

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06438

研究課題名(和文) 犬横紋筋肉腫細胞株エクソソームの特性変化を支配するインデューサー因子の探索

研究課題名(英文) Search for inducer factors governing changes in the properties of canine rhabdomyosarcoma cell line exosomes

研究代表者

佐藤 稲子 (Sato, Touko)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：70633478

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)：本研究では、犬横紋筋肉腫細胞株エクソソームの特性を調べ、その特性変化を支配する誘導因子を明らかにすることを目的とした。細胞を高密度で培養したところ、5-oxoprolin(5-OP)がエクソソーム中で有意に低値を示した。また、培地をpH 6.8にしたところ、pH 7.4に対し、エクソソーム中の5-OP濃度は低値となった。これは、細胞からエクソソームへの5-OPの放出が抑制されたことで細胞中の5-OPの恒常性が保たれた可能性が考えられた。腫瘍細胞では、細胞密度の偏りや、低pHといった腫瘍微少環境が存在する。これらのことから5-OPが横紋筋肉腫のバイオマーカーとな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

本研究では、犬横紋筋肉腫細胞株エクソソームの特性を調べ、その特性変化を支配する誘導因子を明らかにすることを目的とした。いくつかの培養条件のうち、高密度培養によってグルタチオン代謝に関わる化合物である5-oxoprolinが低密度培養条件と比較して、エクソソーム中で低値になることがわかった。細胞密度を高めると培養細胞の悪性度は、増強するといわれている。エクソソーム中の5-oxoprolin濃度を定量することにより、犬横紋筋肉腫のバイオマーカーや腫瘍の悪性度の把握に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The rarity of canine rhabdomyosarcoma makes diagnosis, clinical prognosis, and treatment difficult. In this study, we aimed to investigate the characteristics of canine rhabdomyosarcoma cell line exosomes and clarify the inducer that controls changes in their characteristics. When cells were cultured at high density, 5-oxoprolin (5-OP) levels were found to be significantly lower in exosomes. Furthermore, when the culture medium was adjusted to pH 6.8, the 5-OP concentration in exosomes was lower than that at pH 7.4. This was thought to be due to the possibility that the release of 5-OP from cells to exosomes was suppressed, thereby maintaining the homeostasis of 5-OP in cells. It is known that when tumor cells proliferate, a tumor microenvironment such as uneven cell density and low pH exists. Therefore, it was suggested that 5-OP may be a biomarker for rhabdomyosarcoma.

研究分野：生体分子化学

キーワード：エクソソーム 犬横紋筋肉腫 5-oxoprolin

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは様々な細胞から放出される直径 30-100 nm 程度の細胞外膜小胞であり、ほとんどの体液中に含まれている。腫瘍由来のエクソソームは肉腫を含む様々ながんにおける腫瘍形成、細胞間連絡、微小環境調節、および転移を媒介することが証明されており、近年、肉腫の診断、予後および治療の標的となりうる潜在的なバイオマーカーとして考えられている。犬腫瘍に関しても、メラノーマ、乳腺腫瘍、肝細胞癌のエクソソームの機能解析による新たな診断マーカーや転移因子の探索が進められつつあるものの、まだ限定的である。犬の横紋筋肉腫 (RMS) は、横紋筋細胞、横紋筋前駆細胞 (筋芽細胞) または横紋筋細胞に分化することができる原始間葉系細胞に由来する希少な腫瘍であり、咽頭、歯肉、尿道、膀胱、心筋、大網、喉頭、気管、前立腺および舌に発生する。中程度の転移能を有し局所的に侵襲的であり転移部位には肺、肝臓、脾臓、腎臓および副腎が含まれる。その組織病理学的特徴に基づいて犬の RMS は、胎児型、ブドウ状型、胞葉型および多形型に分類される。RMS の組織学的診断は通常困難で、診断のためには一般的に免疫組織化学的染色が必要となる。犬 RMS の新たな診断マーカーや転移因子の探索を行うためには、分泌されるエクソソームの特性を明らかにすることが非常に重要である。

2. 研究の目的

犬の横紋筋肉腫はその希少性ゆえに、診断、臨床予後および治療を困難にしている。本研究では、犬横紋筋肉腫細胞株エクソソームの特性を調べ、その特性変化を支配する誘導因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

進行性の排尿障害および血尿を呈し日本獣医生命科学大学の動物医療センターに来院した 14 歳・雄・雑種犬から採取された多形型横紋筋肉腫組織を培養し、canine rhabdomyosarcoma cell line (CMS-C) として樹立された培養細胞株を、全実験を通して使用した。

Dulbecco's Modified Eagle Medium を 10 g、NaHCO₃ 3.7 g、ペニシリン・ストレプトマイシン (10,000 units/mL ペニシリン G、10,000 μg/mL ストレプトマイシン硫酸塩を含む 0.85% 生理食塩水溶液) を超純水で溶解し、pH 7.4 に調整後 1 L になるまで超純水を加え、さらに Fatal Bovine Serum を 100 mL 添加した培地を CMS-C 培養に用いた。

培地中のエクソソームの回収は、デブリの除去のため、300 × g、10 min、2,000 × g、10 min、10,000 × g、30 min の順番で遠心分離後に上清を回収し、その上清について、100,000 × g、70 min 遠心し下層部 5 mm を残して上清を捨て、PBS を添加後、さらに 100,000 × g、70 min 遠心しペレットとして、エクソソームを回収した。CMS-C の培養を以下のような条件で実施し、分析を行った。

(1) 異なる培養密度での培養

高密度での細胞培養は転移性癌細胞の増殖・転移・浸潤能力を高めることから、異なる密度で培養することを試みた。150 mm シャーレ 1 枚当たり、低密度は 0.85×10^6 、高密度は低密度の 2 倍の 1.7×10^6 個播種し培養を行い、細胞とエクソソームを回収した。細胞、エクソソームともに、代謝産物を定量した結果について多変量解析を実施した。この解析結果に低密度培養と高密度培養で異なった代謝プロファイルを得たことから、さらに、解析を進めることとし、エクソソーム中の miRNA についても分析を実施した。

(2) 異なる培地 pH での培養

腫瘍組織内には、がん細胞の不均一性や低酸素、低栄養といった腫瘍微小環境が存在する。増殖が盛んながん細胞では、解糖系が亢進し、Lactic acid が増加し細胞外の pH が低下することが知られている。そこで、pH の影響を調べるために、培地を pH7.4 に対して pH6.8 の酸性と pH8.0 の塩基性に調製し、培養を行った。細胞とエクソソームについて代謝産物の分析を行った。

(3) ヒートショックを与えての培養

細胞には熱ストレスに対し、ヒートショックプロテイン (HSP) の発現を誘導するヒートショック (HS) 応答という調節メカニズムがある。HSP は様々ながんで過剰発現しており、発がん時の細胞応答や機能の制御に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、37 °C をコントロールとし、培養細胞に 44 °C で 20 分間ヒートショックを与えたのち、1 時間後および 3 時間後の細胞およびエクソソームについて代謝産物と miRNA について分析した。

4. 研究成果

(1) 異なる培養密度での培養

高密度培養において、エクソソーム中で低密度培養よりも有意に 5-oxoprolin (5-OP) と Cysteine glutathione disulfide が低値であった。これらはグルタチオン代謝経路に含まれている。グルタチオンは抗酸化作用を有し、細胞による酸化ストレスから細胞の恒常性を保護するアミノ酸化合物である。細胞密度の増加が培養細胞の悪性度を増強するといわれており、細胞を保護する役割を持つグルタチオンは悪性度の高い方で消費が大きいと考えられる。すなわち低密度培養よりも高密度培養の方がグルタチオンの消費が大きいと考えられ、実際に有意差こそ

