

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：87102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18092

研究課題名（和文）肝癌微小環境における癌関連線維芽細胞エクソソームをターゲットとした新規治療法開発

研究課題名（英文）Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma progression by exosome

研究代表者

間野 洋平（Mano, Yohei）

独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・肝胆膵外科医師

研究者番号：10792244

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）：肝癌に対して肝切除を行った症例について、癌部(CAF)と非癌部(NF)の線維芽細胞を分離培養し、CAFとNFから抽出したエクソソームをHCC細胞株に添加したところ、CAF由来エクソソームによる刺激のほう有意に浸潤能や遊走能を上昇させた。エクソソーム内のmiRNAについてCAFではmiR150-3pの発言が有意に低下していることが明らかとなった。miR150-3pを強制発現したエクソソームの添加により、肝癌細胞株の遊走能と浸潤能が抑制されることを確認し、エクソソームに含まれるmiR150-3pが肝癌細胞を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は予後不良な悪性腫瘍の一つであり、新たな治療法の開発は急務の課題である。癌の微小環境に対する治療はまだ発展途上であり、今回の研究はその微小環境の一部である線維芽細胞の役割を明らかにした研究である。癌の治療は癌細胞に対するものがほとんどであるが、線維芽細胞という癌細胞とは異なる細胞を治療ターゲットとすることで、これまでとは異なった新たな治療戦略の発展につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：MiR-150-3p was significantly reduced in CAFs-derived exosomes, and inhibited HCC migration and invasiveness. MiR-150-3p was transferred from CAFs transfected miR-150-3p to HCC cells through exosomes, and abrogated HCC migration and invasiveness. Furthermore, low miR-150-3p expression in HCC tissues was a significant risk factor for recurrence in HCC patients. More importantly, survival rate in patients with low miR-150-3p levels in plasma exosomes was significantly poor compared with that in patients with high miR-150-3p levels. Overall, our findings suggest that the loss of antitumoral miR-150-3p in CAFs-derived exosomes greatly promotes HCC progression. Exosomal miR-150-3p is a potential prognostic biomarker, and transferring miR-150-3p-loaded exosomes to HCC cells might become a novel therapeutic option.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 癌関連線維芽細胞 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

肝癌は、全世界において肝癌罹患患者数は全癌種中第6位(5.6%)である。また、肝癌による死亡者数は約74万人であり、全癌種中第2位(9.1%)となっている。一方我が国では、その死亡者数は毎年3万人を超えており、我が国のがん対策において、重要な疾患と見なされている。我が国の肝癌において、肝細胞癌は約95%を占めており、またその成因としては約80%がウイルス性肝炎例であった。また非B非C症例が占める割合は、年々増加の一途を辿っており、その実態の解明は今後の重要な課題である(平成27年度肝がん白書)。さらに、それらの発癌した症例の背景肝は約67%が肝硬変を伴っており、肝線維化が発癌に及ぼす影響が多分にあることが推測される。

現在、慢性炎症に起因する肝線維化進展は、肝星細胞と肝線維芽細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。肝星細胞や線維芽細胞を活性化する分子として、肝細胞障害により分泌される Apoptotic body、DAMPs (Damage-associated molecular patterns)、PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns)や、炎症細胞から分泌される炎症性サイトカインなどの関与が報告されており、その結果肝線維化の進展や発癌につながると考えられる。また一方では、活性化した肝星細胞、線維芽細胞が分泌するサイトカイン・ケモカインにより、肝臓内のマクロファージ、T細胞などの免疫活性が抑制、あるいは癌に有利な Phenotype への分化誘導が惹起される。肝臓内の慢性炎症においては、このような線維芽細胞や免疫細胞の相互作用によって、肝発癌や癌の進展に有利な微小環境が形成されていくと考えられている。

また、近年、癌細胞が分泌するエクソソームと呼ばれる小胞体が癌の進展において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。一方で、癌微小環境の構成細胞である線維芽細胞が分泌するエクソソームについては、その役割について詳細は未だ明らかになっていない。

