

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21646

研究課題名(和文) スキルス胃癌微小環境に対するmiR-143の作用

研究課題名(英文) The function of cancer associated fibroblasts-derived exosomes on the energy metabolism of scirrhoust type gastric cancer

研究代表者

内藤 寛(Naito, Yutaka)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員

研究者番号：70738210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌関連線維芽細胞(CaF)由来のExosomeがスキルス胃癌細胞内部のエネルギー代謝に与える影響について検討した。しかし、当初の予想と反し、CaF由来のExosomeによる胃癌細胞のエネルギー代謝への影響は見られなかった。一方、高転移性のスキルス胃癌細胞株と線維芽細胞を共培養した際、両細胞内で嫌氣的グルコース代謝の関連遺伝子の発現が大きく変化していた。さらに、転移性スキルス胃癌細胞由来のExosomeが線維芽細胞内部の炎症性サイトカインの発現を制御することも明らかにした。以上から、癌細胞由来のExosomeが癌微小環境の変化および代謝変化に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we use co-culture system of fibroblasts with high-metastatic scirrhoust gastric cancer (SGC) cells or low-metastatic SGC cells as a model to understand how to create favorable microenvironments for cancer metastasis. By comparing transcriptome profiles of fibroblasts co-cultured with high- or low-metastatic SGC cells, it revealed that glucose metabolism in fibroblasts was reprogrammed by co-culture with high-metastatic SGC cells. We also found that high-metastatic DGC-derived extracellular vesicles (EVs) dominantly induced inflammatory cytokines through TGF- independent manner. Under co-culture condition also strongly induced the expressions of glycolysis-related genes and decreased the expression of oxidative phosphorylation-related genes in high-metastatic SGC cells. Thus, our finding suggests the cellular crosstalk between cancer cells and fibroblasts via EVs in SGC microenvironment.

研究分野：分子生物学

キーワード：Exosome microRNA スキルス胃癌 癌関連線維芽細胞 代謝

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)は、遺伝子発現制御を介して様々な生命現象に関与しており、胃癌をはじめ様々な癌における異常とその生物学的重要性が指摘されている。申請者はこれまで、胃癌発生、進展に関わる新たな分子基盤の解明を目的として、胃癌組織を用いた miRNA マイクロアレイにより、胃癌に関連する複数の miRNA を同定した (1,2)。さらに、詳細な機能解析の結果、癌細胞だけでなく、その周囲を取り巻く癌間質の線維芽細胞における miRNA の発現変化が胃癌の進展や予後、形態形成に強く関連していることを明らかにした (1, 3)。このような研究を通じ、胃癌細胞周囲間質の線維芽細胞における miRNA の機能を詳細に解析することが、胃癌微小環境中の癌細胞と間質細胞の相互作用メカニズムの解明や、これを標的とした胃癌の新規診断・治療法の確立につながるものと考えられた。

一方、癌細胞内のエネルギー代謝はミトコンドリア内で生じる酸化リン酸化ではなく、主に解糖系が有意となることが知られている。このような癌細胞内におけるメタボロームの変化は、増殖に必要な核酸、アミノ酸、脂質等の生合成や ROS の産生を制御し、腫瘍組織内部での低酸素・低栄養環境に適応することで、癌の進展に寄与することが知られている (4)。また、代謝産物そのものが癌細胞の増殖、浸潤に関わること、HIF1、NF- κ B 等の様々な癌関連遺伝子の発現によりメタボローム変化が誘導されることから、癌特異的な代謝機構の重要性が注目されている。しかしながら、このような癌細胞内のメタボロームの変化や、癌細胞の生物学的特性に与える影響等、癌特異的なメタボロームに関わる分子基盤の全貌は明らかになっていない。

Exosome は、エンドソームに由来する 40-100nm 程度の微小な膜小胞であるが、癌細胞や周囲間質細胞を含む様々な細胞から分泌されることが報告されている。さらに、これら Exosome に内包されている miRNA 等の分子が受け手となる細胞で機能することで、細胞間相互作用に関与することも報告されている (5)。

