

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10636

研究課題名（和文）大腸癌肝転移・腹膜播種におけるexosomeによる微小環境誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of microenvironment induction mechanism by exosome in liver metastasis and peritoneal dissemination of colorectal cancer

研究代表者

藤田 逸人（FUJITA, Hayato）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40611281

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌手術症例の切除標本より静脈血を採取し、exosomeの抽出や、exosome由来のmicroRNA抽出を検討したが、解析に十分な量を確保することが困難であった。一方で、Stage Ⅳ大腸癌症例における治療の問題点の一つである化学療法抵抗性と癌間質相互作用の関連性について別のアプローチとして検討した。シンクロトロン放射X線蛍光分光分析（SR-XRF）を用い、Oxaliplatinの腫瘍内分布を定量化し、化学療法抵抗性との関連について解析を行ったところ、腫瘍間質のOxaliplatin濃度の高値が、化学療法反応性に対し、独立した予測因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の生存率は改善しつつあるが、死亡者数は依然増加傾向にある。原発巣のみならず転移巣における周囲の微小環境と癌間質相互作用の重要性が注目されており、Stage Ⅳであっても転移巣の制御により長期生存例が報告されており、特にその重要性が高い。今回Spring-8を用いたSR-XRF分析によって、初めてヒトの腫瘍組織中の微細な白金元素の分布を可視化・定量化することに成功した。この結果は、腫瘍間質における白金の集積が大腸癌における治療効果と関連していることを示しており、SR-XRF分析という手法が、白金系抗腫瘍薬の治療効果予測や治療抵抗性機序の解明に新たな情報をもたらすことができると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Portal vein blood was collected from a resected specimen of a colorectal cancer surgery case, and exosome extraction and exosome-derived microRNA extraction were performed, but it was difficult to secure a sufficient amount for analysis.

On the other hand, we examined the relationship between chemoresistance and cancer-stroma interaction, which is one of the problems of treatment in stage Ⅳ colorectal cancer cases, by another approach. The intratumoral distribution of Oxaliplatin was quantified using synchrotron radiation X-ray fluorescence spectroscopy (SR-XRF), and the relationship with chemoresistance was analyzed. High levels of Oxaliplatin in the tumor stroma were found to be independent predictors of chemotherapy responsiveness.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸癌 肝転移 腹膜播種 exosome 抗癌剤耐性 蛍光分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

各種画像診断による発見頻度の増加、手術手技の向上や化学療法の進歩にもかかわらず、Stage IV 大腸癌症例(遠隔転移・腹膜播種症例)は必ずしも満足いく成績ではない(Stage IV 大腸癌の5年生存率は18% 大腸癌治療ガイドライン 2014年)。遠隔転移・腹膜播種のハイリスク群を手術前後に選別することができれば必要な抗癌剤を効果的にかつ早期に投与でき、個別化治療が可能となる。最終的には予後改善かつ医療費削減につながると考えられ、このような新規治療法の開発は、社会的要請度・貢献度・緊急性が高いと考えられる。

exosome (extracellular vesicles)という細胞外微細顆粒がニッチを形成し癌転移を誘導することが報告された。Exosome は癌細胞を含む全ての細胞から分泌される直径30~100nmほどの脂質二重膜により形成される小胞で、内部にタンパク質、RNA、DNAなどが格納されており、血液中のRNase、DNaseから守られている。癌間質相互作用を担う新たな液性因子として注目されているが、詳細はまだ判明していない。

また、癌細胞と間質細胞が相互に作用しその悪性度を増す癌間質相互作用が報告され(Nature,2004,Bhowmick)、その研究が世界的に進められている。特に間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)が種々の液性因子の分泌を介して癌細胞のEMT(epithelial-to-mesenchymal transition)を誘導し大腸癌の転移に関与することが明らかになった(PLoS One, 2012, Jing)。

さらに、骨髄由来間葉系幹細胞が転移巣においてニッチとして癌細胞の増殖を支持するという報告もあり、これらのことから、癌細胞あるいは間質細胞由来のexosomeがニッチを誘導し、遠隔臓器での微小転移巣形成にも関与しているのではないかと本研究者は考えた。

2. 研究の目的

大腸癌の遠隔転移・腹膜播種形成において微小環境がどのように関与しているのかを検討し、そのメカニズムを解明することを目的としている。大腸癌の進展に対して促進的に作用する特定の間質細胞集団およびその責任分子を同定し、それらを応用した新規大腸癌治療法を開発し、癌間質のリモデリングにより大腸癌の遠隔転移を制御し得る画期的な治療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

