

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461989

研究課題名(和文)胃癌腹膜播種関連分泌型microRNAの同定と進展機構の解明

研究課題名(英文)Effect of microRNA on peritoneal dissemination in gastric cancer

研究代表者

市川 大輔 (ICHIKAWA, DAISUKE)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20347446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌細胞株由来のexosomeの添加によって、中皮細胞と各種胃癌細胞株との接着能の亢進を認めた。胃癌細胞株由来exosomeの添加の前後における中皮細胞中の分子変化についてのPCR-array解析を行い、exosome添加後に有意にFibronectin-1 (FN1)ならびにLaminin gamma-1 (LAMC1)の発現上昇を認めた。蛋白レベルでも同様にFN1ならびにLAMC1の発現亢進を認めた。高度進行胃癌の患者から得た悪性胸水から抽出したexosomeを用いた検討でも、同様に中皮細胞株におけるFN1ならびにLAMC1のmRNA・蛋白レベルでの発現上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：TEX were internalized in both mesothelial and gastric cancer cells in a cellular origin non-specific manner. Internalization of TEX into mesothelial cells promoted significant adhesion between mesothelial and gastric cancer cells, and TEX internalization into gastric cancer cells significantly promoted migratory ability, while internalization of mesothelial cell-derived exosomes did not. Expression of adhesion-related molecules, such as fibronectin 1 (FN1) and laminin gamma 1 (LAMC1), were increased in mesothelial cells after internalization of TEX from gastric cancer cell line and malignant pleural effusion. TEX may play a critical role in the development of peritoneal metastasis of gastric cancer, which may be partially due to inducing increased expression of adhesion molecules in mesothelial cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 腹膜播種 exosome

1. 研究開始当初の背景

exosome が細胞崩壊のみならず能動的分泌によって体液中に放出され、極めて安定した状態で存在することがわかってきた。これら exosome 内には蛋白や種々の核酸も内包されており、他の細胞に取り込まれることで細胞間の情報メディエーターとして機能することが報告され、癌の進展における新たなメカニズムとしても一躍注目を浴びてきた。これら細胞間の情報伝達の存在から、exosome も癌細胞の niche の構築・維持に関与している可能性が示唆されており、癌のリンパ節転移に関して、分泌型 microRNA による転移先リンパ節の状態調節 (コンディショニング) の可能性も報告されている。

一方で、癌の腹膜転移の詳細な転移メカニズムは不明であるが、漿膜面からの癌細胞の遊離に加え、癌細胞の腹膜への生着と増殖の過程が重要と考えられている。しかしながら、日常臨床において、漿膜面への癌の露出や腹腔内の遊離癌細胞の存在自体が、直ちに腹膜播種の存在を意味するものではなく、高度な腹膜播種症例を認める一方で、播種性再発を来たさない漿膜浸潤胃癌も多く存在する。

2. 研究の目的

以上のような背景から、『漿膜浸潤胃癌において、漿膜面からも microRNA 等の分子を含んだ exosome の放出・分泌が起こっており、癌細胞自体ならびに周囲支持組織との間に、転移形成に有利な細胞間情報伝達が行われている』との仮説を立てるに至った。今回、細胞株を用いた検討から、癌細胞由来 exosome による癌悪性度への影響について検討し、そのメカニズムや関連分子の同定も試みる。一方で、担癌患者の組織や体液を用いた検討で、実際の播種性再発との関連についても検討する。

3. 研究の方法

本研究は京都府立医科大学の倫理委員会の審査を受け、承認を得た後に行われた。

1) 胃癌細胞株と中皮細胞株を用いて、各々の細胞株由来の exosome を超遠心法で収集し、PKH67 でラベリングした後、各細胞株培養液への添加により、他の細胞株への exosome の取り込みの有無について検討した。

2) 胃癌細胞の腹膜への着床に注目したモデルとして、胃癌細胞株と中皮細胞株を用いた adhesion assay による解析を行った。予め培養した中皮細胞株 (Met-5A) に、蛍光標識した胃癌細胞株 (MKN-45、MKN-74、KATO) を上乗せし、その接着細胞数について検討した。また、各種細胞株の培養液中から細胞外 exosome を抽出し、それらを添加することで、これら接着能に変化が生じるか否かを検討した。

