

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16548

研究課題名（和文）タンパク質間相互作用を利用した乳癌細胞由来エクソソームの分子機構の解明

研究課題名（英文）A molecular mechanism of breast cancer cell-derived exosomes using protein-protein interactions

研究代表者

岩淵 英里奈（Iwabuchi, Erina）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70837278

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）：乳癌組織でのエクソソームマーカーCD63，CD81，CD9およびCaveolin-1の発現は血管新生の指標と正相関を示し，また細胞増殖が盛んな症例においても陽性細胞が多く認められた．また，タンパク質間相互作用に着目することで，乳癌細胞株由来のCaveolin-1が分泌に関わるエクソソームにおいては血管内皮細胞に作用し，血管新生を促進すると考えられた．本研究で検討したタンパク質発現は乳癌の悪性度に関連し，血管新生および細胞増殖に関与す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

癌細胞由来エクソソームは血清などを用いてその意義が広く検討されているが，本研究では，通常病理診断で用いられるホルマリン固定パラフィン包埋組織においてエクソソームマーカーの発現を検討し，癌細胞での発現が高い症例では血管新生が促進しており，より悪性度が高いことを示した．本研究により，エクソソームの新たな解析手法を提案し，また病理検査技術や治療法の開発にも寄与することが期待される．

研究成果の概要（英文）：In this study, we immunolocalized the exosome markers CD63, CD81, CD9 and Caveolin-1 in breast cancer tissues and then correlated the findings with microvessel density (MVD) evaluated by CD31 immunohistochemistry. In addition, the levels of CD9-positive cancer cells were also significantly higher in those with high proliferation marker protein Ki-67. We then demonstrated exosomes derived from Cav-1 knockdown-MDA-MB-231 cells increased HUEhT-1 tube formation. Our results indicated that exosome markers and Caveolin-1 positive cancer cells could be involved in clinically and biologically aggressive subtypes of breast cancer, suggesting that it may be involved in angiogenesis and cell proliferation.

研究分野：人体病理学，腫瘍学

キーワード：乳癌 エクソソーム 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は邦人女性の代表的な悪性腫瘍であり、その生物学的特徴を理解し、克服することは大きな課題である。近年、癌細胞や間質の正常細胞から分泌されるエクソソームが癌の機能に関わることが報告されており、エクソソームの機能解析は乳癌においても重要である。エクソソームマーカーとしてはいくつかのタンパクが知られており、特にテトラスパニンファミリーである CD63, CD9, CD81 は多くの研究分野でエクソソームマーカーとして利用されている。固形腫瘍におけるパラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学的検討も行われており、腺組織では CD63 および CD9 が正常部と比較して腫瘍部において発現が亢進していることが報告されており、胃癌や消化管間質腫瘍 GIST では腫瘍細胞での CD63 の発現が予後不良と関連することが報告されているが、乳癌で検討した報告はなく、病理組織上での検出意義を明らかにすることは重要であると考えられる。また、癌細胞から分泌されるエクソソームは様々なタンパクや RNA を内包し、別の細胞に取り込まれることで機能を発揮するが、その分泌機構については十分に明らかになってはおらず、分泌機構の解明は癌の性状を理解し、また新たな治療につながるものと考えられる。Caveolin-1 はエクソソームの細胞内への取り込みを負に制御することが報告されているタンパクであるが分泌に関しては検討されておらず、本研究ではこの Caveolin-1 にも着目した。

2. 研究の目的

本研究では乳癌組織の病理組織におけるエクソソームマーカーの発現意義、および乳癌細胞からのエクソソーム分泌に関わる因子について、タンパク質間相互作用に着目した検討を行った。本研究課題により新たなエクソソーム解析手法を提案するとともに、癌細胞からのエクソソーム分泌に関わる因子を明らかにし、新たな病理検査技術や治療の開発に寄与することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学

乳癌組織 88 症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。ストレプトアビジン・ビオチン法を用いて、免疫組織化学にて、エクソソームマーカー CD63, CD81, CD9 の発現および Caveolin-1 の発現を検討し、臨床病理学的因子との関係を解析した。また、癌細胞の増殖能の評価には Ki67 を用い、microvessel density (MVD) の評価には CD31 を用いた。

