

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16682

研究課題名(和文) エクソソームの膜に発現している糖鎖は転移臓器選択性に関与するか

研究課題名(英文) Are glycans expressed on exosome involved in target organ specificity in cancer metastasis?

研究代表者

日下 歩 (Ayumu, Kusaka)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40815776

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)：尿路上皮癌は再発率が高く、再発後は著しく予後不良な疾患であるため、有効な分子バイオマーカーの開発は急務である。近年、癌細胞が転移前に分泌するエクソソームが、転移に関与する可能性が示唆されている。これは癌の臓器選択性はエクソソームによって決定される可能性があることを意味し、治療経過でエクソソームを検出できれば、転移しやすい臓器が予測できる可能性がある。我々は、膀胱癌細胞株のエクソソームを用いてマウス実験、臨床検体を用いたエクソソーム糖鎖とインテグリンの発現について検討した。その結果、臨床検体において疾患特異的にエクソソーム糖鎖が異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では尿路上皮癌細胞株のエクソソームを蛍光標識し、マウスに投与することにより、エクソソームの分布についての初期検討を行った。続いて患者検体を用いて、臨床検体における臓器特異的なエクソソームの検出と検証を行った。その結果、エクソソーム糖鎖は、疾患毎に違いあることが示唆された。エクソソーム糖鎖を検討した報告は本研究が初であり、学術的意義や社会的意義は大きい。これら変化の意義は更なる追加研究を必要とするが、我々が同定したエクソソーム糖鎖についての検討は、癌の転移機序についての新しい知見に関与する可能性があり、今後の発展に期待が持てる結果である。

研究成果の概要(英文)：The development of effective molecular biomarkers is urgently needed, since urothelial carcinoma has a high recurrence rate and a remarkably poor prognosis after recurrence. Recently, it has been suggested that cancer cells secrete exosomes prior to metastasis to create a viable environment (pre-metastatic niche) in order to establish metastasis. This observation suggested that the organ selectivity of cancer may be determined by exosomes, and if exosomes can be detected in the course of treatment, it may be possible to predict which organs are likely to metastasize. We investigated the expression of exosomal glycans and integrins in mouse experiments and clinical specimens using exosomes from bladder cancer cell lines. The results suggest that exosomal glycans may differ in clinical specimens in a disease-specific manner.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：エクソソーム 糖鎖解析

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は再発率が高く、一度再発すると著しく予後不良である。我々は尿路上皮癌において症候性再発がより予後不良因子である事を報告したが、症候性再発の予測は容易ではなく、新たな分子バイオマーカーが必要であり、その開発は急務である。我々の検討から症候性再発群には局所再発と骨転移が、無症候再発にはリンパ節転移が多いという特徴がある。これは個々の癌に臓器特異があることを意味する。さらに近年では、癌細胞が転移前にエクソソームを分泌し、あらかじめ生存しやすい環境（前転移ニッチ）を整えていることも示されており、癌の転移臓器選択性はエクソソームが関与している可能性がある。このことから、治療経過でエクソソームを検出できれば、転移しやすい臓器が予測できる可能性がある。治療過程におけるエクソソーム検出とその測定系の実用化は治療効果向上および医療費軽減につながる可能性があり、その開発は急務である。

2. 研究の目的

本研究では、まず尿路上皮癌細胞株のエクソソームを蛍光標識しマウスで検討することにより、エクソソームの特徴による臓器特異性を同定する。続いて患者検体を用いて、臨床検体におけるエクソソームの検出、疾患特異的なエクソソーム糖鎖の解析、臓器特異性に関与するインテグリンの解析を行った。

