

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09168

研究課題名(和文) Invisible膵癌に対する新規診断治療法の開発

研究課題名(英文) Novel diagnostic methods for invisible pancreas cancer

研究代表者

渡辺 伸元 (WATANABE, Nobuyuki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20746903

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)：ヒト膵癌細胞株KLM1から分離したエクソソームは、増殖能および運動能の亢進に関与していた。KLM1から分離したエクソソームの網羅的タンパク解析にて、血管新生、運動能に関与するタンパクを同定した。しかし、同定したタンパクの発現は、胆汁中エクソソームでは認めなかった。KLM1はヒト膵癌由来細胞株であり、胆汁は胆道癌患者由来なため、細胞株と臨床検体との違いがあるが、癌種の違いによるものと考えられた。より詳細な検討は必要ではあるが、同定された血管新生、運動能に関与するタンパクは、膵癌特異的なエクソソームのマーカーになる可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌特異的なエクソソームのマーカーになる可能性のある血管新生、運動能に関与するタンパクを同定した。これらのタンパクはinvisible膵癌の診断治療法の開発のための重要な知見であり学術的意義が大きい。本研究により新規治療法開発の可能性が示唆され、実用化されれば、治療成績の向上が期待され社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Exosomes isolated from KLM1 (human pancreatic cancer cell line), were involved in the proliferation and motility. Angiogenesis array revealed the several proteins concerning angiogenesis and motility in exosomes of KLM1. However, these proteins were not identified in bile exosomes. Since KLM1 is a cell line derived from human pancreatic cancer and bile is derived from biliary tract cancer patients, the results were considered to be due to the difference in cancer type. Although further investigation is required, the identified proteins may be markers of pancreatic cancer-specific exosomes.

研究分野：消化器外科

キーワード：invisible膵癌 エクソソーム バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、癌に対する新規治療法の開発は、その治療成績を改善させている。しかし、膵癌は最も予後不良な消化器癌であり、その治療成績は満足のものではなく、新たな治療戦略が必要とされている。

膵癌の治療成績を改善するためには早期診断および早期治療が重要である。しかし画像診断において、癌は肉眼レベルの大きさに到達しなければ診断できない。仮に 1mm サイズの微小膵癌が診断できたとしても細胞レベルでは膨大な数の癌細胞がすでに存在しており、微小膵癌であっても再発、転移が認められる。これらの観点より画像診断に基づく膵癌治療には限界があり、画像では診断できない invisible 膵癌 (目に見えない膵癌) を診断し治療を行うことが必要である。

エクソソームは細胞外小胞とも呼ばれ 30-100nm からなる分泌顆粒であり、様々な細胞から分泌されることが確認されている。エクソソーム内にはマイクロ RNA、mRNA などの核酸やタンパクが内包されており、かつては細胞の不要物を捨てていると考えられていた。しかし、エクソソームが癌細胞間の伝達機構など生体機能に大きく関与することが明らかになり注目されている。エクソソームを用いたリキッドバイオプシーの課題は癌の原発巣および局在診断である。一般的に血液でのリキッドバイオプシーでは、癌と診断できても、その原発巣の特定が困難である。また臓器特異性に関する研究もおこなわれているが、正常組織と癌組織では遺伝子発現が異なり、臓器由来の特定を完全に行うことは困難である。原発巣が膵癌と診断できる膵癌特異的なエクソソームの同定およびその機能を解明することにより、invisible 膵癌の診断治療法の開発が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は原発巣が膵癌と診断できる膵癌特異的なエクソソームの同定およびその機能を解明することにより、invisible 膵癌 (目に見えない膵癌) の診断治療法の開発することである。

3. 研究の方法

【ヒト膵癌細胞株およびマウスマクロファージ細胞株の培養】

ヒト膵癌由来細胞株 KLM1 を、10%FBS を含む RPMI にて 37 度の 5%CO₂ インキュベータで培養を行った。またマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を、10%FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて 37 度の 5%CO₂ キュベータで培養した。ヒト膵癌由来細胞株 KLM1 とマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 の共培養については、接続式細胞容器 NICO-1 を用いて行った。

【臨床検体・細胞株・担癌動物モデルからエクソソームの回収】

膵癌患者の術前と術後 7 日目に採血を行った。この血液サンプルよりエクソソームの回収を行った。また胆管癌患者の胆汁を採取し、希釈後に 100,000G による超遠心法とエクソソーム濃縮試薬 ExoQuick によるカラム法を用いてエクソソームの回収を行った。

ヒト膵癌由来細胞株 KLM1 の培養液からエクソソームを回収した。またヒト膵癌由来細胞株 KLM1 をマウス腹腔内へ投与したマウス膵癌腹膜播種モデルの腹腔内洗浄液よりエクソソームの回収を行った。回収したエクソソームの粒子径をナノサイトにより検討した。

【エクソソームの機能解析】

ヒト膵癌由来細胞株 KLM1 の培養液から分離したエクソソームをマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 に投与し、増殖能に関して WST1 アッセイ、運動能についてスクラッチアッセイにて検討した。

また、接続式細胞容器 NICO-1 のコネクタ部のフィルターにエクソソームの通過不可の

ICCP Filter 0.03(孔サイズ 0.03um)がエクソソームの通過可能な ICCP Filter 1.2(孔サイズ 1.2um)を用いて、ヒト膵癌由来細胞株 KLM1 とマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 の共培養を行った。KLM1 のエクソソームが RAW264.7 の増殖能への影響に関して WST1 アッセイ、運動能についてはスクラッチアッセイにて検討した。