当研究室 (国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野)においても、間質細胞に由来する Exosome に内包される miRNA が癌の進展や生物学的特性に寄与することを明らかにしてきた (6-8)。このことから、癌周囲の線維芽細胞等の間質の細胞に由来する Exosome に内包された miRNA が癌細胞内に取り込まれ、癌細胞内のエネルギー代謝を制御している可能性が考えられる。しかし、癌間質が癌細胞内のエネルギー代謝に与える影響に焦点を当てた解析は少なく、Exosome と癌細胞のエネルギー代謝の関連については国内外を通して、これまで報告はない。

2. 研究の目的

本検討では、癌間質細胞由来の Exosome が癌細胞のエネルギー代謝に与える影響について網羅的、体系的に解析することで、胃癌の癌間質相互作用の新たなメカニズムの解明と、これを標的とした新規診断・治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

① 線維芽細胞由来の Exosome の回収 :

癌関連線維芽細胞 (CaF) および非癌部線維芽細胞 (NF) からそれぞれ超遠心法にて Exosome を回収後、Nano Particle Tracking (NTA) 解析による Exosome 粒子数のカウントや、Protein assay によるタンパク質量を検討した。既存の Exosome マーカーとして知られている CD9, 63 の発現をウエスタンブロットにより検討した。さらに、電子顕微鏡による Exosome の形態像の確認を行った。

② 各線維芽細胞由来の Exosome が癌細胞の乳酸産生量、グルコース代謝に与える影響 :

①で回収した線維芽細胞由来の Exosome をスキルス胃癌細胞株である HSC-44PE に処理し、Exosome を処理しないコントロール群と比較して、乳酸産生量、グルコース消費量を検討した。また、PKH-67 染色を行った線維芽細胞由来の Exosome を処理し、HSC-44PE に取り込まれるかどうか検討した。

③ スキルス胃癌細胞株と線維芽細胞の相互作用における代謝関連遺伝子の変化 :

癌細胞と線維芽細胞の共培養時における細胞内部の代謝変化の全体像を捉えるため、スキルス胃癌細胞株である HSC-44PE および HSC-44PE をベースとして単離された高転移株 44As3 と、NF の共培養系を構築し、マイクロアレイにて単独培養と共培養時の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。

4. 研究成果

① 線維芽細胞由来の Exosome の回収 : 超遠心法により、CaF、NF それぞれの培養上清から Exosome fraction を単離し、Nano Sight による Exosome 粒子数のカウントや Protein assay によるタンパク質量を検討した結果、実際にこれら線維芽細胞が Exosome を培養上清中に分泌していることがわかった。しかしながら、双方の分泌する Exosome の粒子数に大きな差は認められなかった (図 1)。続いて、ウエスタンブロットにより、各線維芽細胞由来の Exosome fraction から Exosome マーカーである CD9 および CD63 の発現が確認された (図 2)。さらに、電子顕微鏡による観察により、サンプル試料内における Exosome の存在を確認した (図 3)。