3. 研究の方法

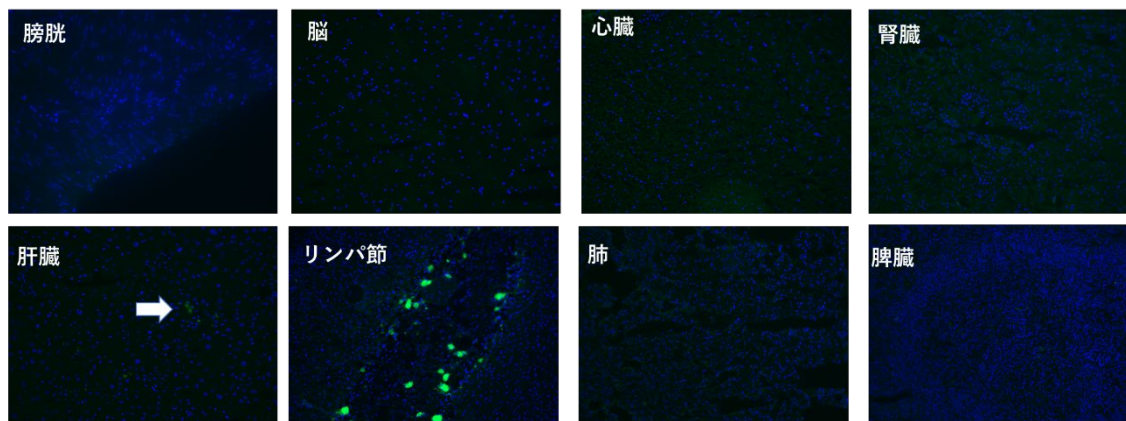
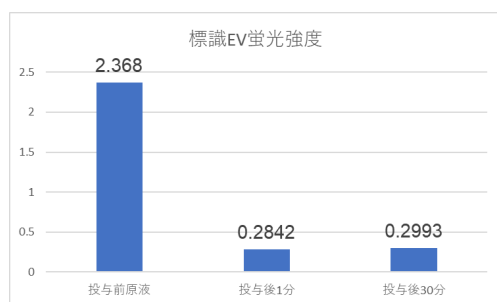
3-1 蛍光標識によるエクソソーム (エクソソーム含有細胞外小胞: EV) 可視化: 細胞株の培養上清よりエクソソーム含有 EV を超遠心で分離し、蛍光標識された EV をマウスに投与し、一定時間の後サクリファイスし蛍光顕微鏡を用いてエクソソーム含有 EV の臓器特異性を確認した。

3-2 エクソソーム含有 EV のマウス前処理による臓器特異的転移の検討: EV を前投与した担癌マウスモデルを用いて、細胞株の転移が促進されるかを検討した。

3-3 臨床検体を用いたエクソソーム含有 EV 糖鎖測定法の確立と接着分子発現についての検討: 臨床検体より超遠心によるエクソソーム含有 EV 回収を行い、エクソソーム含有 EV 表面の糖鎖発現パターンとインテグリンの発現を検討した。

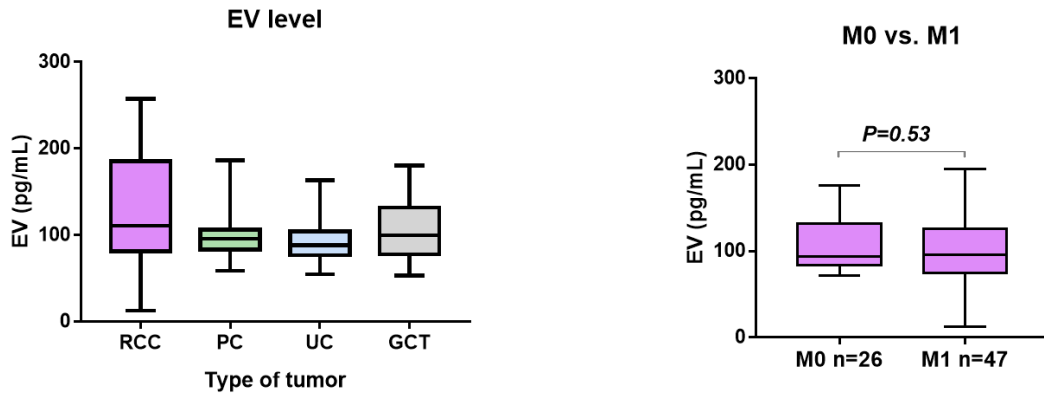
4. 研究成果

4-1 蛍光標識によるエクソソーム含有 EV 可視化: まずはヒト膀胱癌由来細胞株(YTS-1) の培養上清 (15-cm ディッシュ 20 枚、細胞数 8×10^7 cells) から EV(250 ug protein/550uL) を採取。PKH67 でラベルし、標識 EV 蛍光強度 (2.368) を確認した。つづいてマウス 1 には 100uL PKH67 標識 EV (45ug 相当) を尾静注 1 分後にサクリファイスし血液、臓器を回収した。またマウス 2 にも同様に 100uL PKH67 標識 EV (45ug 相当) を尾静注し 30 分後にサクリファイスし血液、臓器を回収した。投与後 1 分、投与後 30 分の血中標識 EV 蛍光強度は 0.2842、0.2993 であり、1 分と 30 分に大きな差はなかった。摘出臓器の集積を確認すると最も多く集積したのはリンパ節、つづいて肝臓であった。その他の臓器には集積は認められなかった。この結果より本腫瘍由来の EV が集まりやすい臓器はリンパ節と肝臓である可能性が示唆された。しかし、リンパ節は非特異的な異物除去反応である可能性があり、長期間観察した場合 (1 日~数日) での変化を確認する必要があることも示唆された。今後の追加検討を予定している。