エクソソームは40-120nm程度の小胞体である(図1)。内部には様々なタンパク質や mRNA、miRNA などの物質が含まれており、新たな細胞間のコミュニケーションツールとして注目されており、肝癌微小環境において、癌関連線維芽細胞由来のエクソソームの役割を明らかにすることは、新たな治療ターゲットの発明につながると考えられる。

2. 研究の目的

肝癌における CAF 由来のエクソソームが、癌微小環境においてどのような役割を果たしているかが明らかにすることを目的とした。以上のことが明らかになれば、肝発癌あるいは肝癌進展に対する新たな治療標的を同定することが可能となり、新たな肝癌予防薬、肝癌治療薬の開発に繋がる可能性が大いに考えられる。また、CAF は肝癌以外の領域でも重要な癌微小環境を構成する細胞であるため、将来的にはその他の癌治療への応用も期待される。

3. 研究の方法

1. CAF と NF が産生するエクソソームを分離し、エクソソームの添加による癌細胞の変化について評価した。
2. CAF 由来エクソソームと NF 由来エクソソームの含有物質について、マイクロアレイを用いて網羅的解析を行い、CAF で優位に多い発現あるいは少ない発現を示す mRNA や miRNA を抽出した。
3. 2. で明らかになった miRNA について、強制発現モデルを作成し、エクソソームの機能変化を評価した。
4. 2.、3. で機能的変化を示した RNA あるいは miRNA について、臨床検体における発現を評価した。

4. 研究成果

肝癌に対して肝切除を行った症例について、6例から癌部と非癌部の線維芽細胞の抽出に成功した。それぞれ抽出した細胞については、分離培養を行った(図1)。

癌関連線維芽細胞(CAF)と非癌部線維芽細胞(NF)の培養上清を抽出し、試薬を用いてエクソソームを抽出した。エクソソームの存在用かはマーカーである CD9 と CD63 の発現をウエスタンブロット法にて確認し、電子顕微鏡にてエクソソームと思われる小胞の存在も確認した。

CAF と NF から抽出したエク

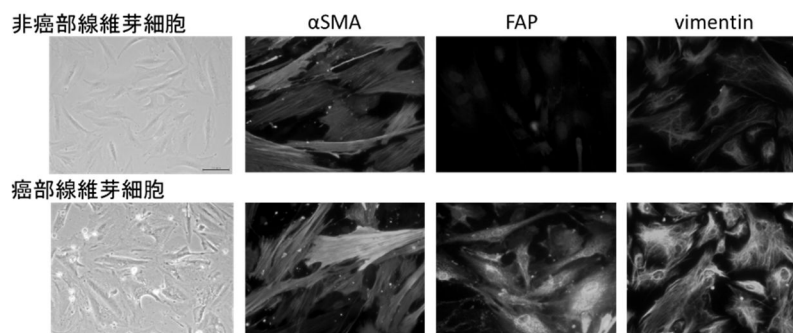


図1 分離した線維芽細胞の蛍光免疫染色

ソソームをHCC細胞株に添加したところ、CAF由来エクソソームによる刺激のほうが有意に浸潤能や遊走能を上昇させた(図2)。この結果について検証するために、CAF由来とNF由来の上清からエクソソームを除去してHCC細胞株に添加して比較したところ、浸潤能や遊走能に有意差は認めなかった。これによりCAF由来のエクソソームによる刺激が重要であることを確認した。エクソソームをPKH26で標識してHCC細胞株に添加したところ、CAF由来もNF由来もいずれも細胞株内に取り込まれていることを確認された。

エクソソーム内のmiRNAについてアレイで発現量の比較を行ったところ、CAFではmiR150-3pの発現が有意に低下していることが明らかとなった。

エクソソーム内のmiRNAについてアレイで発現量の比較を行ったところ、CAFではmiR150-3pの発現が有意に低下していることが明らかとなった。miR150-3pを強制発現したエクソソームの添加により、肝癌細胞株の遊走能と浸潤能が抑制されることを確認し、エクソソームに含まれるmiR150-3pが肝癌細胞を抑制することを明らかにした。

