

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23878

研究課題名(和文) 腫瘍由来細胞外小胞の臨床病理学的意義-光学顕微鏡下での可視化による検討

研究課題名(英文) Trial and study of visualization of tumor-derived extracellular vesicles with ISH

研究代表者

馬越 通信 (Michinibu, Umakoshi)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00557457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌細胞株から抽出した腫瘍由来細胞外小胞(TEVs)内に、qPCRで、比較的癌細胞特異的に発現するRNA(HER2, UCA1)が含まれていることを確認した。蛍光標識した胃癌細胞株をマウスにインプラント、摘出した標本を用いて、超高感度ISHおよび共焦点顕微鏡で癌巣周囲にTEVsと考えられるドット状構造を確認した。胃癌手術検体で、HER2に対する超高感度ISHを施行し、HER2 score3の検体でTEVsと考えられるドット状構造を確認した一方、score0-2の検体には、ほぼみられなかった。癌細胞特異的なRNAを標的にすれば、超高感度ISHでTEVsを光学顕微鏡で観察できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍由来細胞外小胞(TEVs)は様々な作用(腫瘍微小環境形成、転移促進、血管新生、腫瘍免疫抑制など)で、腫瘍促進性に働くことは徐々に明らかになってきているが、一方、TEVsは微小構造であり、通常の光学顕微鏡で観察することが難しく、臨床的に観察、応用することが困難とされている。今回、超高感度ISH法により、一般的なパラフィン切片上で、TEVsと考えられる構造を観察できる可能性が示せた。TEVsの観察がより簡便になることで、TEVsとそれぞれの予後との関連、TEVsを標的とした新規治療法の可能性など、臨床的応用の可能性がでてるものとする。

研究成果の概要(英文)：Tumor-derived extracellular vesicles (TEVs) extracted from gastric cancer cell lines were confirmed to contain RNAs (HER2, UCA1) that are expressed relatively specifically in cancer cells by qPCR. Fluorescently labeled gastric cancer cell lines were implanted in mice, and tumor specimens were harvested to confirm dot-like structures around cancer foci as possible TEVs by ultra-sensitive ISH and confocal microscopy. Ultra-sensitive ISH for HER2 was performed on gastric cancer surgical specimens, and dotted structures were identified as TEVs in HER2 score 3 specimens, while almost none were found in score 0-2 specimens. The results showed that TEVs could be observed by ultra-sensitive ISH using optical microscopy if cancer cell-specific RNAs are targeted.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：胃癌 腫瘍由来細胞外小胞 超高感度ISH法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞は多くの細胞が放出する、脂質二重膜構造で包まれた微小構造で、細胞間の情報伝達をはじめとした機能を有すると考えられている。癌領域において、癌細胞が放出された細胞外小胞、即ち、腫瘍由来細胞外小胞(tumor derived extracellular vesicles ; TEVs) は 1) がん微小環境、2) がん近接組織、3) 遠隔部位、においてそれぞれがん促進的な作用をすることが明らかになっている。癌治療において、TEVs の機能を明らかにすることは様々な癌の治療につながることを考えられる。しかし、TEVs は光学顕微鏡の観察限界をこえる微小な構造物であるため光学顕微鏡下での評価はなされておらず、病理標本を用いた臨床病理学的検討はいまだなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では TEVs 含有 mRNA に対する超高感度 *in situ hybridization* 法を用いて TEVs の光学顕微鏡下での可視化手法を確立する。さらに、この手法を用いて手術検体の病理組織標本(おもに胃癌)での TEVs の評価を行い、その臨床病理学的意義を検証する。

3. 研究の方法

本研究では TEVs 含有 mRNA に対する超高感度 *in situ hybridization* 法(RNA scope®)を用いて TEVs の光学顕微鏡下での可視化を試みるために、以下の実験を行った。

- (1) DiI 処理した胃癌細胞株(NCI N87, 44As3)を共焦点顕微鏡で TEVs を観察する。
- (2)胃癌細胞株の培養上清から超遠心法を用いて TEVs を回収し、TEVs 内に HER2 と UCA1 が含まれていることを確認する。
- (3)胃癌細胞株(NCI N87, 44As3)をマウスに implant し、1週間後に腫瘍部を摘出し、共焦点顕微鏡観察した所見と、超高感度 ISH 法を施行した所見を比較検討する。

・癌以外の、周囲組織の細胞外小胞と区別するために、比較的癌に特異的に発現すると考えられる、HER2 と UCA1 を標的 RNA として選択した。

・マウスの実験については、特異性を上げるためにマウス由来の HER2, UCA1 に反応しないカスタムプローブを使用した。

4. 研究成果

・ DiI 処理した培養細胞(NCI N87, 44As3)を用いて、共焦点顕微鏡で、培養細胞周辺の TEVs と考えられる微小構造を確認した。

・培養細胞(NCI N87, 44As3)の培養上清から超遠心法で TEVs を抽出し、qPCR 法にて、それぞれの TEVs 内に HER-2 と UCA1 が存在することを確認した(図 1)。

・マウスにインプラントした腫瘍(NCI N87, 44As3)に対して超高感度 ISH 法(HER-2)を施行したところ、癌巣の周囲に、TEVs と考えられるドット状陽性像を確認することができた(図 2、図 3)。ドット状陽性像はおもに線維芽細胞、組織球内に取り込まれているように見えた。

