

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：18H04064
研究課題名（和文）異種移植モデルの由来組織別エクソソミクスに着目した革新的癌診断治療シーズの開発
研究課題名（英文）Development of innovative cancer diagnostic and therapeutic seeds focusing on tissue specific exosomes using xenotransplantation model
研究代表者
小川 修（Ogawa, Osamu）
京都大学・医学研究科・名誉教授
研究者番号：90260611
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,100,000円

研究成果の概要（和文）：癌の薬剤抵抗性や転移形成に腫瘍間質相互作用の重要性が認識されつつあり、我々はそのメッセンジャーとしてエクソソームに着目した。薬剤抵抗性では、スニチニブ抵抗性腫瘍と感受性腫瘍でエクソソーム中のmiRNAのプロファイルが異なることは示せたが、薬剤抵抗性獲得機序の解明には至らなかった。転移形成では、骨指向性を高めた腎癌細胞株を樹立し、その培養上清から回収したエクソソームをマウスに投与したところ、時間依存性に骨髄の血管新生を促進し骨転移を増加させた。この作用にエクソソーム中のCD13が関わり、腎癌骨転移患者の腎腫瘍組織が分泌するエクソソームにおいてもCD13が増加し、また高い血管新生能を保持していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、エクソソームが時間依存性に腎癌骨転移の前転移ニッチを形成することが示された。また薬剤抵抗性腫瘍でエクソソーム中のmiRNAプロファイルは異なり、癌の薬剤抵抗性や転移形成の腫瘍間質相互作用にエクソソームが関わっていることが示唆された。今回の研究成果により、転移や薬剤抵抗性機序の解明につながるのみならず、エクソソームを転移予測のバイオマーカーに用いたり、治療抵抗性克服の治療ターゲットとするなど、臨床応用につながるものが期待される。

研究成果の概要（英文）：Intercellular communication between cancer cells and stromal cells is essential for drug resistance and metastasis formation of cancer, exosomes play a important role as messenger. In our study of drug resistance, exosomes secreted from sunitinib-resistant tumor have shown distinct miRNA profiles compared with control. Further study is required to elucidate the mechanism by which exosomes induce drug resistance. In our study of metastasis formation, we established a bone metastatic RCC cell line. Treatment of mice with exosomes collected from culture supernatant of bone metastatic RCC cells promoted angiogenesis in bone in a time-dependent manner and increased bone metastasis. We showed that exosomal CD13 contributed to angiogenesis. In addition, exosomes from bone metastatic RCC contained abundant CD13 and promoted angiogenesis compared with exosomes from RCC without metastasis. Our findings provide a new insight to the role of exosome in cancer metastasis and drug resistance.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：エクソソーム 患者癌組織由来ゼノグラフト 腎細胞癌 薬剤抵抗性 転移形成 前転移ニッチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト癌に対して新しい分子標的治療や免疫治療が開発されているが、治療抵抗性や転移形成は避けられず、従来とは異なったアプローチによる革新的な診断・治療シーズの開発が求められている。近年、癌の浸潤・転移における腫瘍間質相互作用の重要性が認識されており、また治療抵抗性獲得にも癌細胞だけでなく、微小環境との相互作用も重要であることが明らかとなってきた。特に腎癌における VEGF を標的とした抗血管新生治療では間質が治療抵抗性獲得の鍵を握っていると考えられる。

研究代表者はこれまで「実臨床を反映するモデル」として患者の手術検体を免疫不全マウスに移植する xenograft モデル(PDX)に着目し、前立腺癌、腎癌の治療抵抗性獲得機序の解明を行ってきた (Inoue T et al. Nat Rev Urol. 2017)。PDX の特徴の一つとして癌細胞はヒト由来、間質細胞はマウス由来であり、ゲノムや蛋白質レベルで癌細胞由来と間質細胞由来の成分を識別できることが挙げられる。

