

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04934

研究課題名(和文) 消化器癌の分泌型exosomeを介した新たな癌の進展機序の解明と実地臨床への応用

研究課題名(英文) The role of extracellular vesicles in development of metastasis of gastrointestinal cancer

研究代表者

大辻 英吾(Otsuji, Eigo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20244600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,100,000円

研究成果の概要(和文)：進行胃癌において、腹水中に胃癌が分泌するエクソソームと呼ばれる微小な小胞体は、腹膜細胞に取り込まれる事が明らかとなった。エクソソーム内にはマイクロRNAと呼ばれる短いRNAが内包されており、エクソソームを取り込んだ腹膜細胞を変化させて、ファイブロネクチン1やラミニンガンマ1といった接着分子の発現が亢進する事が明らかとなった。同様の現象は胃癌患者の悪性胸水から抽出したexosomeでも起こり、また、手術で摘出した腹膜でも同様の接着分子が発現亢進していた。

研究成果の概要(英文)：Tumor-derived exosome (TEX) were internalized in both mesothelial and gastric cancer cells in a cellular origin non-specific manner. 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. Immunohistochemistry demonstrated higher expression of FN1 and LAMC1 in the disseminated peritoneal membrane than in the benign peritoneal membrane.

研究分野：消化器外科学

キーワード：exosome 胃癌 腹膜播種 腹水 ファイブロネクチン-1 ラミニンガンマ-1

1. 研究開始当初の背景

細胞外 microRNA 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、exosome 等への封入や蛋白分子との結合体形成によって、極めて安定した状態で存在することが証明された (Valadi H. Nature Cell Biol:2007, Mitchell PS. Proc Natl Acad Sci USA:2008)。また、これら細胞外 microRNA が、exosome 等の microvesicles に封入されることで、容易に他の細胞に取り込まれることが判明し、細胞間の情報メディエーターとして機能することで、癌の進展に深く関わる可能性が示唆されている (Valadi H. Nature Cell Biol:2007, Skog J. Nature Cell Biol:2008, Kosaka N. Front Genet:2013)。これら細胞間の情報伝達の存在から、exosome 内の核酸や蛋白も他のサイトカインと同様に、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、癌の転移に関して、分泌型 microRNA による様々な転移促進機能の存在が示唆されている (Hood JL. Cancer Res:2011, Zhou H. Cancer Cell:2014)。

我々は、これまでに消化器癌患者において末梢血液中に放出された microRNA が極めて安定した状態で存在することを確認し、その診断的有用性や予後予測因子としての有用性を報告してきた (Tsujiura M, Br J Cancer:2010, Komatsu S, Br J Cancer:2011, Morimura R, Br J Cancer:2011, Konishi H, Br J Cancer;2012, Ichikawa D, Gastroenterology;2012, Kawaguchi T, Br J Cancer:2013, Hirajima S, Br J Cancer:2013, Komatsu S, Br J Cancer:2015)。また、癌細胞から放出された exosome が周囲の癌細胞や腹膜中皮細胞等にも取り込まれ、機能することも確認している。一方で、高度に進行した担癌状態における血球成分の異常は以前から知られており、癌の進展に伴う貧血の進行や血小板の減少等も実地臨床では頻りに経験されるが、これら血球成分における極めて多量の microRNA の含有や (Pritchard CC. Cancer Prev Res:2012)、赤血球における exosome 等 microvesicles の能動的分泌の存在も報告されている (Regev Rudzki N. Cell:2013)。既に我々は、これら血球由来 exosome の癌細胞への取り込みについても確認している。

これらの知見を基に、今回、『**消化器癌における分泌型 exosome を介した新たな癌の進展機序の解明と実地臨床への応用**』を目的として、様々な消化器癌細胞を用いて、癌細胞由来の exosome の周囲支持細胞への影響について解析し、癌細胞の悪性度形質の変化ならびにその分子機序についても検討する予定である。消化器癌におけるこれら癌細胞ならびに周囲正常組織由来の分泌型 exosome を介した統合的機能解析は、これまで全く行われていない新たな挑戦的研究であるが、長きに亘り不明であった癌の悪性化ならびに癌患者の悪液質に関する新たな機序の解明にも

