

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670602

研究課題名(和文)エクソソームを利用した癌早期診断法および新規核酸治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the early diagnostic method and the new nucleic acid treatment using exosome

研究代表者

玉井 皓己 (Tamai, Koki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60724250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：まずエクソソームの抽出方法の検討を行い、プロテオソーム解析やNano Tracking Analysisにおいて安定した結果を得ることができたため抽出試薬を用いることとした。薬剤耐性膵癌細胞株および培養上清エクソソームのマイクロアレイの結果をもとに薬剤耐性に関わる因子(特にmicroRNA)を同定し、その候補因子が抗癌剤治療耐性に抗アポトーシス作用を介して関わることを確認した。膵癌切除後に抗癌剤治療を受けた症例の血漿サンプルを用いてエクソソーム中のRNAを抽出し候補となるmicroRNAの測定を行ったところ、候補となるmicroRNAの高発現群で有意に無再発期間が短いという結果であった。

研究成果の概要(英文)：The stable isolation method of exosomes from human plasma was established in our laboratory as the first step. We employed the exosome isolation kit for the isolation because of the validated stable results. Based on the results of microarray assuming the expression in exosome from anti-cancer drug sensitive/resistant cancer cell lines, several miRNAs were picked up as the factor regarding the drug resistance. We validated the candidate miRNAs, and confirmed a certain miRNA was related with drug resistance via anti-apoptosis effect in vitro. The expression levels of exosomal candidate miRNA were significantly related to the patient's disease-free survival time, and the expression would be a hopeful biomarker in clinical course. Now, we are working on the investigation of the feasibility about the drug delivery system in vitro. The exosome containing the certain miRNA deliver the dramatic effect of anti-apoptosis into the recipient cells in preliminary study.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 エクソソーム microRNA

1. 研究開始当初の背景

膵癌は既存のマーカーの感度が不十分で早期発見が難しく、診断時には局所浸潤・遠隔転移を伴っていることや、組織学的悪性度の高さ、有効な抗癌剤が少ないことや抗癌剤耐性なども予後不良の原因となっており、早期診断法、新規治療薬の開発が期待されている。

細胞はタンパク質、mRNA、microRNA(miRNA)などを内包するエクソソームと呼ばれる膜小胞を分泌し標的細胞で作用させることにより細胞間の情報伝達を行っている。これらのコンポーネントは親細胞における発現プロファイルを反映することも知られている (Richard J Simpson, et al.: *Expert Rev. Proteomics* 2009)。腫瘍細胞から分泌されるエクソソームは、癌微小環境では癌間質細胞に作用し癌細胞の発育に有利な環境を構築することや、血液中を循環し遠隔臓器で作用し前転移ニッチの形成に関与している (Webber J et al.: *Cancer Res* 2010, Cristina G et al.: *Cancer Res* 2011)。本研究は、これらのエクソソームの性質を利用し(1)早期診断法、(2)新規治療法の開発を目指す。

(1)早期診断法に関して、近年末梢血 miRNA の有用性が注目されており、当教室でも肝臓癌、胆道癌においてその有用性を報告してきた。(Tomimaru Y, et al: *J Hepatol* 2011, Kishimoto T, et al: *Cancer Sci* 2013)(図 1)

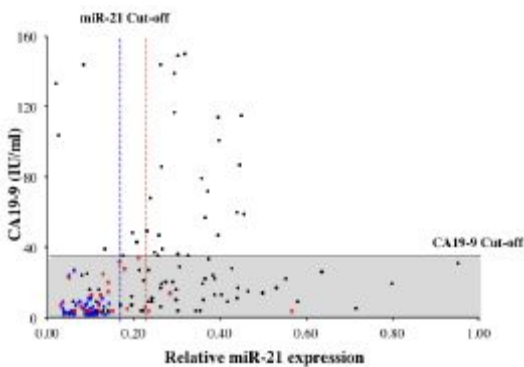


図 1:胆道癌における CA19-9 と miR-21 の比較.miR-21 ではより多くの患者を診断し得た。(黒:胆道癌, 赤:良性疾患, 青:健康人)