腫瘍間質相互作用における重要なメッセンジャーとしてエクソソームが注目されている。エクソソームは細胞から能動的に分泌される脂質二重膜に包まれた小胞で、核酸、蛋白質等の情報伝達物質を内包する。腎癌ではエクソソーム中の lncRNA がスニチニブに対する薬剤耐性の細胞間拡散に関わることが報告されている (Qu L et al. Cancer Cell. 2016)。また、腎癌は肺・骨への転移が特徴的であるが、エクソソームは臓器特異的な前転移ニッチの形成に関与が示唆されており (Hoshino A et al. Nature. 2015)、転移形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

従来のエクソソーム研究は細胞株の培養上清及び尿や血液等の患者体液に限られていた。しかし最近、研究協力者の植田幸嗣博士らは新鮮組織を採取直後に培養することで細胞株培養上清や患者体液と比較してはるかに高濃度のエクソソームを回収できることを見出し、腎癌患者の手術検体で正常部と癌部由来のエクソソームの蛋白質解析から腎癌の診断マーカーを同定した (Jingushi K et al. IJC. 2017)。我々は予備実験で PDX の新鮮組織でも同様にエクソソーム回収が可能であることを確認しており、同法を情報伝達物質の由来細胞の特定が可能な PDX に応用することで、腫瘍間質相互作用解明のための革新的な研究基盤を確立できる可能性があることに着目した。以上の背景から、PDX の新鮮組織由来エクソソーム解析を通じて泌尿器癌の薬剤抵抗性や転移形成の新たな機序を解明し、革新的な診断・治療法の開発に繋げることを目指す。

2. 研究の目的

(1) 腎癌薬剤抵抗性機序の解明

当科で樹立した腎癌スニチニブ耐性 PDX モデルを用いて、新鮮組織由来エクソソームに含まれる miRNA を解析し、同定された因子を元に腎癌スニチニブ抵抗性機序の解明を行う。

(2) 腎癌骨転移形成機序の解明

骨指向性を高めた腎癌細胞株の培養上清から採取したエクソソームをマウスに投与し、前転移ニッチの形成、さらには心注をすることで骨転移形成を促進するか検証し、腎癌骨転移形成の機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 腎癌薬剤抵抗性機序の解明

当科で樹立した腎癌スニチニブ抵抗性 PDX モデル(KURC1)の治療奏功時、抵抗性獲得時の新鮮組織由来エクソソームを回収する。エクソソームに含まれる miRNA を解析し、治療奏功時と抵抗性獲得時で異なる因子を同定し、スニチニブ抵抗性への関与・機序を検討する。その上で、スニチニブ抵抗性腫瘍由来のエクソソーム投与によりスニチニブに対する感受性が変化するかを評価する。

(2) 腎癌骨転移形成機序の解明

我々が既に樹立した、腎癌細胞株 786-0 にルシフェラーゼを導入し (786-0 luc)、さらにマウス脛骨骨髓に注射し in vivo 選択で樹立した骨転移指向性の高い 786-0 BM を用いる。細胞培養上清からエクソソームを回収する系を確立する。続いて、786-0-BM の培養上清から回収したエクソソームをヌードマウスに静脈注射し、骨組織が前転移ニッチを形成し変化するか観察する。また、骨に前転移ニッチ形成後、786-0 luc を心注し骨転移が増えるかも検討する。さらに、786-0 BM と 786-0 luc の培養上清から回収したエクソソームタンパクを LCMS にて網羅的に比較検討し、前転移ニッチ形成に関わる因子を検討する。同定された因子のノックダウンなどを行い、前転移ニッチ形成の機序を解明する。最後に、上記で同定された因子の発現が骨転移の有無で差異があるか、患者組織由来のエクソソームで評価する。

4. 研究成果

(1) 腎癌薬剤抵抗性機序の解明

腎癌スニチニブ抵抗性 PDX モデル(KURC1)を樹立し、その新鮮組織培養液からエクソソームを回収する系を確立した。In vivo において、腫瘍表面にエクソソームを注射すると腫瘍組織内にエクソソームが取り込まれることも確認できた。次に、スニチニブ耐性モデルと感受性モデルの新鮮組織由来エクソソームに含まれる miRNA の解析を行ったところ、スニチニブ耐性モデル由

来エクソソームで有意に発現が上昇している miRNA のうち、癌の悪化や進展に関わるものとして miR-494-3p、miR-29a-3p に注目した。これらの miRNA の標的遺伝子とされる PTEN や TET1 はスニチニブ耐性腫瘍において感受性腫瘍より発現が低下していることがタンパクレベルで示された。さらに TET1 についてはスニチニブ耐性モデル由来エクソソームを腎癌細胞株 Caki-1 に添加すると発現が低下するという結果が得られた。続いて、スニチニブ耐性モデル腫瘍の培養液から採取したエクソソームを、感受性腫瘍を移植したマウスに投与しスニチニブ抵抗性となるか検討したが、マウスが1週間程度で死亡してしまい検証できず、薬剤抵抗性獲得機序の解明にまでは至らなかった。

(2)腎癌骨転移形成機序の解明

細胞培養上清からエクソソームを回収する系を確立し、ウエスタンブロット・電子顕微鏡・Nanosight でエクソソームを確認した。

7860-BM と 786-0 luc の培養上清から回収したエクソソームをヌードマウスに静脈注射し、骨組織が前転移ニッチを形成し変化するか観察したところ、7860-BM からのエクソソーム投与群で有意に、脛骨骨髓に拡張した血管が経時的に増生した(図1)。一方他臓器では組織像に差異は見られなかった。Endothelial tube formation assay を用いて *in vitro* でも検証したところ、このエクソソーム投与群で有意に血管長の伸長を認めた。続いて、7860-BM と 786-0 luc の培養上清から回収したエクソソームをヌードマウスに静脈注射し12週間後、786-0 luc を心注し骨転移を評価した。786-0 BM からのエクソソーム投与群で有意に骨転移を多く認めた。以上から、エクソソームにより骨特異的に血管を拡張・増生することで前転移ニッチを経時的に形成し、骨転移能を高めることが示された。

786-0 BM と 786-0 luc の培養上清から回収したエクソソームタンパクを LCMS にて網羅的に比較検討した結果、タンパクのプロファイルが異なるという結果が得られた。骨転移指向性の細胞株由来エクソソーム中で発現が上昇しているタンパクのうち、MASCOT score や細胞懸濁液と比較してエクソソームでより濃縮されているということから、Aminopeptidase N/CD13 に注目した。CD13 をノックダウンした細胞株(shANPEP)から回収したエクソソームでは、*in vitro*・*in vivo* においても見られた拡張血管の増生は抑制された(図2)。

最後に臨床検体での検討を行った。腎癌骨転移患者と局所進行腎癌患者の腎腫瘍組織が分泌するエクソソームを採取し、endothelial tube formation assay と CD13 の ELISA で比較検討した。骨転移患者組織由来のエクソソームで endothelial tube formation assay にて血管伸長を認め、ELISA で CD13 を多く含有していた。以上からエクソソーム中に含まれる CD13 が腎癌骨転移患者の血管新生を促すことが示された。

今後の展望: 本研究により、エクソソームが時間依存性に腎癌骨転移の前転移ニッチを形成することが示された。また薬剤抵抗性腫瘍でエクソソーム中の miRNA プロファイルは異なり、癌の薬剤抵抗性や転移形成の腫瘍間質相互作用にエクソソームが関わっていることが示唆された。

今回の研究成果により、転移や薬剤抵抗性機序の解明につながるのみならず、エクソソームを転移予測のバイオマーカーに用いたり、治療抵抗性克服の治療ターゲットとするなど、臨床応用につながることを期待される。