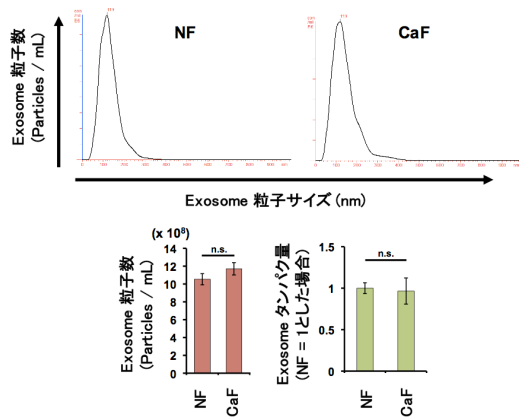


図 1. 線維芽細胞由来の Exosome の粒子サイズ、分泌量およびタンパク質量

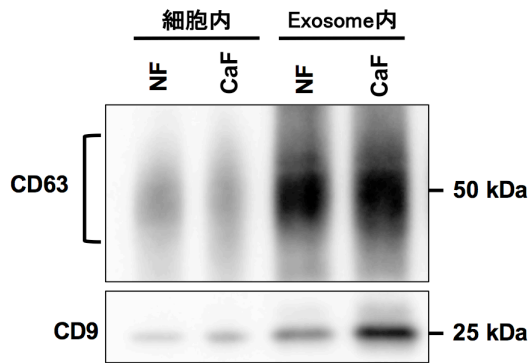


図 2. Exosome マーカーの発現

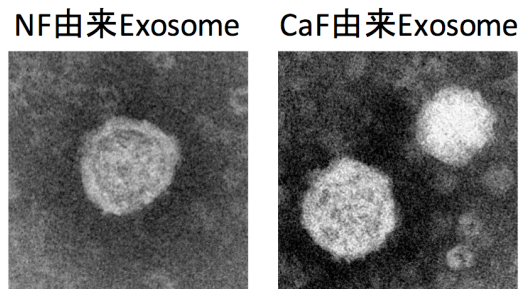


図 3. 線維芽細胞由来の Exosome の形態像

② 各線維芽細胞由来の Exosome が癌細胞の乳酸産生量、グルコース代謝に与える影響：
 まず、①で回収した線維芽細胞由来の Exosome が胃癌細胞株に取り込まれるかどうか検討するため、PKH-67 色素によりラベルした各線維芽細胞由来の Exosome をスキルス胃癌細胞株である HSC-44PE に処理し、顕微鏡による観察を行った。その結果、HSC-44PE 細胞上に PKH-67 の蛍光が認められ、胃癌細胞株への Exosome の取り込みが行われていることが示唆された(図 4)。そこで、各線維芽細胞由来の Exosome が胃癌細胞株のエネルギー代謝に与える影響について、Lactate assay および Glucose assay により、乳酸産生量、グルコース消費量を検討した。しかしながら、各線維芽細胞由来の Exosome 処理による胃癌細胞の乳酸産生量、グルコース消費量の変化が認められなかった (Data not shown)。

Exosome の処理時間、処理濃度などの原因も考えられるが、今回の実験系では線維芽細胞由来の Exosome による胃癌細胞のエネルギー代謝への影響は無いものと推測された。

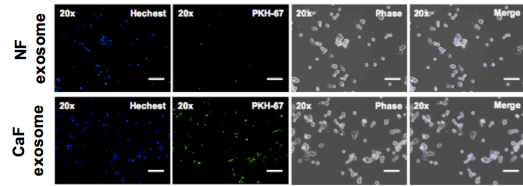


図 4. PKH-67 ラベルした Exosome の HSC-44PE 細胞株への取り込み

③ スキルス胃癌細胞株と線維芽細胞の相互作用における代謝関連遺伝子の変化：

上述した②の検討結果から、当初予定していた予想とは異なる結果が得られた。そのため、方針を転換し、胃癌細胞と線維芽細胞の相互作用によって双方の細胞内部の代謝変化が生じるかどうか全体像を明らかにするため、胃癌細胞株と線維芽細胞の共培養系を確立し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った(図 5)。その結果、より転移能の高いスキルス胃癌細胞株である 44As3 は、親株の HSC-44PE と比較して線維芽細胞内部の遺伝子発現プロファイルを大きく変えることがわかった(図 6)。さらに、転移株である 44As3 と線維芽細胞を共培養した場合のみ、両細胞内部のグルコースの嫌氣的代謝経路に関連する遺伝子群の発現が亢進し、一方で電子伝達系関連遺伝子の発現が低下していた(図 7, 8)。つまり、両者の共培養により、高転移性のスキルス胃癌細胞株内で、ワールブルグ効果が亢進し、さらに本来癌細胞の内部でしか生じていないはずのワールブルグ効果が、共培養後の線維芽細胞側に伝播していることを意味している。

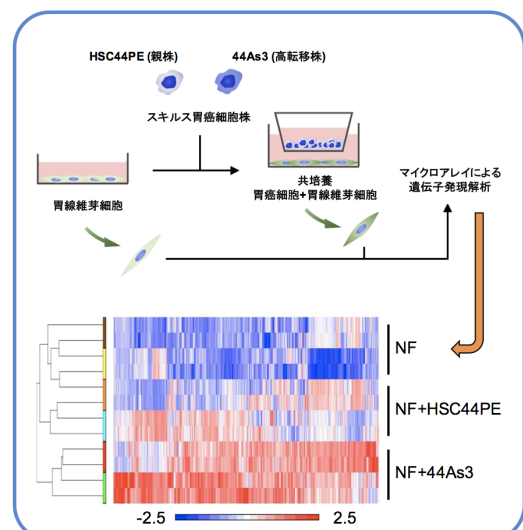


図 5. マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

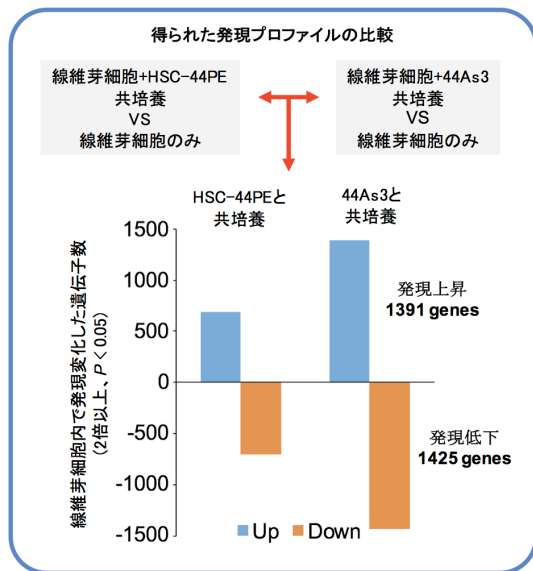
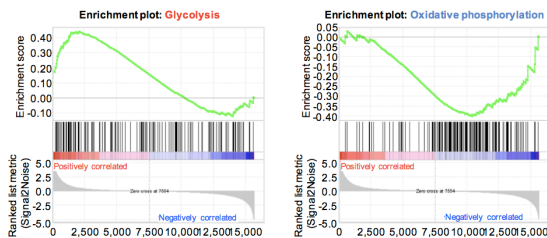


図 6. 共培養時に発現変化した遺伝子数の比較



グルコース代謝関連遺伝子群の発現が上昇し、酸化リン酸化に関わる遺伝子群の発現が低下している。

図 7. GSEA による解析: 共培養時における高転移株 44As3 細胞内の遺伝子変化

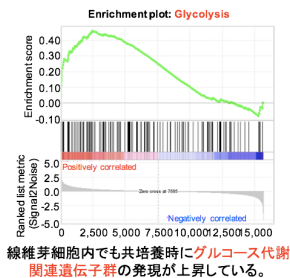
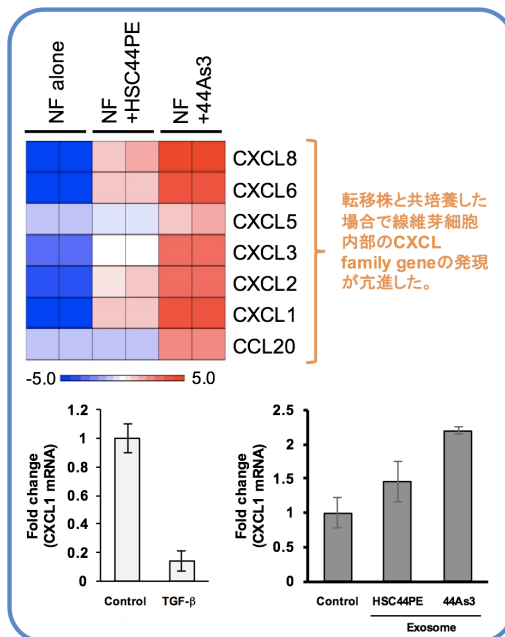