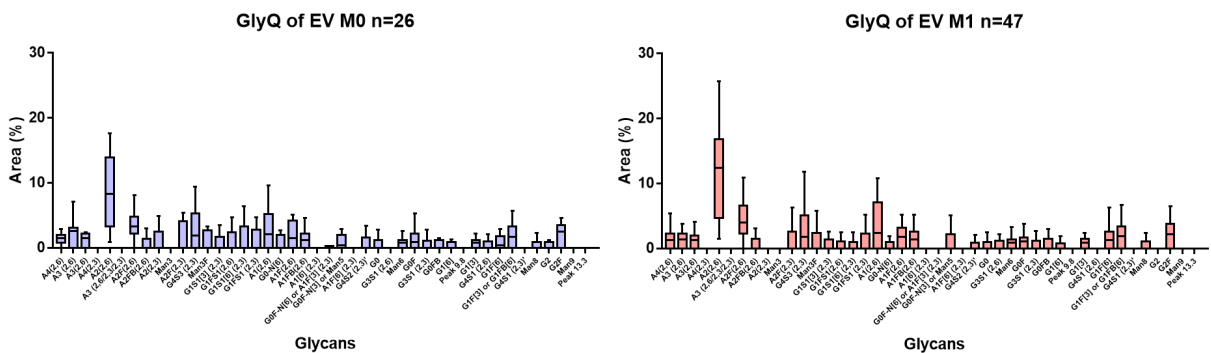


4-2 エキソソームの Maus 前処理による臓器特異的転移の検討: 肺転移能の極めて高い YTS-1 から、超遠心によりエキソソーム含有 EV を調製した。エキソソーム含有 EV を 6 週齢の Balb/c スードマウスに尾静脈経由で注入した (10 µg protein / mouse)。エキソソームによる前処理の 1 週間後、肺転移能を抑えたコータクチンノックダウン細胞株 CKD-YTS-1 を同マウスに尾静脈経由で注入した (2 x 10⁶ cells / mouse)。癌細胞注入の 3 週間後に、肺を摘出したが、肺転移は見られず、本実験からは EV による転移能回復は認められなかった。本実験では転移能を抑制した CKD-YTS-1 側の因子も考えられるため、条件を変えた検討が必要であることが示唆された。

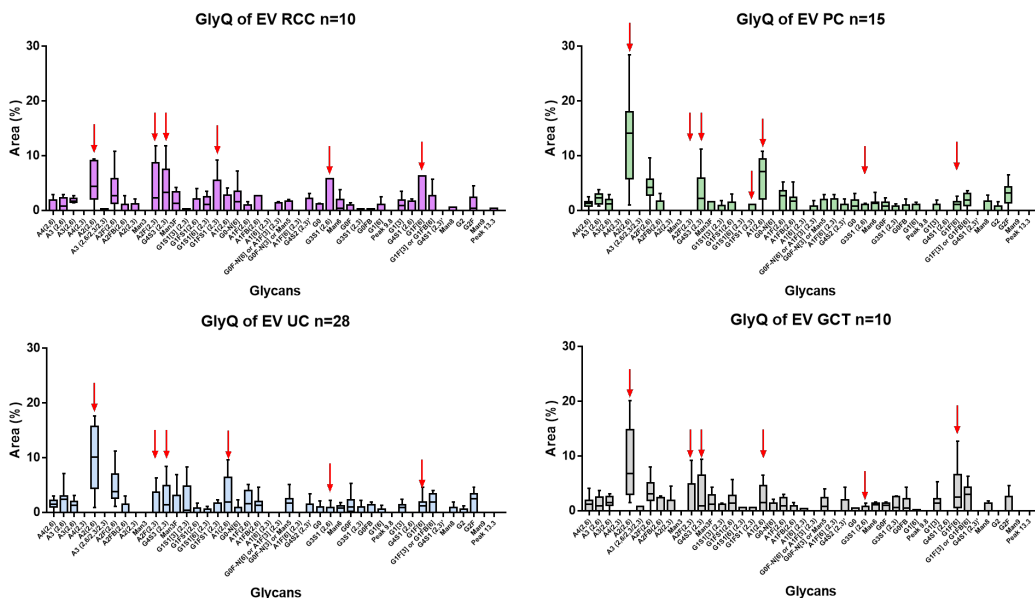
4-3 臨床検体を用いたエキソソーム糖鎖測定法の確立と接着分子発現についての検討: 臨床検体より超遠心によるエキソソーム含有 EV の回収を行い、エキソソーム含有 EV 表面の糖鎖発現パターンとインテグリンの発現を検討した。今回検討した臨床検体は腎癌 10 例、前立腺癌 15 例、尿路上皮癌 28 例、精巣腫瘍 10 例であった。腫瘍ごと、転移の有無で EV 量に大きな差を認めなかった。



