

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15755

研究課題名(和文)胆道癌幹細胞を標的とするエクソソームの同定と新規標的治療への応用

研究課題名(英文)Identification of exosomes targeting to the bile duct cancer stem cells ~ towards the clinical application for novel targeted therapy

研究代表者

石上 敬介 (Ishigami, Keisuke)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50779600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは血液などの体液に含まれる直径40-150 nmの脂質二重膜の小胞であり、がん領域においてもエクソソームを介した細胞間情報伝達の重要性が議論されている。本研究では、胆道癌細胞および正常細胞からエクソソームを抽出し、胆道癌モデルマウスに投与することにより、胆道癌幹細胞のエクソソームを介した情報伝達機構を明らかにすることを目的とした。現在、幹細胞を標的とするエクソソームの表面分子について更なる解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究をさらに発展させることにより、胆道癌幹細胞への標的治療として、またエクソソームを用いた新たなドラッグデリバリーシステムとして、新規治療法への応用が期待される。胆道癌は今なお予後不良の癌種の一つであり、殺細胞性抗がん剤や分子標的薬に加えて、新たな治療法を確立させることができれば、その社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are membrane-bound extracellular vesicles with diameter of 40-150nm.

The significance of intercellular communication is actively discussed in the field of oncology. In this research, we aimed to clarify the intercellular communication of bile duct cancer stem cell. We injected the exosomes extracted from various cells to the bile duct cancer model mice. Now we investigate the surface molecule of the exosomes which target the bile duct cancer stem cells.

研究分野：消化器病

キーワード：エクソソーム 胆道癌 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は肝内胆管・肝外胆管・胆嚢・十二指腸乳頭部から成る胆道を原発とする難治癌である。網羅的遺伝子解析技術の進歩により、肝内胆管癌・肝外胆管癌・胆嚢癌・乳頭部癌のゲノム異常が大きく異なることが明らかにされている(1)が、各ゲノム異常を標的とした個別化治療は臨床応用されておらず、治療選択肢が乏しく十分な生存が得られないことが大きな問題である。近年、細胞間での情報伝達経路の一つとしてエクソソームが注目されており、胆道癌においても全身投与されたエクソソームが癌組織内部に選択的に取り込まれること、内包される tumor suppressive microRNA の発現を亢進させたエクソソームを静注した胆道癌モデルラットにおいて、腫瘍増殖・浸潤が抑制され予後が延長することが報告されている(2)。現在、様々な癌種でエクソソームを新たなドラッグデリバリーシステムとして用いた、腫瘍特異的な治療への応用が期待されている。一方で、腫瘍特異的な治療を難しくする要因として、癌組織内の不均一性や癌幹細胞(Cancer stem cells; CSCs)の存在が報告されており、胆道癌においても癌幹細胞マーカーとしてCD133、CD24、EpCAM、CD44などが報告されている(3)。CSCs に対する標的治療として、BBI608 併用化学療法や LGR5 陽性大腸 CSCs に対する標的治療(4)が試みられているが、未だ臨床応用には至っていない。

【参考文献】

1. Nakamura H et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nature Genetics* 47:1003-1010, 2015
2. Ling Li et al. Extracellular vesicles carry miR-195 to intrahepatic cholangiocarcinoma and improve survival in a rat model. *Hepatology* 2016 (Ahead of print)
3. Romano M et al. Tumor microenvironment versus cancer stem cells in cholangiocarcinoma; synergistic effect. *J Cell Physiol* 231:768-776, 2016
4. Shimokawa M et al. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature* 11;545: 187-192, 2017

2. 研究の目的

今回申請者は、(1) 胆道癌細胞への向性を持つエクソソームは、胆道癌幹細胞(CSCs)にも取り込まれるのか。(2) 胆道 CSCs は他の胆道癌細胞と独立して、周囲の癌細胞・間質細胞等とエクソソームを介した細胞間情報伝達を行っているのか。(3) 胆道 CSCs の発生・維持に關与する microRNA とは。という3つの疑問を明らかにするために、CSCs への向性を持つエクソソームを抽出し、その表面分子を解析することを目的とした。また、その結果として、エクソソームを用いた CSCs 特異的な治療への応用、CSCs 上の分子を標的とした CSCs 特異的な治療への応用、さらに CSCs に向性を持つエクソソームに内包される microRNA 等の分子を解析し、胆道癌組織における CSCs の発生・維持に重要な役割を持つ microRNA の探索を行う。

3. 研究の方法

幹細胞マーカーを用いた胆道 CSCs の分取と表面分子の解析

SCID マウスの肝臓にヒト胆道癌細胞株を注射してゼノグラフトモデルを作成する。次に、胆道癌組織を採取してコラゲナーゼ(0.18 U/mg)で処理した後、セルストレーナーを用いて個々の胆道癌細胞を採取する。過去に報告されているヒト胆道癌幹細胞マーカー(CD133、CD24、EpCAM、CD44)を用いて、フローサイトメトリーにより胆道 CSCs の分取を行い、その表面分子を解析する。

エクソソームの標的となった胆道 CSCs の分取と表面分子の解析

申請者の研究室で保有している多数の胆道癌細胞株および胆道間質細胞株に CRISPR/CAS9 を用いたゲノム編集を行い、エクソソームマーカーとされる CD63 を GFP で標識したエクソソームを抽出する。胆道癌モデルマウスに蛍光標識したエクソソームを尾静脈注射し、胆道癌組織を採取し、計画と同様に個々の細胞の分取を行う。フローサイトメトリーを用いて、癌幹細胞マーカーと GFP のダブルポジティブの細胞分画を分取する。計画で分取した癌幹細胞(A)、およびで採取した癌幹細胞マーカーと GFP のダブルポジティブ細胞(B)、GFP 標識したエクソソーム(C)からそれぞれ蛋白を抽出し、キャピラリー電気泳動を用いて各群の蛋白を網羅的に解析することで、胆道 CSCs を標的とするエクソソームに特異的に発現する分子 X を探索する。

CSCs を標的とするエクソソームを用いた治療応用に関する検討

胆道 CSCs を標的とするエクソソームに特異的に発現している分子 X をクローニングタグで標識した後、癌幹細胞のライセートとの免疫沈降により、分子 X と關連する胆道 CSCs 上の分子 Y を同定する。また分子 Y をクローニングして胆道癌細胞に発現させ、計画で使用した GFP 標識エクソソームが取り込まれることを確認する。以上より、1) 分子 X を発現したエク

ソソームを用いた新たなドラッグデリバリーシステム、2) 分子 Y に対する新たな分子標的治療、により胆道 CSCs を標的とする治療応用の可能性を検証する。胆道癌組織における分子 Y の発現については、当施設で保管する多数の胆道癌臨床検体を用いて解析を行い、関連する分子異常や予後との関連についても検証する。

4 . 研究成果

エクソソームは血液などの体液に含まれる直径 40-150 nm の脂質二重膜の小胞であり、がん領域においてもエクソソームを介した細胞間情報伝達の重要性が議論されている。

本研究では、胆道癌細胞および正常細胞からエクソソームを抽出し、胆道癌モデルマウスに投与することにより、胆道癌幹細胞のエクソソームを介した情報伝達機構を明らかにすることを目的とした。

細胞株からのエクソソームを回収し、電子顕微鏡で観察した。

蛍光標識したエクソソームを胆道癌モデルマウスに投与し、現在も胆道 CSCs を標的とするエクソソームの表面分子 X について解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----