繋がる可能性を有する。

2. 研究の目的

細胞外に分泌された exosome が、細胞間情報伝達のメディエーターとして、癌の進展に深く関わる可能性が報告されている。今回、『**消化器癌における分泌型 exosome を介した新たな癌の進展機序の解明と実地臨床への応用**』を目的として、癌細胞自体と周囲支持組織との細胞間における、各々の細胞由来 exosome を介した細胞間情報伝達について包括的な解析を行い、その分子機序の解明を目指す。同定された関連分子については、それらを用いた実地臨床での新たな治療戦略についての有用性も検討する予定である。

3. 研究の方法

以下の細胞株を用いた検討では、ウシ由来の exosome の影響を無くすため、exosome-depleted FBS を用いる予定である。また、本研究によって同定された消化器癌の進展に関与する候補 microRNA の解析については、京都府立医科大学附属病院において治療を受け、臨床サンプルの保存に関する包括合意を得た患者の血液、腹水 (洗浄腹水も含む) ならびに組織サンプルを用いる予定である。

胃癌細胞株 (KATO , MKN45, MKN74, GSU など) の培養液中の exosome を、超遠心プロトコール (100,000g, 70 分間 × 2) により分離し、CD9 ならびに 63 を用いた Western blotting assay による同分離の確認を行う。

PKH によるラベリングを行った後、正常中皮細胞株、血管内皮細胞株ならびに線維芽細胞株の培養液中への添加を行い、これら細胞内への exosome 顆粒の取りこみの有無を確認する。

胃癌細胞株の培養液中 exosome の添加を用いた、各種機能解析を行う。具体的には、正常中皮細胞を用いた接着アッセイを行い、同 exosome 添加による癌細胞の中皮細胞に対する接着能への影響について解析を行う。また、オートクリン様作用の有無について、Boyden chamber assay 法による癌細胞の遊走・浸潤能や、MTT アッセイによる細胞増殖能に対する同 exosome 添加の影響も検討する。

同様に、胃癌細胞株培養液中 exosome の添加による血管内皮細胞や線維芽細胞の形態変化ならびに遊走能への同 exosome 添加の影響についての検討を行う。

上記で何らかの形質の変化を認めた細胞については、exosome 添加の前後における細胞内分子の変化について microarray 解析を行う。一方で、添加する exosome ならびに exosome 添加前後の microRNA のプロファイリングの変化について、microRNA microarray 解析を行い、recipient 細胞における形態学的・機能的な変化に関連した microRNA ならびに関連分子の候補の選定を行う。

4. 研究成果

(1) exosome の抽出、各細胞株への取り込みの確認

胃癌細胞株(MKN45、MKN74、katoIII)並びに正常中皮細胞(MeT-5A)をExoFBS(exosome-free FBS)にて培養し、培養上清に各細胞株より分泌された exosome を0.22 μ m フィルターに通したのちに超遠心法(100,000g、70分、2回)で抽出した。exosome より蛋白を抽出し、exosome 表面抗原マーカーである CD9、CD63 を用いて western blotting 法を行い、exosome の抽出を確認した。

さらにこの exosome を PKH67 でラベリングし、胃癌細胞株や中皮細胞、血管内皮細胞(HUVEC)に添加培養し、蛍光免疫染色法にて各種細胞株に取り込まれていることを確認した。

(2) 胃癌細胞、中皮細胞に対する exosome 取り込みによる癌悪性度への影響の検討

胃癌細胞由来 exosome を取り込んだ中皮細胞を用いて接着アッセイを施行したところ、胃癌細胞由来 exosome は中皮細胞と胃癌細胞の接着能を促進させた。また、同様に胃癌細胞由来 exosome を取り込んだ胃癌細胞株は浸潤能、遊走能が亢進した。一方で正常中皮細胞由来の exosome を取り込ませても癌悪性度に影響は与えなかった。