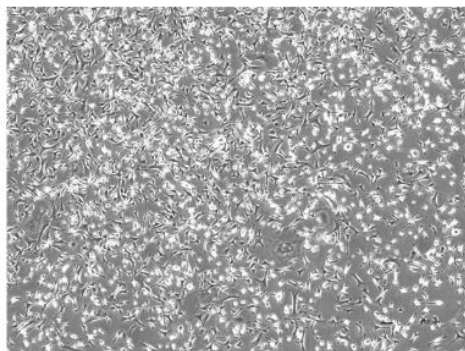
以下の内容について検討する。

1. 大腸癌肝転移群、腹膜播種群、進行大腸癌非転移群、早期大腸癌群、健常群(憩室炎、虚血性腸炎の腸切除群)それぞれの腹水・門脈系 exosome 中のインテグリンファミリーの測定、解析。
2. 局所進行大腸癌群における術後再発群と非再発群のインテグリンタンパク発現量の比較。
3. 大腸癌細胞および原発巣・肝転移・腹膜播種由来線維芽細胞における exosome の確認。
4. 大腸癌原発巣・肝転移・腹膜播種由来線維芽細胞それぞれにおける癌間質相互作用の特徴(増殖能、遊走能、浸潤能)が異なるのか、in vitro、in vivo において検討する。
5. 大腸癌細胞由来 exosome の大腸癌腹膜播種・肝転移巣形成に関する検討
6. 肝転移・腹膜播種由来線維芽細胞に特徴的な表面マーカー等の検索

4. 研究成果

1. 腹水・門脈系 exosome からの DNA KRAS 変異の解析、インテグリン蛋白ファミリーの測定
血清サンプルや膵液などの消化液からの exosome 抽出を行い、抽出方法の妥当性について検証した。まず、患者由来サンプルとして既に集積していた膵液中の exosome 抽出を行い、その手法を確立した。次に Stage IV 症例を含む大腸癌手術症例の切除標本より静脈血(門脈血)を採取し、超遠心法によりサンプルを分離し、抽出キットを用いて exosome の抽出を試みた。しかし、十分量の exosome の回収が困難であり、サンプルの選択、回収方法の再検討が必要となった。

2. 転移巣由来線維芽細胞による癌間質相互作用や大腸癌の転移形成促進効率の検討
腹膜播種・肝転移巣由来の線維芽細胞の樹立が可能であることは確認できた。しかし、該当症例の少なさのため、線維芽細胞の入手が不十分で、該当実験の進行が停滞している。

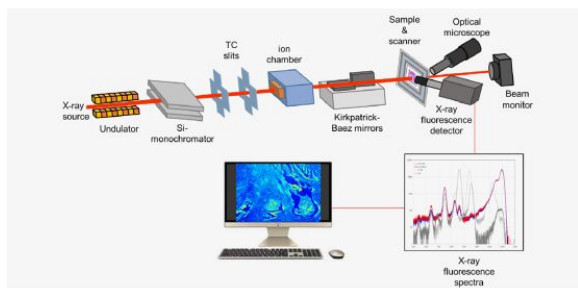


腹膜播種部由来の線維芽細胞の樹立
(自験例)

3. 癌間質相互作用と化学療法抵抗性の関連性

Stage 大腸癌症例における治療の問題点の一つが、化学療法抵抗性であり、これと癌間質相互作用の関連性について検討した。

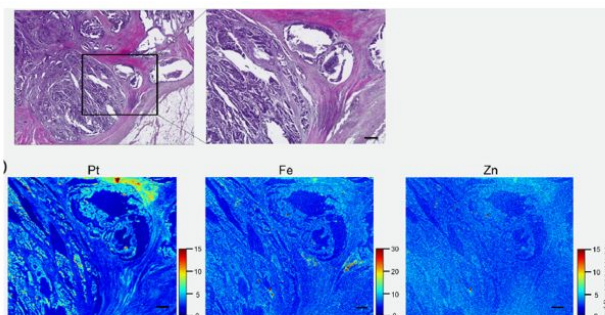
シンクロトロン放射 X 線蛍光分光分析 (SR-XRF) を使い、Oxaliplatin の腫瘍内分布を定量化し、化学療法抵抗性との関連について解析を行った。



シンクロトロン放射X線蛍光分光分析 (SR-XRF) を用いて腫瘍内の金属分子分布の定量化
論文より引用(自験例)

腫瘍上皮では、化学療法により変性したと考えられる領域に Oxaliplatin は集積しており、腫瘍間質では、Oxaliplatin の濃度は、治療効果が高かった患者よりも低かった患者で有意に高値であった。