そこで、腫瘍由来エクソソームに内包される miRNA に着目した。

(2)新規治療法に関しては、これらの miRNA が治療ターゲットとなり得ると考えられるが、miRNA をターゲットとした拡散治療における有用な drug delivery system (DDS)は確立されておらず、エクソソームの利用に着目した。特定の miRNA を高発現させたものや、pre/anti-miR を導入したエクソソームを作成し DDS とて利用し治療に応用する。癌組織において耐性に関与する miRNA や癌/間質相互作用に関与する

miRNA をエクソソームで制御することができれば併用抗癌剤の効果を最大限に高められる可能性も高い。また、自身の細胞由来のエクソソームを DDS として利用することにより、安全性の高い新たな核酸治療薬を開発することが可能と考えている。

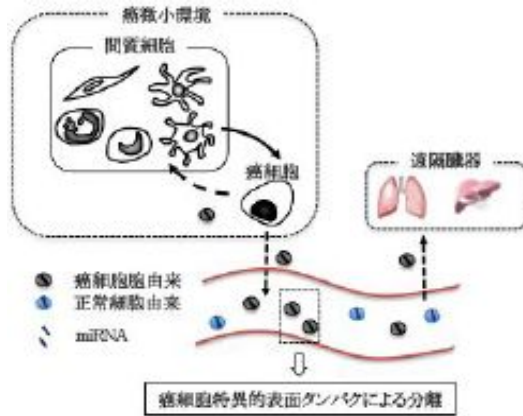


図 2: 癌由来エクソソームの役割

2. 研究の目的

本研究ではエクソソームによる細胞間相互作用のメカニズムの解明により、癌由来エクソソーム miRNA を利用した早期診断法、さらにはエクソソームを DDS とした新たな治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)臨床検体における腫瘍由来エクソソーム分離法の開発腫瘍由来エクソソームの分離にはソーティングを行うための表面マーカーの同定が不可欠である。これまで卵巣癌において EpCAM を使用した方法が報告されている。膵癌由来エクソソームを分離するために、各ステージの血液サンプルや膵癌細胞株培養上清からエクソソームを抽出し抗体アレイを用いて最適な表面マーカーを検索する。

(2)バイオマーカーmiRNA、治療ターゲット miRNA の網羅的解析 各ステージの癌患者腫瘍由来エクソソーム、癌部/癌間質部/非癌部組織、薬剤耐性膵癌細胞株/培養上清エクソソーム、癌細胞-間質細胞相互作用モデル(供培養系)培養上清エクソソーム、それぞれより抽出した miRNA を用いてマイクロアレイを行い(東レ 3D-Gene マイクロアレイ解析)miRNA 発現プロファイルを解析する。その中から腫瘍特異的、薬剤耐性に関連するものや癌細胞-間質細胞相互作用に関連する miRNA をピックアップする。大阪大学消化器外科では既に、切除前後・化学放射線治療前後における血液サンプル、治療抵抗症例/感受性症例切除サンプルをストックしている。細胞株に関しては

Gemcitabine 耐性株を樹立し (BxPC3, MiaPaCa2, PSN1 細胞), マイクロアレイによる解析を行い, 細胞導入実験により薬剤耐性に関わる特定の miRNA を同定している (Iwagami Y et al.: Br J Cancer 2013). また, 癌細胞-間質細胞相互作用モデルに関しても, 癌細胞より分泌されるエクソソームが間質細胞 (線維芽細胞) を活性化し癌細胞の悪性度を高めることを preliminary な結果ではあるが確認している. 網羅的解析によりピックアップされた miRNA について, これまでに蓄積された膨大なサンプルを用いて validation を行い, バイオマーカー・治療ターゲットとなる候補 miRNA の同定を行う.

(3) in vitro, in vivo におけるエクソソームを利用した drug delivery system の開発. 細胞内で目的の miRNA の発現を上昇させることで, その miRNA を高発現するエクソソームが分泌されることが明らかにされた (Kosaka N et al.: J Biol Chem 2011). また, 細胞に transfection するのと同様に, エクソソームに siRNA を導入することも明らかにされた (Wahlgren C et al.: Nucleic Acid Research 2012). これらの技術を応用し, エクソソーム内に目的の miRNA を高発現させることや, pre-miR および anti-miR を導入し, drug delivery のためのエクソソームを作成する. エクソソームは正常細胞 (fibroblast, ADSC (adipose-tissue driven stem cell) など) から抽出したものを使用する. エクソソーム内に高発現させた目的の miRNA の発現量は PCR 法により確認する. また導入した pre-miR および anti-miR についても, それらに相補的なプライマーを作成することで PCR 法で確認を行うことが可能である. 作成したエクソソームは PKH67 で蛍光標識し標的細胞に取り込まれることを確認する. また, エクソソームに transfect した pre-miR および anti-miR も同様に Alexa488 など蛍光標識が可能であるため, 標的細胞への取り込みを確認できる. 作成したエクソソームを標的細胞に作用させた後, proliferation assay により増殖能の変化, MTT assay により抗薬剤耐性の変化を確認する. また, 抗薬剤の投与, 抗薬剤との併用投与も行い, それらの効果の比較も行う.