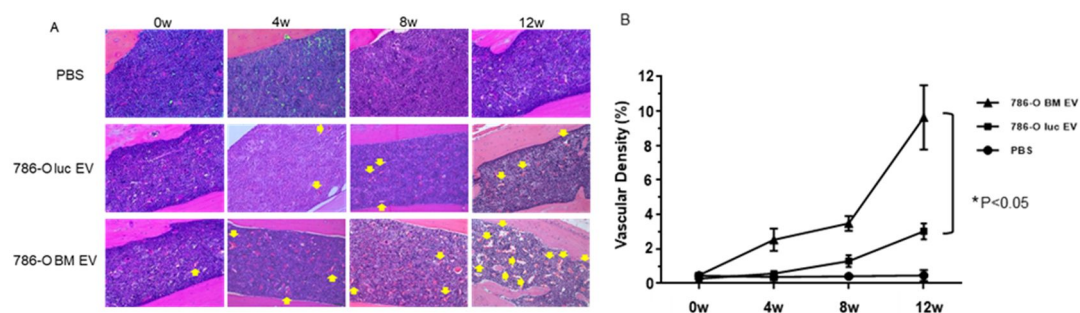


図1. エクソソーム静注によるマウス脛骨骨髓血管の経時的変化

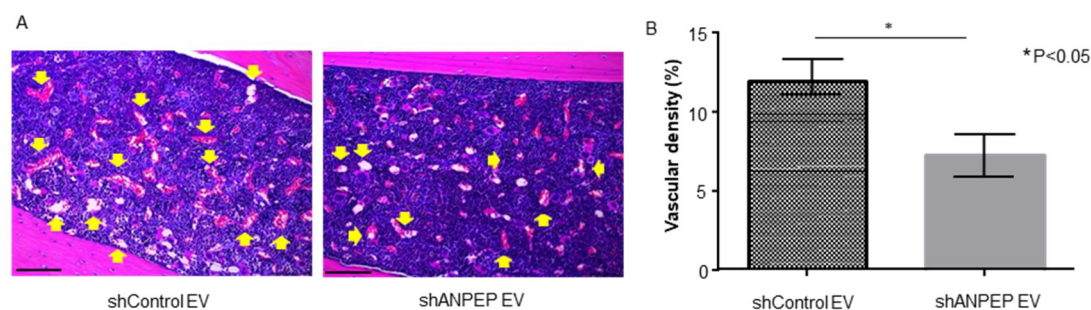


図2. CD13ノックダウンによるマウス脛骨骨髓血管の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 Extracellular Vesicles(EVs) secreted from bone metastatic RCC cells induce angiogenesis in bone marrow and facilitated bone metastasis.
3. 学会等名 AUA2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 Extracellular Vesicles secreted by bone tropic renal cell carcinoma induce angiogenesis in bone marrow with potential to facilitate bone metastasis
3. 学会等名 ISEV 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 Extracellular vesicles secreted by bone tropic renal cell carcinoma induce angiogenesis in bone marrow with potential to facilitate bone metastasis
3. 学会等名 第73回西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 骨転移指向性腎癌細胞株は分泌する細胞外小胞は骨髄の血管新生を誘導し骨転移を促進する
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 骨転移指向性腎癌細胞株由来エクソソームは骨髄において血管増生を誘導する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 Bone tropic renal cell carcinoma cell lines-derived exosomes induce blood vessel formation in bone marrow
3. 学会等名 18th Urological Association of Asia (UAA) Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 Tumor exosomes derived from bone tropic renal cell carcinoma cell lines induce microvascular dilation in bone marrow
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 スニチニブ抵抗性の腎癌ゼノグラフト腫瘍から分離したexosomal miRNAの解析
3. 学会等名 第108回日本泌尿器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 骨転移指向性腎癌細胞株由来のエクソソームは骨髄血管の増生、拡張を誘導する
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田将司、赤松秀輔、山崎俊成、小川修
2. 発表標題 スニチニブ抵抗性の腎癌ゼノグラフト腫瘍から分離したexosomal miRNAの解析
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020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	赤松 秀輔 (Akamatsu Shusuke) (20767248)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	山崎 俊成 (Yamasaki Toshinari) (00607749)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	
研究分担者	齊藤 亮一 (Saito Ryoichi) (30792270)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------