(2) 近接ライゲーションアッセイ

Duolink In Situ PLA kit (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) を使用した。ヒト乳癌培養細胞株 MDA-MB-231 を 4%PFA で 37°C 10 分間固定した。ブロッキング試薬により 37°C で 30 分間反応させた後に、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、オリゴヌクレオチドを連結した二次抗体溶液を添加し、37°C で 1 時間インキュベートし、2 種類のオリゴを含有する Ligation solution とリガーゼを加えて 37°C で 30 分間反応させた。さらに、Amplification solution とポリメラーゼを加え 37°C で 100 分間反応させ、DAPI による核染を行い、蛍光顕微鏡にて red (Ex/Em: 594/624 nm, タンパク質間相互作用)、blue (Ex/Em: 345/455 nm, 核) のそれぞれの波長で陽性画像を検出した。

(3) ウェスタンブロット

Simple Western assay (Protein Simple, San Jose, CA, USA) を用いた。Exosome-Depleted FBS (System Biosciences, Palo Alto, CA) を 10% 含有した培地にて MDA-MB-231 を用いて 2 種類の siRNA により Caveolin-1 発現をノックダウンし、細胞培養上清からエクソソームを ExoQuick-TC (System Biosciences) により精製し、タンパクを抽出して CD63 の発現検討を行った。

(4) RNA-seq

Caveolin-1 発現をノックダウンした MDA-MB-231 と血管内皮細胞培養株 HUEhT-1 を 72 時間共培養した後に HUEhT-1 より RNA を抽出し、RNA-seq を実施し、そのデータをもとに発現変動遺伝子解析を行った。(株式会社 Rhelixa, 東京)

(5) 管腔形成能の評価

Caveolin-1 発現をノックダウンした MDA-MB-231 の培養上清から精製したエクソソームを HUEhT-1 に添加し、16 時間培養後に Calcein-AM にて HUEhT-1 を染色し、LuminaVisionOL (三谷商業株式会社, 東京) を用いて管腔形成能を評価した。

4. 研究成果

(1) 乳癌組織におけるエクソソームマーカーの発現と臨床病理学的因子との関係

CD63 は細胞質および細胞膜の陽性像 (主に細胞質に陽性) を, CD81 および CD9 は細胞膜での陽性像を評価した (図 1). また, Caveolin-1 についても細胞膜および細胞質の陽性像 (主に細胞質に陽性) を評価した (図 1). CD63 と Caveolin-1, CD81 と CD9 は正相関を示し, CD63 と CD81 および CD9 についても正相関傾向が認められた. CD9 については癌細胞での発現が高い症例で Ki67 の発現も高く, 増殖能が高い症例とも関連があることが示された. また, これら 4 種類の全ての組み合わせについて両タンパクが陽性の症例で MVD と正相関を示した (表 1). したがって, エクソソームマーカーおよび Caveolin-1 の発現が高い症例では血管新生が促進しており, また CD9 については癌細胞の増殖促進とも関連がある可能性が示唆された. また, それぞれのエクソソームマーカーが乳癌バイオマーカーである ER (エストロゲン受容体), PR (プロゲステロン受容体), および HER2 (上皮成長因子受容体) とも関連を示しており, 今後乳癌バイオマーカーによるサブタイプにも着目し, より多くの症例で解析を進めていく.