図1

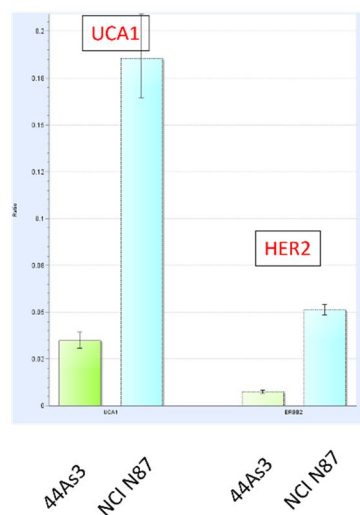


図2

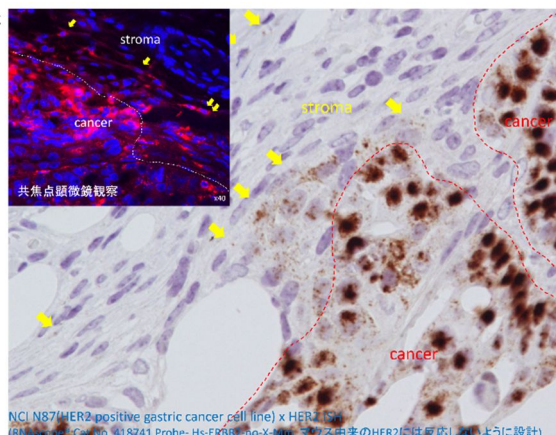
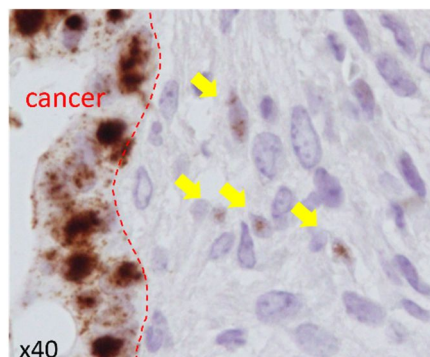
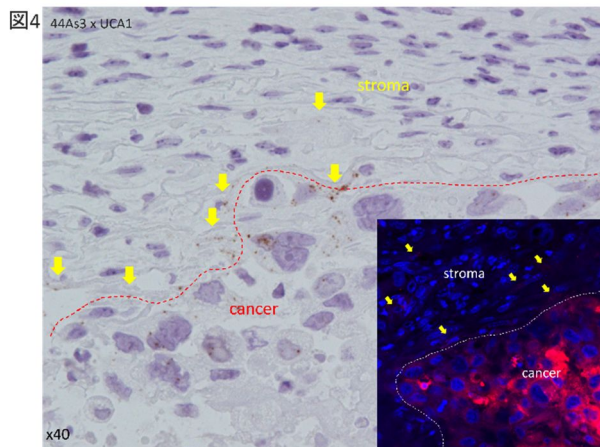


図3



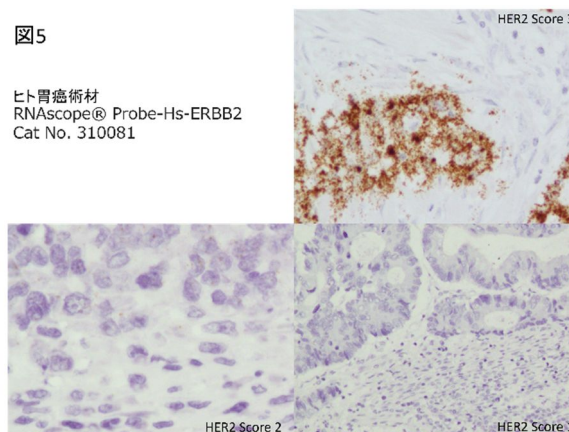
この所見は DiI で標識した癌細胞を implant 部周囲の間質細胞に癌細胞由来と考えられる red signal の取り込み像がみられた、共焦点顕微鏡の所見と合致し、TEVs を見ている可能性が示唆された。さらに、同じ標本を用いて、UCA1 のプローブでも、超高感度 ISH 法を施行したところ、HER-2 ほどではないものの、少量の、TEVs と推測される微小なドット状陽性像が確認できた (図 4)。



・胃癌手術検体で、HER2 ISH (RNA scope®) を施行したところ、HER2 score3 の検体には癌細胞内に多数のドット状陽性像を認めたとともに、癌胞巣周囲にも TEVs と考えられるドット状陽性像が確認された。score0-2 の検体にはほぼ確認されなかった (図 5)。臨床的に HER2 score3 の症例 (HER2 遺伝子の増幅を有する症例) で、超高感度 ISH で HER2 の RNA を多数認めたことは、理論上も合致することと考えられた。一方、HER2 score 0-2 の症例では、ほぼ、ドット状陽性像はみとめられず、HER2 score3 の症例でみられた、癌胞巣周囲の陽性像は TEVs を見ている可能性が考えられた。

図5

ヒト胃癌術材
RNAscope® Probe-Hs-ERBB2
Cat No. 310081



以上、非特異的反応をみている可能性を完全に否定できるものではないが、超高感度 ISH を用いて、癌細胞に特異的な RNA を標的にすれば、癌細胞由来の TEVs を手術材料で観察することができる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬越通信
2. 発表標題 超高感度 in situ hybridization法を用いた腫瘍由来細胞外小胞の可視化の試みと検討
3. 学会等名 111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------