

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07983

研究課題名（和文）膵がん細胞のexosomeを介した浸潤性伝播の解明とその抑制剤の開発

研究課題名（英文）Elucidation of invasive propagation of pancreatic cancer cells via exosomes and discovery of inhibitors of invasive propagation

研究代表者

島崎 猛夫（SHIMASAKI, Takeo）

金沢医科大学・総合医学研究所・准教授

研究者番号：50377420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、治療目的の抗がん剤が、逆にがん細胞に浸潤性や転移性の伝播をもたらすという負の側面を持つこと、それらがエクソソームを介して起きていることを見出した。その過程において、一部の抗がん剤により、がん細胞が後天的にがん幹細胞化する事象を発見した。また、抗がん剤は、諸刃の剣ともいえ、治療効果をもたらすと共に悪性化をもたらす可能性を証明したことは重要な知見である。これらの現象を抑制することで、負の側面のない治療法を確立することができる。また、セレンディピティ的に発見したがん幹細胞化については、がん耐性メカニズムの根幹となる仕組みと見え、今後のがん治療成績を大きく改善する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤治療で完全にがん細胞が消失しないのは、抗がん剤耐性のメカニズムが存在するからである。本研究は、抗がん剤治療耐性のない治療方法を開発するために、抗がん剤耐性のメカニズムを明らかにする研究である。研究成果として、がん細胞が抗がん剤の影響を受けて、抗がん剤耐性を誘導する物質を放出し、抗がん剤が影響する前の他のがん細胞を変化させていることを明らかにした。よって、これらのメカニズムが明らかになったことにより、将来的にがん細胞に治療耐性を誘導しない治療方法の開発が可能となり、がん治療成績の向上が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that anticancer drugs for therapeutic purposes have the negative aspect of causing invasive and metastatic propagation of cancer cells in the opposite direction, and that these events are mediated by exosomes. In the process, we found that some anticancer agents cause cancer cells to become acquired cancer stem cells. It is also an important finding that we proved that anticancer drugs can be considered a double-edged sword, bringing both therapeutic effects and malignant transformation. By suppressing these phenomena, a treatment without negative aspects can be established. In addition, the serendipitous discovery of cancer stem cell conversion can be said to be a fundamental mechanism of cancer resistance mechanism, which may greatly improve future cancer treatment outcomes.

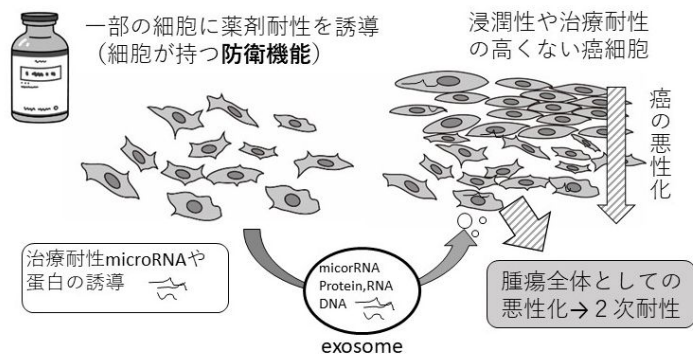
研究分野：分子生物学、再生医療学、がん生物学、消化器内科学

キーワード：エクソソーム 膵癌 浸潤 伝播

1. 研究開始当初の背景

膵がんの主要病型の膵管腺癌(膵がんとする)の多くの進行・再発症例は治療がいったん効いても耐性を獲得する(2次耐性)ことがほとんどで、腫瘍浸潤そのものに有効な治療法は開発されていない。これまでは、がん難治性の主要因である浸潤と治療耐性はそれぞれ独立した悪性形質として研究が進められてきた。その後、がん治療自体が誘因となって腫瘍細胞の浸潤・転移が亢進することや治療耐性が高まることが報告されてきた(1)~(3)。これらの研究をもとに、がんの浸潤と治療耐性は表裏一体の関係にあることが認識されるようになり、両者の形質誘導に共通して作用する分子経路や機序が注目されている(4)。

問い：抗がん剤は治療効果をもたらす反面、がんを悪性化する！？



我々は、抗がん剤治療は抗腫瘍効果をもたらす一方、逆説的にがんを悪性化する可能性を問いながら研究を進めてきた。これまでに、抗がん剤が膵がん細胞から細胞外に HSP90 を誘導し、結果として治療耐性との関連が報告されている EMT を誘導することを明らかにしてきた(研究業績2)。その経緯から、「がん治療が exosome を介して腫瘍の悪性度を高める可能性」を学術的に問う必要があると考えた。exosome は表面に細胞膜由来の脂質と蛋白質を含み、内部には核酸 (micro-[mi]RNA, mRNA, DNA) や蛋白質などの機能性物質が含まれている。exosome は細胞間を移動し、細胞に取り込まれた exosome は形質を変化さ