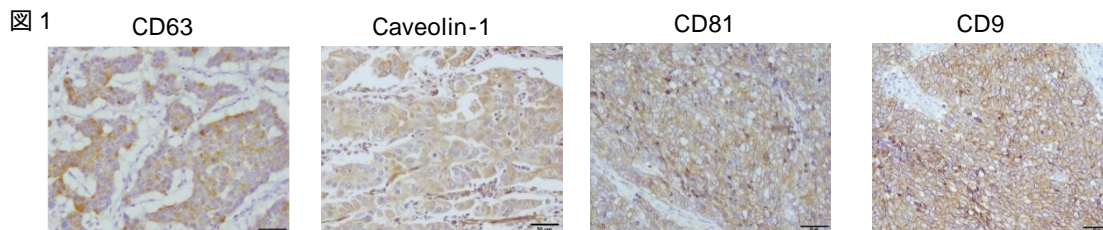


表 1

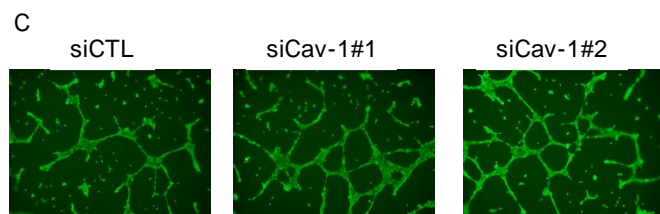
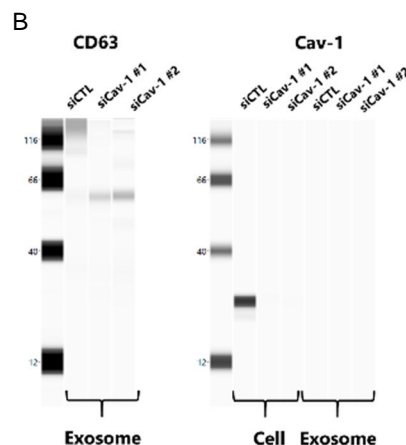
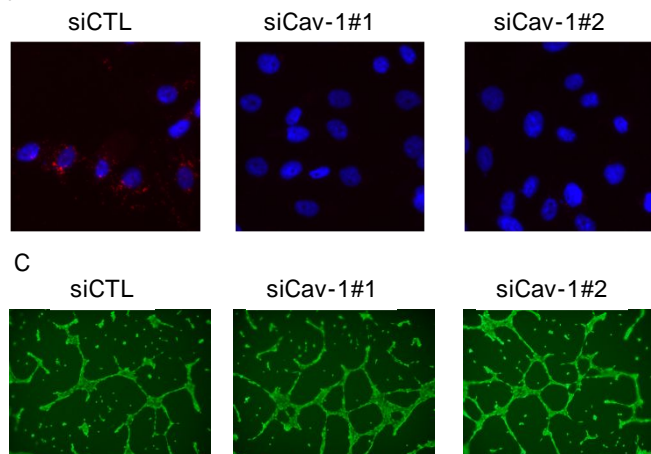
| | | CD63/Caveolin-1 | | | | CD81/CD9 | | | |
|-----|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | | Double Positive | Single Positive | Double Negative | <i>p</i> value | Double Positive | Single Positive | Double Negative | <i>p</i> value |
| MVD | Positive | 17 | 9 | 6 | <i>p</i> = 0.0054 | 15 | 10 | 7 | <i>p</i> = 0.0009 |
| | Negative | 11 | 25 | 20 | | 12 | 9 | 35 | |

(2) 乳癌培養細胞由来エクソソームが血管内皮細胞に与える影響

乳癌培養細胞株由来エクソソームが周囲の微小環境に与える影響を検討するため, 本研究では特に血管新生に着目し, 血管内皮細胞を用いた検討を実施した.

乳癌組織での結果から, 近接ライゲーションアッセイ により Caveolin-1 および CD63 について検討した. その結果 MDA-MB-231 にて Caveolin-1 および CD63 のタンパク質間相互作用が検出されたが, 一方で Caveolin-1 発現をノックダウンした細胞では陰性となった (図 2A). また Caveolin-1 をノックダウンした細胞の培養上清中のエクソソームを用いてタンパク発現解析を行ったところ, CD63 の発現が増加していた (図 2B). また, RNA-seq の発現変動遺伝子解析により Caveolin-1 をノックダウンした MDA-MB-231 と共培養した HUEhT-1 ではいくつかの血管新生に関わる因子の発現の増加が認められた. さらに, Caveolin-1 をノックダウンした MDA-MB-231 のエクソソームを HUEhT-1 に添加し, 管腔形成能に与える影響を確認したところ Caveolin-1 ノックダウン細胞のエクソソームを添加した HUEhT-1 では管腔面積が増加し, 管腔形成を促進することを示す結果が得られたが, その他分岐点数や枝数等の指標でも管腔形成能を評価するために, 現在継続して検討を行っている (図 2C). 本研究より, Caveolin-1 が発現する乳癌においては Caveolin-1 がエクソソームの分泌に関わり, また Caveolin-1 による制御を受けたエクソソームは血管内皮細胞に作用し, 血管新生に促進的に働くことが示唆された.

図 2A



<引用文献>

Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, Mörgelin M, Belting M. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem.* 2013 Jun 14;288(24):17713-24.

Lewitowicz P, Matykiewicz J, Koziel D, Chrapek M, Horecka-Lewitowicz A, Gluszek S. CD63 and GLUT-1 Overexpression Could Predict a Poor Clinical Outcome in GIST: A Study of 54 Cases with Follow-Up. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:6478374.

Khushman M, Patel GK, Laurini JA, Bhardwaj A, Roveda K, Donnell R, Sherling K, Case B, Frankel AE, Pai S, Taylor W, Tan MCB, Mizrahi M, Nelson C, Wyatt M, Patton M, McClellan S, Singh S, Wang B, Singh AP. Exosomal markers (CD63 and CD9) expression and their prognostic significance using immunohistochemistry in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol.* 2019 Aug;10(4):695-702.

Miki Y, Yashiro M, Okuno T, Kuroda K, Togano S, Hirakawa K, Ohira M. Clinico-pathological significance of exosome marker CD63 expression on cancer cells and stromal cells in gastric cancer. *PLoS One.* 2018 Sep 17;13(9):e0202956.

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 Iwabuchi E, Miki Y, Suzuki T, Hirakawa H, Ishida T, Sasano H | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Is Involved in the Estrogen-Signaling Pathway in Breast Cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci | 6. 最初と最後の頁 2581 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052581 | 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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Iwabuchi E, Miki Y, Takagi K, Onodera Y, Shibahara Y, Ishida T, Sasano H |
| 2. 発表標題 The expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 and 8 in breast cancer |
| 3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 三木康宏, 岩淵英里奈, 鈴木貴, 笹野公伸, 伊藤潔 |
| 2. 発表標題 ホルモン依存性癌におけるホルモンシグナルの可視化 |
| 3. 学会等名 第92回 日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Iwabuchi E, Miki Y, Sasano H |
| 2. 発表標題 Visualization of estrogen receptor dimers in breast cancer cells |
| 3. 学会等名 第92回 日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岩淵英里奈, 三木康宏, 小野克彦, 小野寺好明, 金井綾子, 宮下穰, 鈴木貴, 石田孝宣, 笹野公伸 |
| 2. 発表標題 乳癌におけるタンパク質間相互作用の可視化と病理診断への応用に向けた検討 |
| 3. 学会等名 第16回 日本病理学会カンファレンス |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Iwabuchi E, Miki Y, Ishida T, Sasano H |
| 2. 発表標題 The zinc transporters, ZnT5 and ZnT6, in breast cancer. |
| 3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岩淵英里奈, 三木康宏, 徐クン瑶, 金井綾子, 石田孝宣, 笹野公伸 |
| 2. 発表標題 乳癌におけるZinc transporter 5およびZinc transporter 6の発現意義 |
| 3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岩淵英里奈, 三木康宏, 伊藤潔, 笹野公伸 |
| 2. 発表標題 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Kとエストロゲンシグナルに及ぼす影響の検討 |
| 3. 学会等名 第25回日本生殖内分泌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岩淵英里奈, 三木康宏, 笹野公伸 |
| 2. 発表標題 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Kとエストロゲン受容体の相互作用に関する検討 |
| 3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Iwabuchi E, Miki Y, Ito K, Ishida T, Sasano H |
| 2. 発表標題 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Is Involved In The Estrogen-Signaling Pathway. |
| 3. 学会等名 ENDO2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |