

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16848

研究課題名(和文) エクソソーム分泌を阻害する低分子化合物のスクリーニングによる新規がん治療薬の開発

研究課題名(英文) Discovery of an inhibitor for exosome secretion in cancer cells using a small-molecule library approach.

研究代表者

吉岡 祐亮(吉岡祐亮)(Yoshioka, Yusuke)

東京医科大学・医学部・講師(特任)

研究者番号：60721503

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)：エクソソームの分泌阻害を利用した新規がん治療法の開発を目的として、低分子化合物ライブラリと研究代表者が開発したエクソソーム定量法であるExoScreen法を組み合わせ、卵巣がん細胞のエクソソーム分泌を阻害する低分子化合物を探索した。その結果、卵巣がん細胞のエクソソーム分泌を抑制する化合物を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、卵巣がん細胞が分泌するエクソソームを介した細胞間コミュニケーションを断つ方法の一つとして、新たながん転移予防法へと繋がる可能性がある。また選択された化合物はすでにFADにおいて承認されている化合物であるため、実用化への道のりを目指しやすい。本方法を用いることで卵巣がんのみならず、様々ながん種および疾患へと応用可能である。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the screening of small-molecule inhibitors for exosome secretion in ovarian cancer cells. Screening system is based on ExoScreen assay for monitoring CD9 positive EV secretion. Using this screening system and a chemical compound library inhibitors for exosome secretion were identified in the ovarian cancer cell line ES-2. As a result of the screening, some small molecules were selected as candidate molecules for inhibitors of exosome-secretion and some molecules inhibited exosome secretion in a cancer cell specific manner.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 がん がんの転移 低分子化合物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、がんは日本人の死因第1位であり、有効な治療法の確立が求められている。死因の最大要因は、がんの浸潤および転移であり、がんの転移を阻害することは重要な課題である。がんの転移については、古くから研究されており、1889年にPagetが「Seed and soil theory」を提唱したように、がん細胞(seed)のみならず、周囲の適切な環境(soil)が転移には重要であると考えられている(Paget S, Lancet, 1889)。すなわち、がん細胞間および、がん細胞とその周囲に存在する免疫細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞などの間質細胞とのコミュニケーションによって転移に必要な環境を整えている。しかし、その詳細は全容解明されておらず、多数のメカニズムが存在していると考えられている。近年、新たな細胞間コミュニケーションツールとして、ほぼ全ての細胞が分泌する100 nmほどの小胞顆粒エクソソームが注目されている。細胞はエクソソームにmicroRNA(miRNA)、mRNAなどの核酸やタンパク質を内包し、近傍細胞のみならず遠隔地の細胞に対し、機能分子を渡しており、サイトカインやケモカイン、接着分子などの従来の細胞間コミュニケーションツールでは説明が出来なかった現象の解明の糸口になりうる。実際に腫瘍内もしくは転移先臓器とのコミュニケーションツールとしてエクソソームが利用されており、エクソソームによるがん悪性化メカニズムの報告が多くある。特に転移に関する報告は多数あり、エクソソームに着目した転移メカニズムの解明に期待が寄せられている。がん悪性化に関連する機能分子がエクソソームに内包され、受容細胞において、それら分子が機能することは多くの報告から明らかである。一方で、どのように細胞からエクソソームが分泌され、どのように受容細胞に取り込まれ、どのように細胞内で機能するのか、一連の分子メカニズムの理解は未だに乏しいため、エクソソームの分泌、取り込みの制御を含むエクソソームの機能停止を標的とした治療薬の開発は進んでいない。