図 8. GSEA による解析: 共培養時における線維芽細胞内部の遺伝子変化

線維芽細胞内でも共培養時にグルコース代謝関連遺伝子群の発現が上昇している。

さらに、44As3 細胞株と共培養した場合において、線維芽細胞内部の炎症性サイトカイン (CXCL family gene) の発現を強く誘導していることが明らかとなった。スキルス胃癌組織では、増殖因子の TGF- β の活性型の発現量が極めて豊富に存在しており、申請者も過去に TGF- β がスキルス胃癌の病態に強く関連することを報告している (1)。そこで、共培養時に線維芽細胞内部で見られた一連の遺伝子発現変化が TGF- β によって変化しているかどうか検討した。その結果、少なくとも CXCL family gene をはじめとした炎症性サイトカインの発現については、TGF- β ではなく、高転移株 44As3 由来の Exosome により制御されていることが明らかとなった (図 9)。



転移株と共培養した場合で線維芽細胞内部の CXCL family gene の発現が亢進した。

図 9. 高転移性のスキルス胃癌細胞株由来の Exosome による炎症性サイトカイン遺伝子の発現誘導

このことから、共培養時における線維芽細胞内部の一部の遺伝子発現変化が、TGF- β などの既存の増殖因子などの影響とは独立して、胃癌細胞由来の Exosome によっても制御されることが示された。

今後の方針

申請者の当初の仮説を証明する結果は得られなかった。しかし、これまでに報告されていなかった、転移性の高いスキルス胃癌細胞株と線維芽細胞を共培養した際、両細胞内部で嫌氣的グルコース代謝が亢進していることを示唆する、興味深い結果が得られた。線維芽細胞内部の一部の遺伝子発現変化が、TGF- β などの既存の増殖因子などの影響とは独立して、胃癌細胞由来の Exosome により制御されていることから、癌細胞由来の Exosome が癌微小環境中の遺伝子発現変化、さらには代謝変化に重要な役割を果たす可能性も考えられる。今後、胃癌細胞内部の Exosome 分子に着目し、詳細な解析を行う予定である。

参考文献

1. Naito Y, Sakamoto N, Oue N, Yashiro M, Sentani K, Yanagihara K, Hirakawa K, Yasui W. MicroRNA-143 regulates collagen type III expression in stromal fibroblasts of scirrhous type gastric cancer. *Cancer Sci.*, 2014, 105: 228-235.
2. Sakamoto N, Naito Y, Oue N, Sentani K, Uraoka N, Zarni Oo H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W, MicroRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and

- indicates tumor invasiveness and poor prognosis., *Cancer Sci.*, 2014, 105: 236-43.
- 3) Naito Y, Yasuno K, Tagawa H, Sakamoto N, Oue N, Yashiro M, Sentani K, Goto K, Shinmei S, Oo HZ, Yanagihara K, Hirakawa K, Yasui W, MicroRNA-145 is a potential prognostic factor of scirrhous type gastric cancer. *Oncol Rep.*, 2014, 32: 1720-6.
 - 4) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011, 144(5):646-74.
 - 5) Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.*, 2007, 9(6):654-9.
 - 6) Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol. Chem.*, 2012, 287(2):1397-405.
 - 7) Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, Yoshida M, Tsuda H, Tamura K, Ochiya T. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal.*, 2014, 7(332): ra63.
 - 8) Tominaga N, Kosaka N, Ono M, Katsuda T, Yoshioka Y, Tamura K, Lötvall J, Nakagama H, Ochiya T. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun.*, 2015, 6:6716.

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6件)

- 1) Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol. Life Sci.*, 査読有, 2017, 74(4):697-713. doi: 10.1007/s00018-016-2346-3.
- 2) Nojima M, Matsui T, Tamori A, Kubo S, Shirabe K, Kimura K, Shimada M, Utsunomiya T, Kondo Y, Iio E, Naito Y, Ochiya T, Tanaka Y. Global, cancer-specific microRNA cluster hypomethylation was functionally

associated with the development of non-B non-C hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer*, 2016, 15(1):31. doi: 10.1186/s12943-016-0514-6.