次に in vivo での効果を検証する. 同様に蛍光標識したエクソソームを用いて, 体内動態, 臓器分布を観察する. NOD/SCID マウス皮下腫瘍モデルを作成し (1) 抗薬剤単独投与, (2) エクソソーム単独投与, (3) 抗薬剤/エクソソーム併用による治療効果の確認を行う.

#### 4. 研究成果

(1) エクソソーム分離法について. まずエクソソーム分離法についての検討を行った. エクソソーム分離法に関しては, 超遠心法や密度勾配法, 表面マーカーを用いた免疫沈降法, ポリマーを用いた抽出試薬の使用など様々

なもの存在する. これらを目的に応じて選択することが重要である. 抽出試薬の使用は簡便で精度が安定している一方で, コントaminーションの可能性が指摘されている. そのため血清を超遠心法と抽出試薬で回収したエクソソームをプロテオソーム解析や Nano Tracking Analysis にて検証したところ, 存在するたんぱく質の割合や粒子のサイズにおいては安定した結果を得ることができ, またエクソソーム中の RNA 抽出もバイオアナライザーの評価で安定した small RNA 分画を確認できた. そのため, 本研究においては抽出試薬を用いることとした.

(2) バイオマーカーとしての有用性について. 当初, 膵癌の各ステージにおけるバイオマーカーとしての有用性を見出す実験も予定していたが, 当科では薬剤耐性膵癌細胞株および培養上清エクソソームのマイクロアレイを既に行っており, 膵癌細胞株における薬剤耐性に関わる因子 (特に microRNA) が同定されている. また細胞実験においても候補となる microRNA が抗薬剤治療耐性に抗アポトーシス作用を介して関わること, また microRNA のエクソソームによる伝搬も確認できた. そこで臨床検体を用いて抗薬剤治療予測に関わるバイオマーカーの検索を行うこととした. 膵癌切除後に抗薬剤治療を受けた症例を抽出して, 血漿サンプルを用いてエクソソーム中の RNA を抽出し候補となる microRNA の測定を行ったところ, 候補となる microRNA の高発現群で有意に無再発期間が短いという結果であった. (図 3)

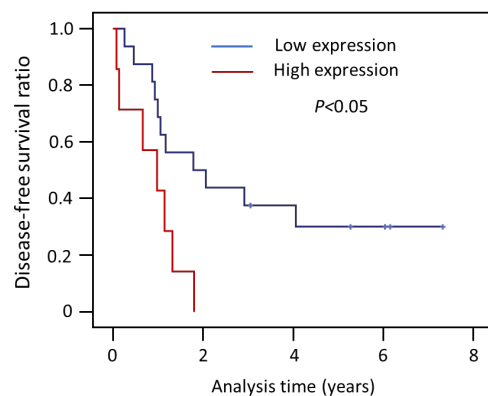


図 3: 血漿から抽出したエクソソーム中の候補 microRNA において, 高発現群で有意に無再発期間が短かった. (赤: 高発現, 青: 低発現)

(3) in vitro において, 薬剤耐性株のエクソソームが薬剤感受性株の薬剤抵抗性を高めること, また薬剤耐性に anti-miR を導入することで, その薬剤抵抗性を高める効果が減弱することを preliminary な段階ではあるが確認された. 今後は, より効率的な手法を模索して DDS への応用に発展させていく.

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)

研究者番号：

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 低酸素下における膵癌細胞由来エクソソームが癌細胞の悪性度に与える影響 梶原 淳  
第 114 回日本外科学会 2014 年 4 月 5 日 京都
2. 膵癌細胞株におけるエクソソームを介した薬剤耐性獲得機構の証明 三賀森 学 第 115 回日本外科学会 2015 年 4 月 18 日 名古屋
3. The role of pancreatic cancer-derived exosome in cancer microenvironment under hypoxic condition 三賀森 学 第 70 回日本消化器外科学会 2015 年 7 月 16 日 浜松

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉井 皓紀 (TAMAI, Koki)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：60724250

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )