

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15944

研究課題名(和文)大腸癌微小環境におけるエクソソームを介したクロストーク

研究課題名(英文) Exosomes derived from colon cancer cells promote tumor progression in tumor microenvironment

研究代表者

吉井 俊輔 (Yoshii, Shunsuke)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90771882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌間質の線維芽細胞は正常組織の線維芽細胞と異なり、腫瘍増大を多面的に促進するが、その成因は十分に解明されていない。本研究ではp53野生型大腸癌細胞のp53機能欠損により線維芽細胞共在下の腫瘍増大が促進すること、またその腫瘍増大にエクソソームが関わることを示した。さらに、p53野生型大腸癌細胞由来とp53機能欠損大腸癌細胞由来のエクソソーム中マイクロRNA発現を比較した結果、癌細胞のp53機能欠損によりエクソソーム中のマイクロRNA発現が変化し、発現上昇したマイクロRNAによって線維芽細胞のp53発現が抑制されることを示した。これらの結果について学会発表を行い、英文学術誌に投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維芽細胞は癌微小環境の中で腫瘍増大に中心的な役割を果たしており、なかでもp53遺伝子の抑制された線維芽細胞はより腫瘍増大に促進的な作用を有することが報告されている。今回、癌微小環境における線維芽細胞p53抑制機序として癌細胞由来エクソソーム中のいくつかのマイクロRNAが関わる可能性を見出した。これらのマイクロRNAの特異的阻害剤を導入することにより線維芽細胞のp53遺伝子発現がin vitroで回復する結果も得た。今後、これらのマイクロRNAが新規治療標的となりうる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment offers favorable conditions for tumor progression and fibroblasts play a pivotal role. We aimed to elucidate the oncogenic role of cancer-derived exosomes (CDEs) in fibroblast modification and tumor growth. TP53-deficient colon cancer cells accelerated co-cultured fibroblast proliferation compared to control (TP53-wild colon cancer) cells in vitro. CDEs from TP53-deficient colon cancer cells suppressed TP53 expression of fibroblasts and promoted their proliferation. Xenografts of TP53-deficient colon cancer cells grew significantly faster than those of control cells in the presence of co-injected fibroblasts, but this difference was diminished by CDE inhibition. Several microRNAs, upregulated in TP53-deficient CDEs, were functionally proven to suppress TP53 expression in fibroblasts. Our results suggest that CDEs play a pivotal role in tumor progression via TP53 suppression of fibroblast. CDEs might represent a novel therapeutic target in colon cancer.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 エクソソーム 癌微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌をはじめ、多くの固形癌は微小環境において線維芽細胞、炎症細胞、免疫担当細胞、血管内皮細胞など、他の細胞と相互に作用しながら増殖していく。癌間質の線維芽細胞は癌関連線維芽細胞と呼ばれ、癌微小環境の中で腫瘍増大に中心的な役割を果たしているが、その成り立ちはまだ十分に解明されているとは言えない。癌関連線維芽細胞の由来として組織中線維芽細胞の活性化が挙げられるが、申請者は、その活性化機構のひとつとして大腸癌細胞における p53 機能欠損が ROS 産生亢進を介して線維芽細胞の VEGF 産生を増強し、血管新生、腫瘍増大に寄与することを報告した。しかし、癌細胞 p53 機能の状態に関わらず、癌関連線維芽細胞が腫瘍進展を促進する機序は多岐にわたり、癌細胞が線維芽細胞の形質を変化させる機構についても十分に解明されていない部分が多い。本研究では癌細胞が線維芽細胞の形質を変化させる機序として、細胞間伝達手段のひとつであるエクソソームに着目した。エクソソーム中には、mRNA やマイクロ RNA などの核酸物質、蛋白などが含まれ、受容細胞の遺伝子発現を変化させることが知られているが、大腸癌微小環境における癌細胞 - 線維芽細胞クロストークにおける意義は明らかになっておらず、新規治療標的となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は癌細胞-線維芽細胞間のクロストークにおいて、癌細胞より分泌されるエクソソームが線維芽細胞活性化を介した腫瘍増大に果たす役割を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

癌関連線維芽細胞の特徴の一つに p53 活性の低下が報告されており、p53 を抑制された線維芽細胞は腫瘍増大に促進的に働くことが報告されている。申請者はすでに、大腸癌細胞株培養上清より回収したエクソソームを線維芽細胞株へ添加することにより、いくつかの線維芽細胞活性化に関わる遺伝子発現が変化することを確認していた。癌細胞由来エクソソームが線維芽細胞に与える形質変化のうち、線維芽細胞 p53 抑制に着目し、エクソソーム中に含まれるマイクロ RNA のマイクロアレイ法を用いた網羅的解析データより、線維芽細胞の p53 発現を抑制するマイクロ RNA を同定した。マイクロ RNA の絞り込みは癌細胞 p53 機能欠損に伴うエクソソーム中発現変化やエクソソーム中マイクロ RNA 発現量、またマイクロ RNA データベースによる標的遺伝子指向性を用いて行った。そのうえで、同定したマイクロ RNA の *in vitro* での機能解析として線維芽細胞へのマイクロ RNA 前駆体の導入、また特異的阻害剤の導入を用いて行った。大腸癌細胞株は、HCT116、HT29、SW480、SW620 など複数種類を用いて検討し、線維芽細胞株は CCD-18Co、WI-38 を用いた。