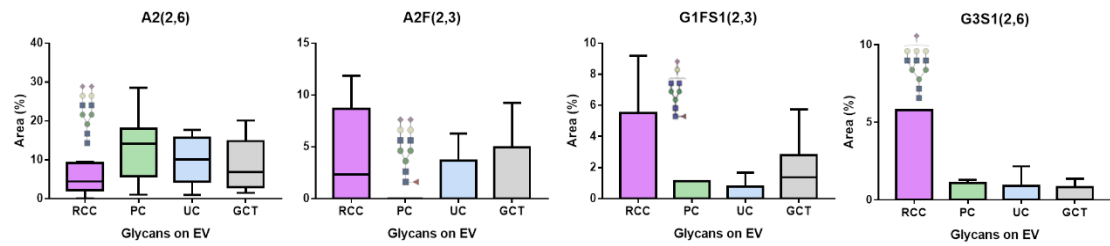
続いて、エキソソーム含有 EV 糖鎖の解析を行った。これも転移の有無で大きな変化は認めなかった。



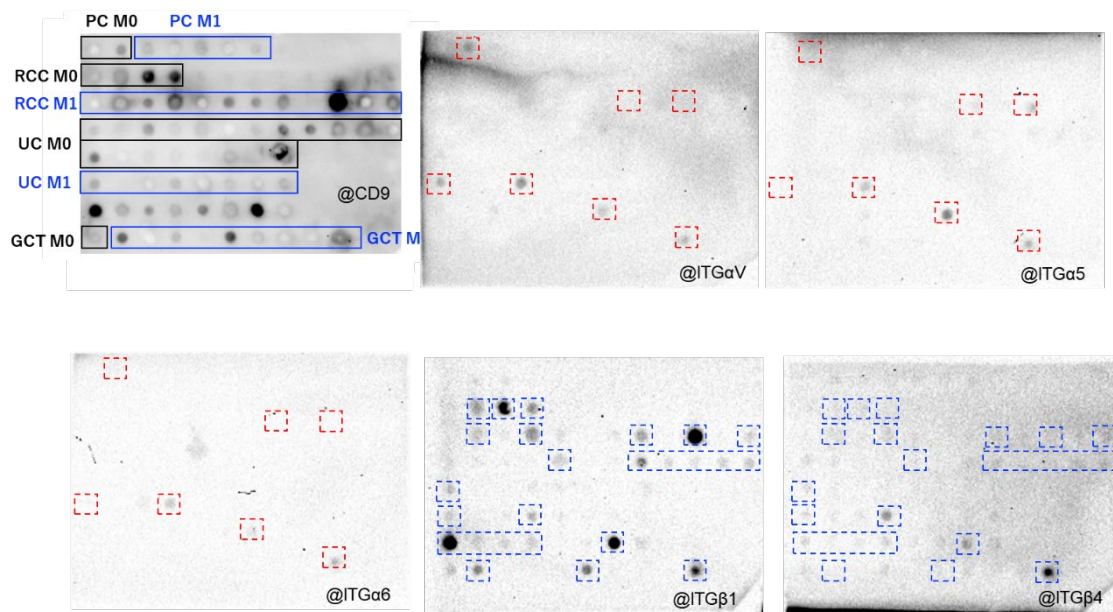
疾患毎にエキソソーム含有 EV 糖鎖の発現を比べるといくつかの糖鎖に傾向があることが示唆された。



特徴的な違いを認めた4つの糖鎖を以下に示す。これらエクソソーム含有EV糖鎖変化の意義は本検討のみでは判別困難であるが、疾患毎にEV糖鎖に違いがあること示したのは本研究が初である。これらエクソソーム含有EV糖鎖の意義については今後検討を予定している。



EVのインテグリンの発現について検討した。疾患特異的に多く発現しているインテグリンは見られなかったがインテグリンβ1が多くのエクソソーム含有EVで認められていた。これらインテグリンの発現意義については、本研究期間では解明しきれなかったが、今後も検討継続を予定している。



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

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