2. 研究の目的

エクソソームの分泌経路には複数分子の関与が示唆されており、いくつか関連分子は報告されている(Ostrowski M et al., Nat Cell Biol., 2010)。しかし、それら分子の発現を抑制してもエクソソームの分泌は半分も減少しないことから、分泌経路も複数経路あるという見方があること、がん細胞は正常細胞と比較して、エクソソーム分泌量が多い傾向があるため(Hannafon BN et al., Int J Mol Sci, 2013)、がん細胞には特異的な分泌経路の存在が示唆されている。そのため、がん細胞特異的なエクソソーム分泌経路を制御することで、新規治療法に繋がると考えている。本研究では、これらを踏まえ、卵巣がん細胞において、低分子化合物によるエクソソームの分泌制御を検討し、エクソソーム分泌の阻害を標的とした新たながん治療薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では低分子化合物ライブラリを用いて、がん細胞におけるエクソソーム分泌阻害薬および治療薬としてドラッグリポジショニングを狙う。卵巣がん細胞のエクソソーム分泌を定量化する方法として、以前、開発したエクソソーム測定法であるExoScreen法を利用する(Yoshioka Y et al., Nat Commun, 2014)。ExoScreen法はエクソソームの定量作業に従来必要であったエクソソームの精製工程が不要となり、培養上清10 µLから直接エクソソームの検出が可能であり、96ウェルプレートでのスクリーニングがおよそ2時間で完了し、ハイスループット性に優れている。96ウェルプレートにおいて、それぞれの化合物を含む培養液で卵巣がん細胞ES-2を24時間培養した後、培養上清中に含まれるCD9陽性もしくはCD63陽性エクソソームを定量する。また、培養上清中のエクソソーム量は細胞数に比例すると考えられるため、タイムラプス画像による継時的な細胞数変化を計測する機器(エッセンパイオサイエンス社 IncuCyte)を用いて、各ウェルの細胞数を測定し、エクソソーム分泌量を補正する。明らかに細胞死が誘導されているウェル(化合物)は目的とするエクソソーム分泌阻害薬としては不適切であるため除く。これらのスクリーニング結果より、阻害薬の候補を挙げ、次いで、他の卵巣がん細胞株SK-OV-3と卵巣表面上皮細胞株HOSE-1および中皮細胞株Met5Aを用いて、同様の実験を行い、1次スクリーニングの結果を検証する。また、候補化合物について、ExoScreen以外のエクソソーム定量方法として、NanoSightという微粒子解析装置を用いてエクソソーム粒子数を測定し、エクソソームの分泌が抑制されることを同様に確認する。

4. 研究成果

はじめに、研究代表が開発したエクソソーム測定法であるExoScreen法を用いて、卵巣がん細胞株のエクソソーム分泌量を測定するための条件を検討し、96ウェルプレートで培養する際の細胞数や培養時間を決定した。決定した条件において、CD9陽性もしくはCD63陽性のエクソソーム量を測定することができた。ついで、1271種類の化合物が含まれるライブラリとタイムラプス画像による継時的な細胞数変化を計測する機器を用いて化合物が卵巣がん細胞の増殖に及ぼす影響を分析しながら、ExoScreen法にてエクソソーム分泌量を測定した。これを1次スクリー

ニングとして、さらに絞り込んだ低分子化合物について、2次スクリーニングとして同様の実験を行い、最終的には、8種類の化合物をエクソソーム分泌抑制剤の候補化合物として選出した。スクリーニング時は、卵巣がん細胞 ES-2 のみを用いてエクソソーム分泌量を評価したが、ES-2 細胞に加えて、非がん細胞株を2種類加えてエクソソーム分泌を評価した。非がん細胞株は、ヒト卵巣上皮細胞 HOSE1、中皮細胞 Met5A を用いて、非がん細胞株の細胞毒性、エクソソーム分泌量を評価した。エクソソーム分泌を評価する方法としては、スクリーニング同様 ExoScreen 法を行った。また、ExoScreen 法に加えて、抗体チップアレイの原理を用いた ExoView による CD63、CD9、CD81 陽性エクソソームの分泌量の評価と NanoSight による微粒子の測定を行った。その結果、最終的に2種類の化合物が卵巣がん細胞株のみ分泌を抑制することを明らかにした。

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 Kogure Akiko, Yoshioka Yusuke, Ochiya Takahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Extracellular Vesicles in Cancer Metastasis: Potential as Therapeutic Targets and Materials	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4463 ~ 4463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21124463	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉岡祐亮, 横井暁, 落谷孝広.
2. 発表標題 エクソソーム分泌を阻害する低分子化合物のスクリーニング (Discovery of an inhibitor for EV secretion in cancer cells using a small-molecule library)
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡祐亮, 横井暁, 落谷孝広.
2. 発表標題 エクソソーム分泌を阻害する低分子化合物のスクリーニング
3. 学会等名 第6回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya.
2. 発表標題 Role of Extracellular Vesicles in Cancer: Possible Diagnostic and Therapeutic Applications.
3. 学会等名 Japan Association for Animal Cell Technology 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡祐亮, 落谷孝広
2. 発表標題 細胞外小胞エクソソームの生理学的機能と臨床応用: エクソソームは生体ネットワーク解析の新たなツールとなりうるか?
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉岡 祐亮、落谷 孝広	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 199
3. 書名 決定版エクソソーム実験ガイド	

〔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
---------	---------