なかったものの細胞中のグルタチオンは低密度培養に比べ高密度培養で低値を示した。前述の通り 5-OP および Cysteine glutathione disulfide はエクソソームでは高密度培養で有意に低値を示したが、一方の細胞では高密度培養で高い傾向にあった。5-OP および Cysteine glutathione disulfide はグルタチオンの前駆物質に当たるため、その濃度はグルタチオン生合成のための供給と消費のバランスによって定まり、グルタチオン生合成が盛んな高密度培養でその濃度は上昇すると考えられる。このことは、細胞中の代謝産物の恒常性を保つために、選択的にエクソソームに代謝産物が取り込まれている可能性を示唆している。すなわち、細胞はグルタチオン生合成のための前駆物質である 5-OP や Cysteine glutathione disulfide を細胞内に保持するため、エクソソームを介して前駆物質が細胞外に流出してしまわないよう、エクソソームへの取り込みが制御されていると考えられた。

miRNA の分析結果については、高密度培養で miR-19a、miR-30c が減少していた。これらの miRNA は Rap1 に関連している。Rap1 は、細胞の接着、移動、生存に関与し、がんの転移にも影響する。腫瘍の悪性度の評価として、エクソソーム中のこれらの miRNA を用いることが期待できる。

(2) 異なる培地 pH での培養

pH 7.4 と pH 6.8 で培養した細胞の代謝産物濃度を比較したところ、pH 6.8 で lactic acid は高濃度であったが、Ala は低濃度であった。これは、lactic acid と Ala の代謝経路で共通しない、pyruvic acid から酵素 ALT を介した Ala の合成経路が抑制された可能性などが考えられる。また、pH 6.8 では、pH 7.4 に対し、細胞中の 5-OP 濃度に差はなかった一方で、pH 6.8 でエクソソーム中の 5-OP 濃度は低値であった。これは、細胞からエクソソームへの 5-OP の放出が抑制されたことで細胞中の 5-OP の恒常性が保たれた可能性が考えられる。また、エクソソーム中の 5-OP 濃度は細胞よりも 10~20 倍程度高濃度であったことから、エクソソームではなんらかの 5-OP の濃縮機構が働いたことが示唆された。

(3) ヒートショックを与えての培養

ヒートショックを与えてから回収した細胞では、lactic acid と Ala の濃度上昇が 1 時間後に観察され、3 時間を経過すると有意な差は見られなかった。ヒートショックによるこれらの代謝産物の変化はミトコンドリアの機能不全が疑われるが、1 時間程度の短時間で変化し、3 時間程度の短期間で解消されることから、このミトコンドリアの機能不全は可逆的で一時的な現象と考えられる。エクソソームでは有意差のある代謝産物の変化は見られなかった。細胞で代謝変化が一時的なことから、エクソソームには影響を及ぼさなかった可能性がある。また、エクソソームの miRNA についても有意な差は観察されなかった。

まとめ

本研究では、密度、pH そして、ヒートショックの有無で細胞を培養し、そのエクソソームについて分析を行った。密度、pH については、エクソソームの特性が変化したことから、これらがエクソソームの特性変化を支配する誘導因子であることが明らかになった。エクソソーム中で変化した代謝産物および miRNA が確実な犬の横紋筋肉腫のバイオマーカーとなるのか、また、これらを正常な細胞に添加することで、腫瘍を惹起するのか検討していくことが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本 汐里1、佐藤 稲子1、片山 欣哉1（1 日獣大 生体分子化学）
2. 発表標題 イヌ横紋筋肉腫細胞の高密度培養条件およびフェロトーン誘導条件におけるグルタチオン代謝関連酵素遺伝子発現量の比較
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺師 宗嵩、佐藤 稲子、片山 欣哉、田村 好、宮本 汐里、栃木 裕貴、畠山 仁、皆上 大吾、田崎 弘之
2. 発表標題 異なる密度で培養されたイヌ横紋筋肉腫株から分泌されるエクソソーム中の代謝産物プロファイル
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 好、片山 欣哉、佐藤 稲子、寺師 宗嵩、宮本 汐里、栃木 裕貴、畠山 仁、皆上 大吾、田崎 弘之
2. 発表標題 異なる密度で培養されたイヌ横紋筋肉腫株から分泌されるエクソソーム中のmiRNAの発現変動
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本 汐里、佐藤 稲子、片山 欣哉、寺師 宗嵩、田村 好、田崎 弘之
2. 発表標題 高密度で培養したイヌ横紋筋肉腫株から分泌されるエクソソーム内の5-oxoproline の低下について
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度 京都大会
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
研究 分担者	片山 欣哉 (Katayama Kinya) (60344298)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	
研究 分担者	田崎 弘之 (Tazaki Hiroyuki) (80231405)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	

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
---------	---------