

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08445

研究課題名(和文) 癌関連脂肪細胞の分泌型exosome解析による新たな膵癌進展機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文) pancreatic cancer progression by cancer-associated adipocytes derived exosome

研究代表者

佐藤 康史 (SATO, Yasushi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任教授

研究者番号：80343383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、癌関連脂肪細胞(CAA)が膵癌細胞のSAA-1発現を高め悪性化に重要な役割を果たすことを報告してきた。しかし、その機序については明らかではなかった。そこで本研究では様々な癌関連遺伝子発現の制御を特異的に行うmiRNAに着目し、CAAから分泌されるexosomeが含有するmiRNAのバイオインフォマティクス解析を行った。その結果CAAから産生されたmiRがexosomeを介して膵癌に導入されSOCS7発現を抑制することによりSAA-1発現を上昇させる機序が明らかになった。以上よりmiRが膵癌に対する新規のバイオマーカーや分子標的薬の候補となり得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

本研究によりexosome中のmiRNAプロファイルを明らかにできればliquid biopsyによる膵癌特異的な診断モデルやCAA側を標的とした全く新規の膵癌治療法の開発を行うための研究基盤が得られ、極めて難治である膵癌の診断、治療に大きな革新をもたらすことが期待でき、その臨床的意義は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that cancer-associated adipocytes (CAAs) play an important role in the malignant transformation of pancreatic cancer cells by enhancing their SAA-1 expression. However, the detailed mechanism has not been fully elucidated. In this study, we focused on miRNAs that specifically regulate the expression of various cancer-related genes and investigated the mechanism of CAA-induced pancreatic cancer progression by bioinformatics analysis of miRNAs contained in exosomes secreted from CAA. The results revealed that miRs produced from CAAs are introduced into pancreatic cancer cells via the exosome and suppress SOCS7 expression, thereby up regulating SAA-1 expression and promoting malignant transformation of pancreatic cancer cells. These results suggest that miR may be a candidate for novel biomarkers and molecular-targeted drugs for pancreatic cancer.

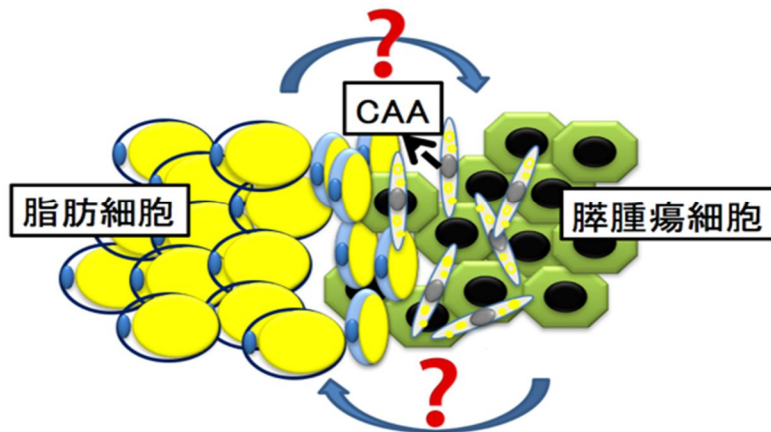
研究分野：消化器病

キーワード：膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は未だ最も予後不良な癌の一つあり、あらたな診断法や治療戦略の開発が大きな課題となっている。これまでに強力な抗癌剤である FOLFIRINOX や nab-paclitaxel/gemcitabine が臨床に導入されたが、十分な効果をあげているとはいえない。その理由として膵癌は早期より間質線維化を形成し、腫瘍細胞の生存のニッチとして働いて浸潤・転移を制御すると同時に、組織間質圧を上昇させ膵癌局所への薬剤の送達を阻害することが挙げられる。したがって、膵癌そのものを標的とする治療には限界があると考えられる。