【タンパク発現解析】

回収したエクソソームの actin、 チューブリン、 GAPDH、 CD8、 CD63、 HSP70 の発現をウェスタンブロットティング法にて検討した。

【網羅的タンパク解析】

KLM1 の培養液から分離したエクソソームに関して、angiogenesis array による網羅的タンパク解析を行った。

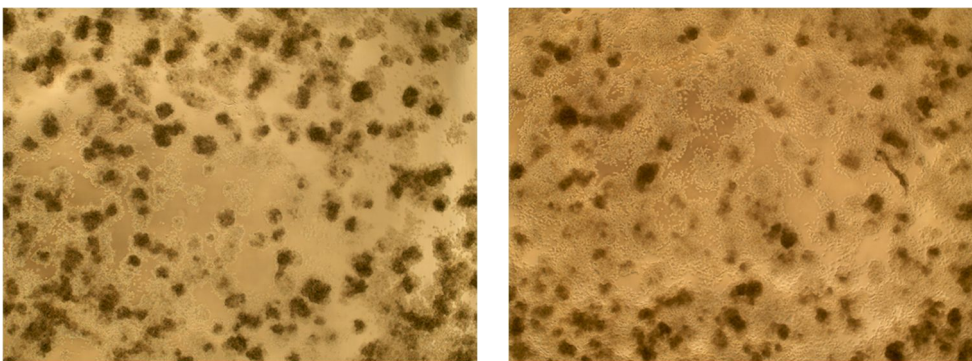
4. 研究成果

【膵癌由来エクソソームの解析】

マウス膵癌腹膜播種モデルの腹腔内洗浄液から分離したエクソソームとヒト膵癌由来細胞株 KLM1 の培養液から分離したエクソソームの比較検討では変化を認めず。マウス腹腔内への移植によりヒト膵癌由来細胞株 KLM1 の特性に変化が生じたと考えられた。しかし、マウス膵癌腹膜播種モデルの腹腔内洗浄液から分離したヒト膵癌由来のエクソソームの回収量が不十分なためか、有意な解析結果は得られなかった。

ヒト膵癌由来細胞株 KLM1 の培養液から分離したエクソソームのマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 への投与により、細胞増殖の亢進を認めた。膵癌から細胞増殖を誘導する因子が分泌されていると考えられた。

この誘導因子がエクソソームであることを明らかにするために、接続式細胞容器 NICO-1 を用いた KLM1 と RAW264.7 の共培養を行った。コネクタ部にエクソソームが移動しない ICCP Filter 0.03(孔サイズ 0.03um)を用いた場合、RAW264.7 の増殖に影響を認めなかった(右下図)。しかし、エクソソームが通過できる ICCP Filter 1.2(孔サイズ 1.2um)では、RAW264.7 の細胞増殖の亢進を認めた(左下図)。この結果より、KLM1 から RAW264.7 のチャンバーにエクソソームが移動し、細胞増殖を誘導していると考えられ、エクソソームの関与が示唆された。



同様に、運動能に関してもエクソソームが移動しない ICCP Filter 0.03 を用いた場合、RAW264.7 の運動能に影響を認めなかったが、エクソソームが通過できる ICCP Filter 1.2 では、RAW264.7 の運動能の亢進を認めた。運動能に関してもエクソソームの関与が示唆された。

【胆汁エクソソームの解析】

胆道癌患者の胆汁からのエクソソームの回収は、超遠心法とカラム法のいずれにおいても可能であり、粒子径 100nm をピークとするエクソソームの回収が可能であった。しかし、カラム法による回収では、ナノサイトにて不純物を示唆する波形が確認された。胆汁中エクソソームでは、ハウスキーピング遺伝子である actin、チューブリン、GAPDH の発現が症例で異なっていた。タンパク定量による標準化後のエクソソームのマーカーである CD8、CD63、HSP70 の発現は、症例により発現パターンが異なっており、エクソソームにおけるタンパクは個体依存性の高いことがわかった。

【エクソソームの網羅的タンパク解析】

KLM1 の培養液から分離したエクソソームの angiogenesis array による網羅的タンパク解析の結果、血管新生、運動能に關与するタンパクの発現を認め、エクソソーム中のタンパクが運動能に關与していると考えられた。

超遠心法とカラム法を用いて、それぞれ回収した胆汁中エクソソームでは、angiogenesis array による網羅的タンパク解析の結果、KLM1 のエクソソームで認めた血管新生、運動能に關与するタンパクの発現を認めなかった。

KLM1 はヒト膵癌由来細胞株であり、胆汁は胆道癌患者由来なため、細胞株と臨床検体との違いがあるが、癌種の違いによるものと考えられた。より詳細な検討は必要ではあるが、同定された血管新生、運動能に關与するタンパクは、膵癌特異的なエクソソームのマーカーになる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Watanabe Nobuyuki, Yokoyama Yukihiro, Ebata Tomoki, Igami Tsuyoshi, Mizuno Takashi, Yamaguchi Junpei, Onoe Shunsuke, Nagino Masato	4. 巻 22
2. 論文標題 The influence of the preoperative thickness of the abdominal cavity on the gastrojejunal anatomic position and delayed gastric emptying after pancreatoduodenectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 HPB	6. 最初と最後の頁 1695 ~ 1702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hpb.2020.03.016	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究分担者	柳野 正人 (NAGINO Masato) (20237564)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	江畑 智希 (EBATA Tomoki) (60362258)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	横山 幸浩 (YOKOYAMA Yukihiro) (80378091)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	
研究分担者	國料 俊男 (KOKURYO Toshio) (60378023)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山口 淳平 (YAMAGUCHI Junpei) (00566987)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	

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