

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19948

研究課題名(和文)胃癌における血球由来exosomeを介した新たな癌の進展機序の解明と臨床への応用

研究課題名(英文)The effect of erythrocyte-derived microvesicles on the malignant potential of gastric cancer

研究代表者

有田 智洋(Arita, Tomohiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00756794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球が分泌した小胞体が胃癌細胞や腹膜細胞に取り込まれる様子を蛍光免疫染色法で確認した。胃癌患者の赤血球由来の小胞体を取り込んだ胃癌細胞は、腹膜との接着能、創傷治癒能、遊走能が亢進することが確認された一方で、こうした現象は非担癌患者の赤血球由来の小胞体を胃癌細胞に取り込ませて観察されなかった。胃癌患者赤血球由来の小胞体を取り込んだ胃癌細胞内の遺伝子変化を網羅的に解析したところ、いくつかの癌遺伝子の発現が亢進していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Erythrocyte-derived microvesicles (EDM) were ingested into the cellular cytoplasm using fluorescence microscopy. EDMs from patients with gastric cancer enhanced the adhesive, wound healing and migratory ability of gastric cancer cell. Several oncogenes were up-regulated in EDM-ingested gastric cancer cell.

研究分野：消化器外科学

キーワード：extracellular vesicle erythrocyte exosome gastric cancer

1. 研究開始当初の背景

exosome に内包された microRNA は能動的に体液中に分泌され、極めて安定した状態で存在する。これら exosome には microRNA のみならず、mRNA、DNA 等の核酸や様々なタンパクも封入されている。一方でこれら細胞外の microRNA が細胞膜に癒合することで細胞外に能動的に分泌されるとされている。細胞外 microRNA が、他のサイトカイン同様、細胞間の情報交換のメディエーターとして機能していることが証明されつつあり、癌の進展における新たな機序として一躍注目を浴びている (Valadi-Het al. Nature Cell Biol:2007, Kosaka-N et al. Front Genet:2013)。

これまで我々は、exosome に封入された microRNA を含む circulating RNA に注目し、消化器癌のバイオマーカーとしての可能性や、化学療法感受性ならびに治療効果判定への臨床応用について研究・報告を行ってきた (Arita T et al. Anticancer Res:2013, Hirajima S et al. Br J Cancer:2013, Kawaguchi T et al. Br J Cancer:2013, Komatsu S et al. Anticancer Res:2013, etc.)。また、細胞から放出された exosome の機能的役割にも着目し、癌細胞株を用いた検討で、癌細胞由来 exosome が周囲の癌細胞や腹膜中皮細胞等に取り込まれ、recipient cell の形質を変化させることで、癌転移に有利な転移環境の構築を行う可能性について報告した (Arita T et al. Oncotarget:2016)。

本研究課題はその研究課程で生じた全く新たな発想に基づいて計画されたものである。高度に進行した担癌患者における血球成分の異常は以前から知られており、中でも癌の進展に伴う溶血ならびに貧血の進行や血小板の減少等は、実地臨床では頻りに経験される事象であり、担癌患者の治療に当たって妨げとなることもしばしば経験する。原因として、異常血管による溶血や凝固異常、化学療法による影響等が考えられてきたが、一方で、血球成分に極めて多くの microRNA が含有されており (Pritchard-CC et al. Cancer Prev Res:2012)、microvesicle が能動的に分泌され、細胞間情報伝達の一助を担っていることも報告されている (Regev-Rudzki N et al. Cell:2013)。我々は実際に、溶血した血漿における多数の microRNA の発現亢進を確認しており、これらの microRNA が赤血球由来である可能性を強く示唆する結果と思われる。

2. 研究の目的

無核の血球成分から分泌される extracellular vesicles (EV) に着目し、『血球から放出・分泌された EV が、癌組織ならびに周囲組織に取り込まれ、癌に有利な微小環境を整備し、更なる癌の悪性度獲得に関与している』との仮説を立て、血球成分由来 EV

の他細胞への取り込みならびに情報伝達の可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血球分離と EV 抽出・ラベリング

胃癌患者および健常対照者の末梢血液中の血球成分を遠心法で分離し、赤血球を抽出した。Exosome を除去した FBS (Exo-FBS, SBI 社) を添加した細胞培養液を用いて赤血球を培養し、培養上清に分泌された血球由来 EV を回収するため、0.22 μ m フィルターを通した後、超遠心法 (100,000g、70 分、2 回) で EV を収集した。これらの EV を PKH67 でラベリングし、胃癌細胞株 (MKN45, MKN74 など) および血管内皮細胞 (HUVEC)、腹膜中皮細胞 (MeT-5A) の培養液中に添加した後に、EV の recipient cells への取り込みを蛍光免疫染色にて確認した。

(2) 血球由来 EV による細胞機能解析の検討

血球由来 EV の培養液中への添加の有無による各細胞株の各種機能解析を行った。具体的には、1) MTT アッセイによる細胞増殖アッセイ、2) wound healing アッセイ、3) Boyden chamber assay 法による癌細胞の遊走・浸潤アッセイ、4) 中皮細胞を用いた癌細胞との接着アッセイについて検討し、これらの細胞機能の変化を観察・評価した。さらに、非担癌健常者からの各血球成分由来の EV 添加による解析も行い、担癌患者の各血球成分由来 EV 添加による結果との比較検討も行った。

(3) 担癌患者各血球中 EV 由来の癌悪性度関連 microRNA ならびに責任分子の同定 担癌患者各血球成分中の EV 由来の癌悪性度関連 microRNA 候補の選定

