抑制実験、強制発現実験の結果から MMP1 遺伝子が中皮細胞のアポトーシスに必要な遺伝子であることを示した。

次に、癌のヒト組織サンプルの遺伝子発現を蓄積しているデータベースを利用して解析した結果、MMP1 が卵巣がんにとって重要な予後規定因子であることが分かり、さらに、ステージ 1 の初期卵巣がん患者においては MMP1 の発現が予後をより精度高く予測することが分かった。卵巣がん患者の腹水中のエクソソームに、MMP1 を多く含む、ES-2exo のようなエクソソームが存在するのかを、腹水サンプルを用いて検討した結果、明らかに MMP1 遺伝子を多く含むがん患者群が存在することが分かった。さらにその MMP1 遺伝子量は腹水採取前に化学療法を受けると低下する傾向にあった。以上から、MMP1 遺伝子を含むエクソソームは患者予後を予測するバイオマーカーとして、また将来的な腹膜転移を抑制するような治療標的として、多くの可能性を有していると期待できると考える。

エクソソームに関連した癌治療法は、その研究の歴史が浅いこともあり、現在のところ存在しない。本研究により悪性の鍵となるエクソソーム（悪性エクソソーム）を同定したため、同エクソソームを特異的に阻害する治療方針について検討する。低分子化合物ライブラリーを使用しスクリーニングを行い、悪性エクソソームのみを阻害する分子の同定を試みた。いくつかの候補は同定されたものの、その詳細な機能解析、および動物実験での検討は現在検討中である。同時に、別のアプローチとして、エクソソーム特異タンパクの同定を目指す。卵巣癌が放出するエクソソーム特異的な膜タンパクが同定できれば、同分子を標的とした治療モデルが想定できる（Nishida-Aoki N, et al., Molecular Therapy, 2017）。腹水や腫瘍サンプルを用いてプロテオーム解析を用いて、臨床サンプルから、卵巣癌エクソソーム特異抗原の探索を行うために患者サンプルの収集を行っている。タンパク質量分析による網羅解析を予定しており、現在条件検討を行っている。

本研究成果はエクソソームをベースとした新たな疾患理解を創出し、さらには次の段階への解析へと繋がる意義の大きいものと考えられる。

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)

Akira Yokoi, Yusuke Yoshioka, Yusuke Yamamoto, Mitsuya Ishikawa, Shun-ichi Ikeda, Tomoyasu Kato, Tohru Kiyono, Fumitaka Takeshita, Hiroaki Kajiyama,

Fumitaka Kikkawa & Takahiro Ochiya
Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer.

Nature Communications

査読有

8 巻、2017、1-15

DOI: 10.1038/ncomms14470

〔学会発表〕(計 5 件)

Akira Yokoi, Yusuke Yoshioka, Yusuke Yamamoto, Mitsuya Ishikawa, Tomoyasu Kato, Tohru Kiyono, Hiroaki Kajiyama, Fumitaka Kikkawa and Takahiro Ochiya. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer 第 76 回日本癌学会総会. 横浜 2017 9/28-30

Akira Yokoi, Yusuke Yoshioka, Yusuke Yamamoto, Tomoyasu Kato, Hiroaki Kajiyama, Fumitaka Kikkawa, Takahiro Ochiya. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. The 2017 Annual Meeting of International Society for Extracellular Vesicles. (Tronto, Canada. May, 18 - 21, 2017)

Akira Yokoi, Takahiro Ochiya. Malignant extracellular vesicles cause mesothelial cell damage toward peritoneal dissemination in ovarian cancer. The 11th Biennial Ovarian Cancer Research Symposium Organized by AACR. (Seattle, Washington, September, 12 - 13, 2016)

Akira Yokoi, Yusuke Yoshioka, Yusuke Yamamoto, Mitsuya Ishikawa, Tomoyasu Kato, Tohru Kiyono, Hiroaki Kajiyama, Fumitaka Kikkawa and Takahiro Ochiya. Malignant extracellular vesicles accelerate peritoneal metastasis by damaging mesothelium in ovarian cancer. 第 75 回日本癌学会総会. 横浜 2016 10/6-8

Akira Yokoi, Yusuke Yoshioka, Yusuke Yamamoto, Tomoyasu Kato, Takahiro Ochiya. Ovarian cancer-derived extracellular vesicles promote peritoneal metastasis by destruction of peritoneum. Exosomes/Microvesicles: Novel Mechanisms of Cell-Cell Communication; Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. (Keystone, Colorado USA, June, 19 - 22, 2016)

〔図書〕(計 1 件)

横井 暁, 吉岡 祐亮, 落谷 孝広. 乳癌におけるエクソソーム研究 The current state of exosome research in breast cancer. 乳癌の臨床, Japanese Journal of

Breast Cancer 32(1): 97 (21-29) , 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：卵巣がんの予後診断マーカーとしてのMMP 1 遺伝子転写産物
発明者：落谷 孝広、横井 暁、加藤 友康
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、株式会社バイオメティクスシンパシーズ
種類：特許
番号：特願 2016-121392
出願年月日：2016 年 6 月 20 日
国内外の別： 国外、国際特許分類 C12N 15/09

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 史隆 (KIKKAWA, Fumitaka)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40224985

(2)研究分担者

梶山 広明 (KAJIYAMA, Hiroaki)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00345886

柴田 清住 (SHIBATA, Kiyosumi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90335026

横井 暁 (YOKOI, Akira)
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員
研究者番号：30737135

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()