- 3) Oo HZ, Sentani K, Mukai S, Hattori T, Shinmei S, Goto K, Sakamoto N, Naito Y, Anami K, Trang PT, Yanagihara K, Oue N, Yasui W. Fukutin, identified by the Escherichia coli ampicillin secretion trap (CAST) method, participates in tumor progression in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 査読有, 2016, 19(2):443-52. doi: 10.1007/s10120-015-0511-2.
- 4) Hibino Y, Sakamoto N, Naito Y, Goto K, Oo HZ, Sentani K, Hinoi T, Ohdan H, Oue N, Yasui W. Significance of miR-148a in Colorectal Neoplasia: Downregulation of miR-148a Contributes to the Carcinogenesis and Cell Invasion of Colorectal Cancer. *Pathobiology*, 査読有, 2015, 2(5):233-41. doi: 10.1159/000438826.
- 5) 内藤 寛, 吉岡 祐亮, 落谷 孝広, がんの新規診断・治療標的としてのエクソソームの応用と展開、癌と化学療法、査読有、2015、42: 647-655.
- 6) Naito Y, Oue N, Pham TT, Yamamoto M, Fujihara M, Ishida T, Mukai S, Sentani K, Sakamoto N, Hida E, Sasaki H, Yasui W. Characteristic miR-24 Expression in Gastric Cancers among Atomic Bomb Survivors. *Pathobiology*, 査読有, 2015, 82(2):68-75. doi: 10.1159/000398809.

[学会発表] (計8件)

- 1) 内藤 寛, 八代 正和, 清野 透, 平川 弘聖, 安井 弥, 勝田 毅, 落谷 孝広, スキルス胃癌微小環境における癌関連線維芽細胞由来細胞外小胞の機能解析、第75回日本癌学会, 2016, 横浜。
- 2) 内藤 寛, 吉岡 祐亮, 山本 雄介, 八代 正和, 清野 透, 平川 弘聖, 安井 弥, 落谷 孝広, スキルス胃癌癌関連線維芽細胞に由来する分泌型 microRNA の機能解析、第8回日本 RNAi 研究会・第3回日本細胞外小胞学会, 2016, 広島。
- 3) Naito Y, Ochiya T. Functional roles of CaF-derived extracellular vesicles in scirrhous type gastric cancer. Keystone symposia, Exosomes/Microvesicles: Novel Mechanisms of Cell-Cell Communication (E4), 2016, USA, Colorado, Keystone.
- 4) Naito Y, Yashiro M, Hirakawa K, Kiyono T, Yasui W, Ochiya T. Functional analysis of extracellular vesicles in scirrhous type gastric cancer microenvironment. ISEV 2016, The Fifth

- International Meeting of ISEV, 2016, The Netherlands, Rotterdam.
- 5) Naito Y, Functional role of microRNA in scirrhou type gastric cancer microenvironment. 4th international Postgradyate Conference on Pharmaceutical Science 2016, 2016, Tokyo University of Science, Chiba, Plenary Lecture.
- 6) 内藤 寛、八代 正和、平川 弘聖、安井 弥、落谷 孝広、スキルス胃癌微小環境における細胞外小胞の網羅的解析、第74回日本癌学会学術総会、2015、名古屋。
- 7) 内藤 寛、八代 正和、平川 弘聖、安井 弥、落谷 孝広、スキルス胃癌微小環境における分泌型 microRNA の機能解析、第7回日本 RNAi 研究会・第2回日本細胞外小胞学会、2015、広島。
- 8) Naito Y, Yashiro M, Hirakawa K, Yasui W, Ochiya T. Functional analysis of extracellular vesicles as a novel regulatory agent of scirrhou type gastric cancer microenvironment. International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) 2015, USA, Washington, D. C.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0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0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

内藤 寛 (YUTAKA, Naito)

国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・外来研究員（日本学術振興会

特別研究員 PD)

研究者番号：70738210

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()