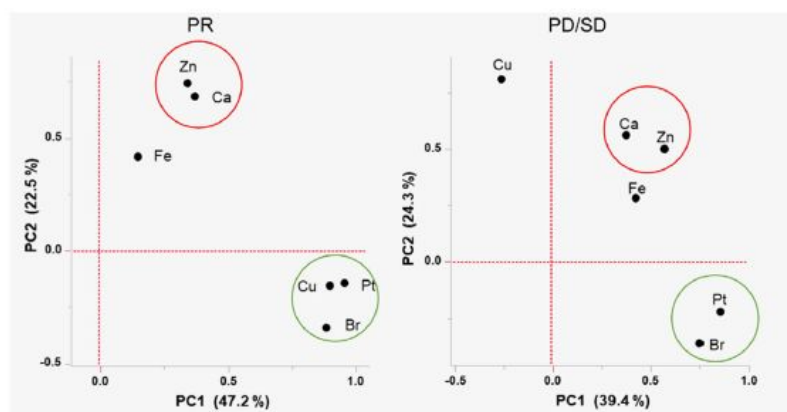
また、多変量解析によると、この腫瘍間質の Oxaliplatin 濃度の高値が、化学療法反応性に対し、独立した予測因子であることが示された。



上: 大腸癌化学療法後の腫瘍部のHE像
下: 同部位におけるPt・Fe・Znの分布 (SR-XRFを用いて測定)

論文より引用(自験例)

さらに、微量元素とプラチナ製剤の分布の関係性を評価したところ、銅が治療反応性に応じ、異なるパターンを呈することを発見した。銅は治療反応性良好な患者のプラチナ製剤の分布と正の相関を示し、また治療反応性の悪い患者のプラチナ製剤の分布とは負の相関を示した。



治療反応性と、分子の分布の相関関係を示した図

PtとBr、ZnとCaの分布はそれぞれ正の相関関係にあったが、Cuは治療反応性により異なる分布を示した。

論文より引用(自験例)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryo Koba Hayato Fujita Maiko Nishibori Kiyoshi Saeki Kinuko Nagayoshi Yoshihiko Sadakari Shuntaro Nagai Oki Sekizawa Kiyofumi Nitta Tatsuya Manabe Takashi Ueki Tatsuhiro Ishida Yoshinao Oda Masafumi Nakamura	4. 巻 146
2. 論文標題 Quantitative evaluation of the intratumoral distribution of platinum in oxaliplatin treated rectal cancer: In situ visualization of platinum via synchrotron radiation X ray fluorescence spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2498 ~ 2509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura S, Sadakari Y, Ohtsuka T, Okayama T, Nakashima Y, Gotoh Y, Saeki K, Mori Y, Nakata K, Miyasaka Y, Onishi H, Oda Y, Goggins M, Nakamura M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Pancreatic juice exosomal microRNAs as biomarkers for detection of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 2104 ~ 2111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07269-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木庭遼、藤田逸人、西堀麻衣子、永吉絹子、貞苺良彦、永井俊太郎、関澤央輝、新田清文、大内田研宙、大塚隆生、植木隆、石田竜弘、中村雅史
2. 発表標題 Oxaliplatin投与後の大腸癌組織における蛍光X線分析 - 組織内の白金分布と治療効果との関連性の検討 -
3. 学会等名 日本分析化学会 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木庭遼、藤田逸人、西堀麻衣子、永吉絹子、貞苺良彦、永井俊太郎、関澤央輝、新田清文、大内田研宙、大塚隆生、植木隆、石田竜弘、中村雅史
2. 発表標題 腫瘍間質における直腸癌L-OHP抵抗性の誘導：放射光蛍光X線を用いた白金分布分析
3. 学会等名 第119回日本外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田逸人、木庭遼、永吉絹子、貞苺良彦、永井俊太郎、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 Stage IV大腸癌に対する外科的治療の役割
3. 学会等名 第119回日本外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村聡、貞苺良彦、友杉隆宏、木村隆一郎、岡山卓史、森泰寿、仲田興平、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 十二指腸液中exosomeを利用した膵癌診断バイオマーカーの検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木庭遼、植木隆、西堀麻衣子、石田竜弘、永吉絹子、藤田逸人、永井俊太郎、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 Oxaliplatin投与後の直腸癌組織における蛍光X線分析を用いた金属元素の分布測定
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田逸人、永吉絹子、貞苺良彦、永井俊太郎、大内田研宙、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 Stage IV大腸癌症例に対する外科的治療戦略
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村聡、貞効良彦、岡山卓史、中島陽平、後藤桂登、森泰久、仲田興平、宮坂義浩、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 臍液中exosomeを利用した膵癌診断バイオマーカーの検討
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	貞効 良彦 (SADAKARI Yoshihiko) (80784503)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	永吉 絹子 (NAGAYOSHI Kinuko) (90761015)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	