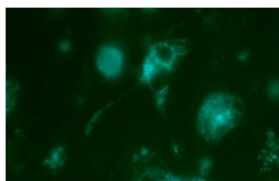
抗がん剤による浸潤性や転移性の伝播という負の側面

せ、種々の生命現象を制御する(5)~(7)。とくにがん細胞が分泌する exosome は、がんの転移や浸潤の一因であることが知られている(8)(9)。

2. 研究の目的

本研究では、一部のがん細胞が治療耐性を獲得した場合、関係する miRNA などの機能性物質を包含した exosome を介して周囲のがん細胞にも治療耐性を誘導し、治療耐性が腫瘍全体に伝播していくことを明らかにする。これまでの研究にて確立した exosome の産生や取り込みに関する評価方法と共培養容器を用いて、exosome 動態に影響する薬剤の探索を行う。

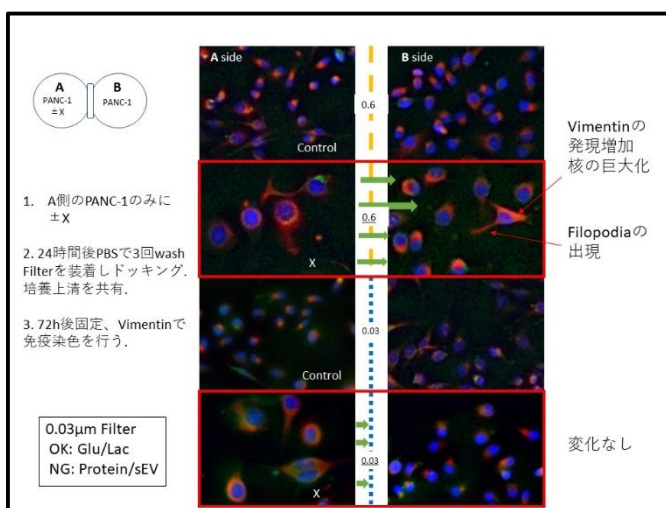
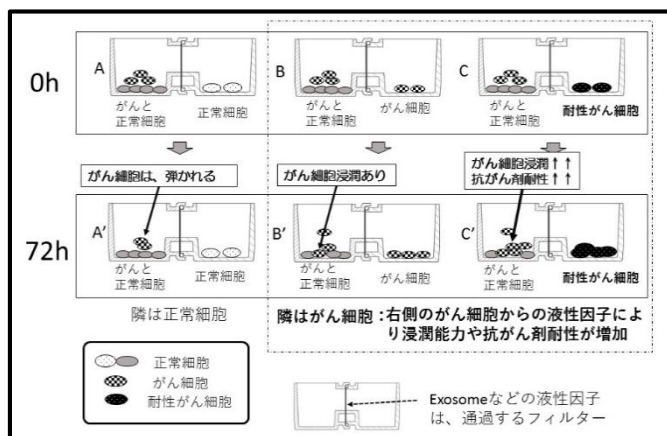
3. 研究の方法



エクソソームには CD63 が好発現していることから、CD63-GFP 融合遺伝子を用いて CD63 融合 GFP/luciferase 発現安定膵癌細胞株 (ePANC-1) を樹立した(左写真)。これらの細胞により、細胞内でのエクソソームの挙動を明らかにすることができる。これら新たに樹立した ePANC-1 をはじめとする複数の膵癌細胞株と、既に所有している膵管上皮由来の正常細胞 PE を用いて解析を行った。これらの細胞株に

対して、膵癌で使用される抗癌剤 (GEM, 5FU) をはじめとした各種抗癌剤を用いてエクソソームの動態変化を評価した。また本研究の特徴には、その解析方法にも特徴がある(左図)。細胞間相互作用の評価について、相互作用解析に研究代表者が開発した水平方向連結式相互作用観察培養プレートを用いて解析した。従来の研究ツールと異なり、横方向で細胞上清を共有するタイプの培養容器であり、その底面は顕微鏡観察が可能になっているという特徴を持つ。そのため、両者ともに顕微鏡で観察が可能であり、また、両者の細胞の底面の素材が同一で、間にフィルターを介して液性因子の交流が可能であるという特徴を持つ。フィルターの孔径を変えれば、行き来する細胞間物質をコントロールできるという特徴を持つ。また、従来の上下タイプの共培養プレート(トランスウエルあるいはセルカルチャーインサートと呼ばれる)では、上側の細胞培養容器の細胞数がコンフルエントになると、上下での培養液中の各種因子の交流は、細胞自身によりブロックされることにより、低下する。そのため、共培養効果が時間とともに低下するというデメリットが存在した。新しい培養容器では、共培養の効果が高いため、相互のエクソソーム授受の効果を確認するためには、有利である。そのため、今回の研究では、主に横方向での連結式共培養容器を用いて、癌細胞同士、各種正常細胞との組み合わせで検討を行った。