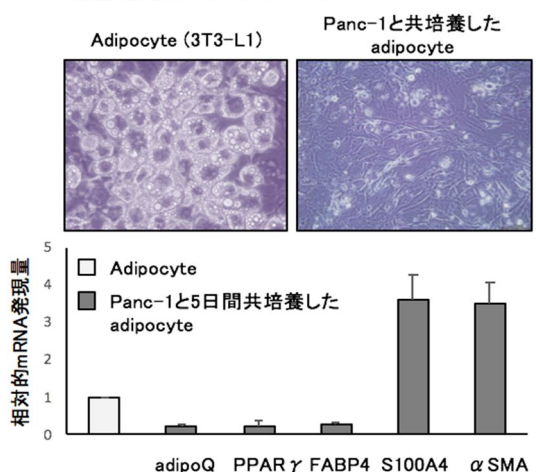
図1 膵癌と周囲脂肪組織の相互作用は未解明である



膵臓は、解剖学的に後腹膜脂肪組織に包まれ容易に脂肪組織へ浸潤し接触する。近年、脂肪組織は単なる「エネルギーの貯蔵庫」ではなく、様々な組織と直接・間接的な相互作用を有すること証明された。がん研究においても、生体内の脂質代謝やアディポサイトカインを介した脂肪組織と腫瘍増殖の関連は数多く報告され、脂肪細胞が癌の増殖・進展を制御することが明らかになった。例えば、乳癌細胞では、その存在下で形質転換が起こった脂肪細胞は Cancer-Associated Adipocyte (CAA) と呼ばれ癌の浸潤能を促進し、乳癌組織内に遊走し癌間質成分となることが報告された。しかし、膵癌における CAA の役割や癌との相互作用については未解明である (図 1)。

これまで、研究代表者は、脂肪細胞と膵癌細胞の相互作用について研究をすすめ、これらの共培養により脂肪細胞は adipocyte marker の減少と、線維芽細胞、筋線維芽細胞 marker の増加を認め CAA に脱分化することを確認している (図 2)。さらに、その培養上清で培養した膵癌の浸潤能、EMT、遊走能薬剤耐性能の亢進を認め、その過程で膵癌における SAA1 の関与を明らかにしている。しかし、CAA 培養上清中のどのような因子がどのような機序で膵癌の浸潤、EMT、薬剤治療抵抗性等に関与するのかが解明されていない。

図2 膵癌細胞株(panc-1)との共培養による脂肪細胞のクロストーク



近年、種々の細胞が分泌するエンドソーム由来の小胞顆粒である exosome は、癌や感染症など多くの疾患において、新たな細胞間・臓器間のコミュニケーション手段として脚光を浴びている。miRNA は、exosome をキャリアとすることで細胞外に分泌され、細胞、組織間で相互作用し機能することが明らかになってきた。しかし exosome 中の miRNA プロファイルは不明であった。

2 . 研究の目的

本研究の目的は膵周囲脂肪細胞から分泌される exosome 中に含まれる miRNA のプロファイルを明らかにすることで膵癌悪性化の機序を解明することであり以下の特色を有する。

- (1) これまでの膵癌自体を標的とする治療開発では限界が指摘されていることから、癌微少環境因子として間質側を標的とする治療に期待が寄せられている。しかし、膵癌周囲の脂肪細胞に着目した研究はほとんど報告されていない。
- (2) その利点として、これまでの膵癌細胞を用いた miRNA 解析では、非特異的な機能をもつ miRNA が多く選択されており臨床的な有用性に乏しかったが、膵癌が浸潤する脂肪細胞は、それらのクロストークにより CAA に脱分化しており膵癌悪性化に直接関わる特異性の高い miRNA プロファイルを分泌している可能性が想定され臨床応用に大きな期待がもてる。
- (3) 今回、miRNA の解析には、次世代 Small RNA シークエンス (Small RNA-Seq) を用いたハイスループット分析を用いることで従来のマイクロアレイ解析では不可能であった低発現の miRNA や isomiR の検出も高精度で検出でき、新規 miRNA の発見も期待できる。
- (4) Exosome 含有 miRNA は、血中에서도極めて安定であることから血清スクリーニングマーカーとしての臨床応用に加え、術後や化学療法中の再発モニタリングマーカーとしても応用可能である。
- (5) さらに、miRNA は治療標的にもなる。つまり、癌進展に関わる多数の遺伝子を同時に制御することができる miRNA の特性を利用し、全く新たな創薬開発への応用が期待出来る。

本研究は、exosome 中の miRNA プロファイルを明らかにすることで、liquid biopsy による膵癌特異的な診断モダリティや CAA 側を標的とした新規の膵癌治療法の開発を行うことを目的とする。