胃癌患者 (3 例) ならびに健常対象者 3 名の末梢血液サンプルより抽出した血球由来 EV から total RNA を抽出し、(mirVana PARIS kit, Life Technologies 社)、microRNA microarray 解析 (3D-Gene, Toray 社) で microRNA の網羅的解析を行い、癌患者特異的な microRNA の候補を選定した。これらの候補 miR と、前述 1. で行った細胞機能解析の結果を比較検討し、癌細胞の悪性度獲得に関与する可能性のある microRNA を選定した。各細胞への血球由来 EV の取り込み前後の胃癌細胞株からも同様の手順で total RNA を抽出し、細胞内での RNA の変化についても microarray を用いて比較検討した。

4. 研究成果

(1) 血球由来 EV の分泌と細胞内への取り込みの確認

遠心法で分離した赤血球を細胞培養液に混和させ、12 時間培養し、再度遠心して培養上清を抽出した。0.22 μ m のフィルターを通し、超遠心法で上清中の EV を抽出し、PKH67 でラ

ベリングした EV を胃癌細胞株、大腸癌細胞株、腹膜中皮細胞に添加し 12 時間後に蛍光免疫染色法で観察したところ、細胞の種類に関わらず、各種細胞質内への取り込みが確認された。

(2) 細胞機能アッセイ

MTT assay

進行胃癌・大腸癌患者、非担癌患者の赤血球由来 EV を抽出し、胃癌細胞株 (MKN45) および大腸癌細胞株 (HT29) に添加し、MTT アッセイを行なったが、EV の添加による細胞増殖能の変化は観察されなかった。

wound healing assay

と同様に EV を添加して wound healing アッセイを施行した。進行胃癌、大腸癌患者の赤血球由来 EV の添加は、胃癌細胞株、大腸癌細胞株の創傷治癒能を有意に亢進させた。非担癌患者の赤血球由来 EV の添加で同様の現象は観察されなかった。

Invasion and Migration assay

同様に EV を添加し、浸潤・遊走アッセイを行った。担癌患者赤血球由来 EV の添加は、胃癌細胞株の浸潤能に変化を齎さなかったが、遊走能を有意に亢進させた。非担癌患者の赤血球由来 EV では浸潤・遊走に変化を認めなかった。

接着アッセイ

シート状に培養し、腹膜に見立てた中皮細胞 (MeT-5A) に、Calcein AM で標識した胃癌細胞 (MKN45) を添加し、吸光度を用いて中皮細胞と癌細胞の接着能を評価した。まず、中皮細胞に血球由来 EV を取り込ませたが、h 腹膜に対する胃癌細胞の接着能に変化は観察されなかった。一方で、胃癌細胞に EV を取り込ませた上で同様のアッセイを行ったところ、中皮細胞と癌細胞の接着能は有意に亢進した。

以上より、担癌患者赤血球由来 EV は、癌細胞に作用し、遊走、接着能を亢進させていることが示唆され、そのメカニズムについて以下のように検討を進めている。

(3) 担癌患者各血球中 exosome 由来の癌悪性度関連 microRNA ならびに責任分子の同定

まず、非担癌患者の赤血球由来 EV から total RNA を抽出し、real time RT-PCR 法にて exosomal microRNA と報告の多い miR-16 と miR-21 を測定し、EV 内に存在していることならびに detect が可能であることを確認した。そこで、胃癌患者 3 名、非担癌患者 3 名の赤血球が分泌する EV を回収し、microRNA microarray 解析を行った。担癌患者赤血球由来 EV は非担癌患者と比較して多くの microRNA の発現が亢進している事が確認された。既報で oncomiR として報告の多いものも含まれており、いくつかの候補 miR に注目して validation study を施行中である。また、EV を取り込んだ胃癌細胞内で起こっている遺伝子発現変化を検討すべく、microarray 解析も行なったが、こちらもいくつかの癌遺伝子の発現が亢進している事が確認された。細

胞機能アッセイで見られた現象は、細胞に取り込まれた EV 中に含まれる microRNA が機能する事により細胞内の遺伝子発現が変化することによって生じているとの仮説を立て、現在そのメカニズムについて検討をしている。

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 件)

[学会発表](計 6 件)

2017 年 10 月 22 日

日本癌治療学会(横浜)

「The effect of Erythrocyte-derived Microvesicles on the Malignant Potential of Gastric and Colorectal Cancer」

2017 年 10 月 14 日

日本消化器関連学会週間(福岡)

「血液中、腹水中の細胞外小胞体の消化器腹膜播種に対する機能解明と新たな治療への試み」

2017 年 9 月 30 日

日本癌学会(横浜)

「The effect of Erythrocyte-derived Microvesicles on the Malignant Potential of Gastric and Colorectal Cancer」

2017 年 5 月 18 日

International society of extracellular vesicles (カナダ・トロント)

「The effect of Erythrocyte-derived Microvesicles on the Malignant Potential of Gastric and Colorectal Cancer」

2016 年 7 月 14 日

第 71 回日本消化器外科学会(徳島)

「Exogenous Factors in Development of Peritoneal Metastasis of Gastric Cancer」

2016 年 9 月 15 日

第 27 回日本消化器癌発生学会(鹿児島)

「Exogenous Factors in Development of Peritoneal Metastasis of Gastric Cancer」

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 智洋 (TOMOHIRO Arita)
京都府立医科大学・消化器外科・助教
研究者番号：00756794

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

小西博貴 (KONISHI Hirotaka)
京都府立医科大学 消化器外科 助教
小松周平 (KOMATSU Shuhei)
京都府立医科大学 消化器外科 特任講師
塩崎敦 (SHIOZAKI Atsushi)
京都府立医科大学 消化器外科 講師
市川大輔 (ICHIKAWA Daisuke)
山梨大学 総合研究部 教授
大辻英吾 (OTSUJI Eigo)
京都府立医科大学 消化器外科 教授