次に、肝癌患者の臨床サンプルを用いた検討では、肝癌組織においてmiR150-3pの発現が低い症例では再発リスクが高く、末梢血中のmiR150-3pが低い症例がより予後が不良であることが確認され、癌関連線維芽細胞におけるmiR150-3pの発現低下が肝癌の進展に深くかかわっていることを明らかにした(図3)。

以上のように、肝癌において癌関連線維芽細胞はエクソソーム内のmiR150-3pを介して肝癌細胞の進展に深く関わっていることが明らかになった。これらの因子や癌関連線維芽細胞を治療標的とすることで新たな治療法の展開が期待される。

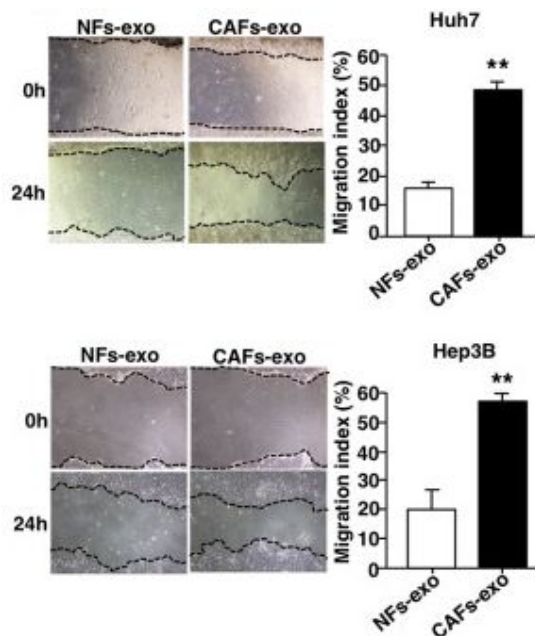


図2 CAF由来エクソソームによる癌細胞遊走能変化

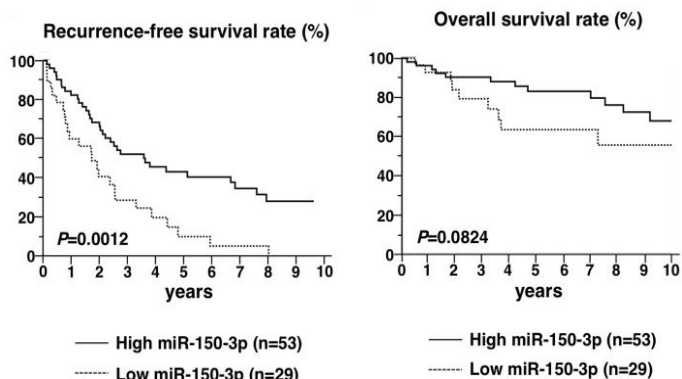


図3 癌組織内miR150-3p発現量の違いによる予後比較

(左)無再発生存率、(右)全生存率

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 0件）

1. 著者名 Yugawa Kyohei, Yoshizumi Tomoharu, Mano Yohei, Itoh Shinji, Harada Noboru, Ikegami Toru, Kohashi Kenichi, Oda Yoshinao, Mori Masaki	4. 巻 47
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma progression through downregulation of exosomal miR-150-3p	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 384 ~ 393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejso.2020.08.002	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湯川 恭平, 吉住 朋晴, 間野 洋平, 伊勢田 憲史, 富山 貴央, 森永 哲成, 小斎 侑希子, 井口 詔一, 吉屋 匠平, 武石 一樹, 戸島 剛男, 長尾 吉泰, 伊藤 心二, 原田 昇, 池上 徹, 森 正樹
2. 発表標題 肝癌微小環境における癌関連線維芽細胞由来エクソソームの意義
3. 学会等名 第120回日本外科学科定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 間野洋平
2. 発表標題 肝細胞癌における癌関連線維芽細胞の役割
3. 学会等名 第30回消化器癌発生学会
4. 発表年 2019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
---------	---------