3 . 研究の方法

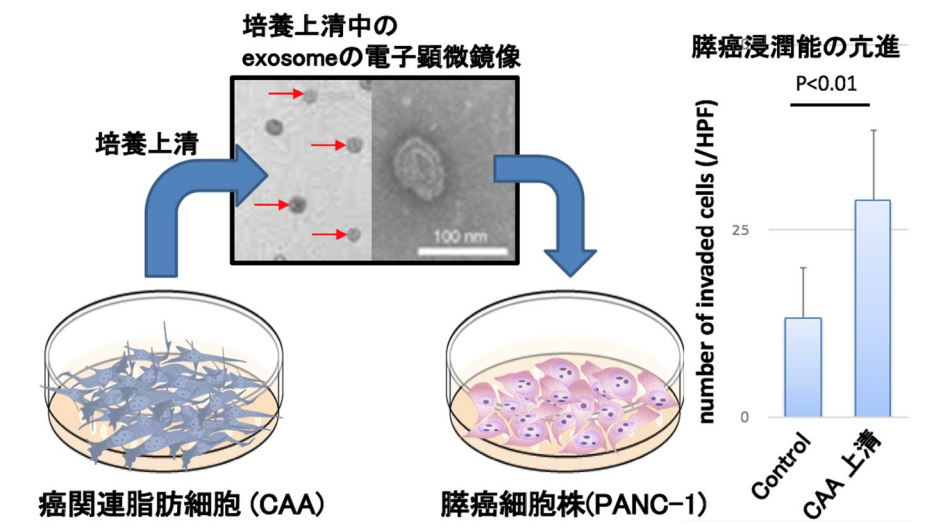
ヒト成熟脂肪細胞は、同意の得られた非癌患者の手術の際に採取した後腹膜脂肪組織をコラゲナーゼ処理後、分化培地で培養し樹立した。成熟脂肪細胞とヒト膵癌細胞 (Panc-1) を Trans well により共培養し CAA を作成した。CAA に無血清培地を加え 48 時間後に上清を CAA の conditioned medium (CAA-CM) として回収した。さらに、CAA-CM で培養した Panc-1 と

脂肪細胞の conditioned medium(A-CM)で培養した Panc-1 を用いて proliferation assay , invasion assay , scratch assay を行うとともに、ゲムシタビンに対する IC50 を算出し比較検討した。また、3 症例から得られた各種 CM から超遠心法で exosome を単離後、exosome 内の miRNA を抽出し次世代 small RNA シークエンスを用いたハイスループット分析による miRNA の解析と TargetScan による target 遺伝子の選定を行なった。さらに、TCGA データセットを用いて miRNA と膵癌の予後との関連について解析した。

4 . 研究成果

CAA-CM で培養した Panc-1 は、A-CM 群に比べ有意に増殖能、浸潤能、遊走能ならびにゲムシタビンに対する薬剤耐性の増加を示した (図 3)。A-CM 群に比べ CAA-CM 群で有意に多く発現していた (FC>2) miRNA の中で、miR-199a-3p を Panc-1 に導入することで増殖能、浸潤能、遊走能、薬剤耐性が増加し、qRT-PCR にて SAA-1 発現の上昇が確認された。また、miR-199a-3p の標的遺伝子としてサイトカインシグナル抑制因子である SOCS7 を同定し、実際に miR-199a-3p 導入 Panc-1 では、SOCS7 の発現低下が確認された。TCGA データセットの解析では miR-199a- high 膵癌患者は miR-199a- low 群に比べて有意に予後が不良であった。

図3 CAA培養上清の添加による膵癌浸潤能の亢進



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 Takehara Masanori, Sato Yasushi, Kimura Tetsuo, Noda Kazuyoshi, Miyamoto Hiroshi, Fujino Yasuteru, Miyoshi Jinsei, Nakamura Fumika, Wada Hironori, Bando Yoshimi, Ikemoto Tetsuya, Shimada Mitsuo, Muguruma Naoki, Takayama Tetsuji	4. 巻 111
2. 論文標題 Cancer associated adipocytes promote pancreatic cancer progression through SAA1 expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2883 ~ 2894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14527	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野田 和克, 佐藤 康史, 高山 哲治
2. 発表標題 癌関連脂肪細胞に由来するエクソソーム内miRNAを介した膵癌進展機構の検討
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田 和克, 佐藤 康史, 高山 哲治
2. 発表標題 癌関連脂肪細胞の分泌型exosome内miRNAによる新たな膵癌進展機序の検討
3. 学会等名 G-PLUS
4. 発表年 2021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	三好 人正 (MIYOSHI Jinsei) (00814625)	徳島大学・病院・診療支援医師 (16101)	
研究分担者	高山 哲治 (TAKAYAMA Tetsuji) (10284994)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	
研究分担者	岡本 耕一 (OKAMOTO Koichi) (60531374)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

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