3) 胃癌細胞株を用いた Boyden chamber 法による migration assay ならびに invasion assay も施行し、各種胃癌細胞株や中皮細胞株由来 exosome の添加による、各 assay 結果への影響について検討した。

4) 胃癌細胞株由来の exosome 添加によって、一定の変化を認めた胃癌細胞株と中皮細胞株との adhesion assay について、MKN45 と MKN74 を用いて検討を行い、exosome 添加前後での中皮細胞内における分子変化について検討した。

5) 前述 4) で変化を認めた分子について、胃癌患者の悪性胸水より抽出した exosome の添加による胃癌細胞株への影響について検討し、一方で、実際の腹膜中皮細胞上における同分子の発現について解析し、腹膜播種の有無との相関を検討した。

4. 研究成果

1) 胃癌細胞株ならびに中皮細胞株由来の exosome が、exosome を抽出した元の細胞株自身や他の細胞株にも取り込まれることを確認した。

2) 胃癌細胞株由来 exosome の添加により、全ての細胞株 (MKN45、MKN74、KATO) において中皮細胞と各々の胃癌細胞株との接着能の亢進を認めた。また、これら各々の胃癌細胞株における接着能の亢進は、検討した全ての細胞株由来の exosome の添加によって認められた。

3) MKN45 細胞株を用いた Migration assay では、MKN45 ならびに MKN74 細胞株由来の exosome 添加による遊走能の亢進を認めたが、KATO 細胞株由来の exosome 添加ではそれら亢進を認めなかった。一方、Matrigel を用いた Invasion assay では、MKN45 ならびに KATO 細胞株由来の exosome 添加による浸潤能の亢進を認めたが、MKN74 細胞株由来の exosome 添加ではそれら亢進を認めなかった。

4) MKN45 ならびに MKN74 由来 exosome 添加前後での中皮細胞内での接着関連分子について PCR-array を用いて検討したところ、Fibronectin-1 (FN1) と Laminin gamma-1 (LAMC1) の発現上昇を認めた。これらの結果は、定量 PCR でも確認され、Western blotting を用いた蛋白レベルの解析でも同分子の exosome 添加後の発現亢進を認めた。一方、同 exosome 添加前後の中皮細胞内の microRNA 発現の網羅的解析では、各々の細胞株での microRNA 発現の変化は認めるものの、2つの細胞株で一定の発現変化を認める関連 microRNA の同定には至らなかった。

5) 胃癌患者の悪性胸水中より抽出した exosome 添加によって、同 exosome の中皮細胞株への取り込みを確認した。これら exosome の添加後の中皮細胞内の発現解析を行い、前述の FN1 ならびに LAMC1 について、mRNA レベルならびに蛋白レベルでの発現亢進も確認した。また、胃癌患者の腹膜を用いた解析で、肉眼的に播種を認めない腹膜上でも、腹膜播種陽性症例の腹膜上では、腹膜播種陰性症例に比較して有意に FN1 ならびに LAMC1 両分子の発現亢進を認めることも確認

した。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Arita T, Ichikawa D, Konishi H,
(他11名): Increase in peritoneal recurrence induced by intraoperative hemorrhage in gastrectomy. Ann Surg Oncol, 22;758-764(2015) 査読有 doi: 10.1245/s10434-014-4060-4.

Arita T, Ichikawa D, Konishi H,
(他11名): Tumor exosome-mediated promotion of adhesion to mesothelial cells in gastric cancer cells. Oncotarget, 7;56855-56863(2016) 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.10869.

[学会発表](計3件)

市川大輔、他: 胃癌治療における術中出血と予後との関連についての検討. 第115回日本外科学会定期学術集会 2015年4月 名古屋

市川大輔、他: 胃癌進展における細胞外遊離 exosome の関与の検討 - 腹膜播種転移を中心に -. 第26回日本消化器癌発生学会総会 2015年11月 米子

有田智洋、市川大輔、他: 術中出血や腹水 exosome・血球由来 ectosome が胃癌腹膜播種に与える影響について. 第71回日本消化器外科学会総会 2016年7月 徳島

有田智洋、市川大輔、他: 術中出血・腹水 exosome・血球中 ectosome が胃癌腹膜播種に与える影響に関する検討. 第27回日本消化器癌発生学会総会 2016年9月 鹿児島

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
特に無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

市川 大輔 (ICHIKAWA DAISUKE)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20347446