また、p53 発現抑制線維芽細胞の発現形質を検討した。具体的には、増殖能やアポトーシス、ROS 産生の有無や、TGF- β 、VEGF 産生能などを解析した。次に、p53 発現抑制線維芽細胞による癌細胞に対する影響を解析した。活性化した線維芽細胞は癌細胞の増殖能を亢進させることが予想される。共培養実験系を用いて癌細胞の増殖能やシグナル伝達異常など、癌細胞の悪性を高める線維芽細胞からの伝達機構の有無について検討した。また、線維芽細胞から産生されるエクソソームなどの抑制による癌細胞に対する影響を検討した。エクソソームの抑制は分泌に関わる Rab27a や nSMase2 抑制を用いた。

さらに、臨床検体における検討も行った。当科では、同意の得られた入院治療患者全員の血清を保存している。大腸癌患者の保存血清を用いて、血清中のエクソソームを抽出し、同定したマイクロ RNA の発現量を検討した。非担癌患者をコントロールとして、癌患者の同定したマイクロ RNA の発現量の検討を行い、バイオマーカーとしての有用性を検討した。

4. 研究成果

本研究において、癌細胞由来エクソソームの線維芽細胞への添加により線維芽細胞活性化のマーカーである SMA の発現上昇を含め、いくつかの遺伝子発現変化を認めた。癌細胞の p53 機能欠損により、線維芽細胞を介した腫瘍増大が促進することがすでに複数報告されているため、癌細胞の p53 機能欠損に着目して検討を行った。p53 野生型大腸癌細胞由来エクソソーム、p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームをそれぞれ同濃度で線維芽細胞に添加すると、線維芽細胞の p53 発現は p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームによって抑制されることが示された。そのため、p53 野生型大腸癌細胞由来エクソソームと p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームについて比較を行い、p53 抑制機序を検討した。それぞれのエクソソームの形態や粒子数、粒子径、蛋白量、線維芽細胞への取り込みには差を認めなかったが、内包される RNA 量は p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームに多いことが分かった。RNA 電気泳動バイアナライズの解析によると、エクソソーム中に含まれる RNA はほとんど全てが 200bp 以下の小分子 RNA であり、エクソソームを受容する線維芽細胞の遺伝子発現を調節するものとしてマイクロ RNA を仮定してさらに検討をすすめた。エクソソーム内のマイクロ RNA 発現についてマイクロアレイにて網羅的解析を行った。データベースを用いて p53 を抑制しうるマイクロ RNA を列挙し、p53 野生型大腸癌細胞由来エクソソームと p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームに内包さ

れる該当マイクロ RNA 発現量を検討すると、列挙されたマイクロ RNA のほとんどが p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームで多く発現していることが示された。さらにその中から、発現比、発現量、標的遺伝子指向性に基づいて同定した 3 つのマイクロ RNA につき、機能解析を行った。マイクロ RNA 前駆体の線維芽細胞への導入にて p53 が抑制されること、またそれらの特異的阻害剤にて p53 発現が回復することが示され、癌細胞による線維芽細胞 p53 抑制機序として、エクソソーム中マイクロ RNA が関わると考えられた。今回の研究は癌細胞由来エクソソーム中に内包されるマイクロ RNA が癌微小環境における線維芽細胞の形質変化、また線維芽細胞を介した腫瘍増大に関わる可能性を示したものであり、新たな治療標的ともなりうると考えられる。これらの結果について学会発表を行い、peer-review される英文学術誌に投稿中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 発表者名：吉井俊輔、林義人、井上貴功、木村圭一、坂谷彰彦、長井健悟、藤永哲治、辻井芳樹、日山智史、新崎信一郎、渡部健二、飯島英樹、竹原徹郎

発表標題：大腸癌細胞-線維芽細胞間の相互作用におけるエクソソームの役割

学会等名：第 104 回日本消化器病学会総会

発表年：2018 年

2. 発表者名：Yoshito Hayashi, Shunsuke Yoshij, Yoshiki Tsujii, Takanori Inoue, Keiichi Kimura, Akihiko Sakatani, Kengo Nagai, Tetsuji Fujinaga, Satoshi Hiyama, Shinichiro Shinzaki, Kenji Watabe, Hideki Iijima, Tetsuo Takehara

発表標題：Exosomes derived from colon cancer cells promote tumor activation via the activation of fibroblasts in tumor microenvironment

学会等名：Digestive Disease Week 2017

発表年：2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：林義人

ローマ字氏名：Hayashi Yoshito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。