4. 研究成果



(1) 抗がん剤耐性細胞との組み合わせにおいては、がん細胞の挙動が異なった(左図)。

(2) これらの挙動の変化には、上皮間葉移行(EMT)が関与していた。

(3) EMTの誘導因子としてエクソソームの関与が推定された。

(4) 誘導物質 X を用いてがん幹細胞化を示す所見が得られた。

次に、抗癌剤耐性に EMT 及びエクソソームが深く関与していることを示す結果を左下図に示す。

ある抗がん剤物質 X を暴露することにより隣癌細胞が EMT の形質を示し、その細胞から分泌される液性因子が、X に暴露されていない隣の隣癌細胞でも同様に EMT の形質を示すことを見出した。蛋白質やエクソソームが通過しないフィルターサイズでは、これらの現象は認めなかったことから、細胞が分泌する物質による現象であることを確認することができた。

物質 X や具体的なエクソソームに関与する物質名については、現在特許出願を予定していることから、本報告書での記載は見送った。

引用文献)

- (1) Pisco, A.O. Br J Cancer, 2015.
- (2) Ebos, J.M., Cancer Res, 2015.
- (3) Caino, M.C. Cell Cycle, 2015.
- (4) Alexander, S. Trends Mol Med, 2012.
- (5) Karagiannis, G.S. Mol Oncol, 2010.
- (6) Azmi, A.S. Cancer Metastasis Rev, 2013.
- (7) Zhang, H.G. Am J Pathol, 2014.
- (8) Somasundaram, R. Nat Med, 2012.
- (9) Peinado, H., Nat Med, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeo Shimasaki, Satoko Yamamoto, Risa Omura, Kagenori Ito, Yumiko Nishide, Hideki Yamada, Kazumi Ohtomo, Tomo Ishisaka, Keiichiro Okano, Takenori Ogawa, Hiroyuki Tsuji, Yoichi Matsuo, Toshinari Minamoto, Naohisa Tomosugi, Etienne Ferain, Takahiro Ochiya	4. 巻 12
2. 論文標題 Novel Platform for Regulation of Extracellular Vesicles and Metabolites Secretion from Cells Using a Multi-Linkable Horizontal Co-Culture Plate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi12111431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 1件）

1. 発表者名 島崎 猛夫, 山本聡子, 林祐一, 松尾洋一, 源 利成
2. 発表標題 Analysis of intracellular dynamics of exosomes and changes of surface markers
3. 学会等名 国際細胞外小胞学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島崎 猛夫, 山本聡子, 林祐一, 松尾洋一, 源 利成
2. 発表標題 膵がん細胞の抗がん剤によるエクソソーム動態変化の解析
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本聡子, 林祐一, 松尾洋一, 源 利成, 島崎 猛夫
2. 発表標題 抗がん剤ゲムシタピンによる膵がん細胞のエクソソーム分泌及びエクソソーム表面マーカーへの影響
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島崎 猛夫, 山本聡子, 林祐一, 松尾洋一, 源 利成
2. 発表標題 肺癌細胞エクソソームの抗がん剤による動態変化
3. 学会等名 第6回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島崎 猛夫, 山本聡子, 林祐一, 松尾洋一, 源 利成
2. 発表標題 肺癌細胞エクソソームの抗がん剤による動態変化とその生物学的意義
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島崎猛夫、山本聡子
2. 発表標題 エクソソーム研究を目的とした新しい共培養容システム開発とフィルターの選択
3. 学会等名 第5回細胞外小胞学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島崎猛夫、山本聡子
2. 発表標題 新しい共培養容器によるエクソソームの細胞内動態の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会第41回年会
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	山本 聡子 (YAMAMOTO Satoko) (00768161)	金沢医科大学・総合医学研究所・助手 (33303)	
研究 分担者	松尾 洋一 (MATSUO Yoichi) (40381800)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

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
---------	---------