(3) exosome による癌悪性度獲得に関与する分子の同定

胃癌細胞由来 exosome を取り込ませた中皮細胞から RNA を抽出し、細胞接着関連 PCR アレイを行ったところ、exosome は fibronectin 1 (FN1)ならびに laminin gamma 1 (LAMC1) の発現を亢進させた。これらの分子をターゲットとして real time RT-PCR で再検し、mRNA レベルでの発現亢進を確認した。また、抽出した蛋白で Western blotting を行い、同因子が蛋白レベルでも発現亢進していることを確認した。

一方、胃癌細胞株(MKN45 および MKN74)由来 exosome を取り込んだ腹膜細胞(MeT-5A)の microRNA について、microarray 解析を行ったが、その変化する分子について二種類の胃癌細胞株間でかなり乖離が大きく、特定の microRNA と接着関連分子との関係を見いだすことは出来なかった。

同様に胃癌細胞株に胃癌細胞由来 exosome を取り込ませ、転移浸潤関連 PCR アレイを行ったが、胃癌細胞株の種類によって発現の変化に共通性が見られず、特定の分子を候補とすることは困難であった。

(4) 悪性胸水中 exosome の中皮細胞に対する影響

胃癌終末期患者の悪性胸水をサンプルとし、超遠心法により exosome の抽出を行った。Exosome を PKH67 でラベリングし、蛍光免疫染色法にて正常中皮細胞や胃癌細胞株への取り込みを確認した。

さらに悪性胸水由来 exosome を取り込んだ

正常中皮細胞は、Western blotting にて FN1、LAMC1 蛋白の発現が亢進し、vitro 実験と同様の結果を臨床検体由来 exosome でも得られた。

(5) 臨床検体を用いた播種陽性腹膜における FN1 LAMC1 発現の確認

手術時に切除する腹膜を対象に、播種結節陽性の腹膜と、陰性の腹膜をサンプルとして FN1 と LAMC1 の免疫染色を行った。播種結節のある腹膜は、播種陰性の腹膜と比較して FN1 と LAMC1 の発現が亢進している事が確認された。

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1件)

Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Otsuji E et al. Tumor exosome-mediated promotion of adhesion to mesothelial cells in gastric cancer cells. *Oncotarget*. 2016 Aug30;7(35):56855-56863. doi:10.18632/oncotarget.10869

査読有

[学会発表](計5件)

2017年10月14日

日本消化器関連学会週間(福岡)

「血液中、腹水中の細胞外小胞体の消化器腹膜播種に対する機能解明と新たな治療への試み」

2017年7月20日

日本消化器外科学会(金沢)

「The role of extracellular vesicles in malignant ascites and blood in development of peritoneal metastasis of gastric cancer」

2017年5月18日

International society of extracellular vesicles (カナダ・トロント)

「Tumor exosome-mediated promotion of adhesion to mesothelial cells in gastric cancer」

2016年9月15日

第27回日本消化器癌発生学会(鹿児島)

「Exogenous Factors in Development of Peritoneal Metastasis of Gastric Cancer」

2016年7月14日

第71回日本消化器外科学会(徳島)

「Exogenous Factors in Development of Peritoneal Metastasis of Gastric Cancer」

〔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

大辻 英吾 (Eigo Otsuji)
京都府立医科大学・消化器外科・教授
研究者番号：20244600

(2) 研究分担者

市川 大輔 (Daisuke Ichikawa)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：20347446

塩崎 敦 (Atsushi Shiozaki)
京都府立医科大学・消化器外科・講師
研究者番号：40568086

小松 周平 (Shuhei Komatsu)
京都府立医科大学・消化器外科・特任講師
研究者番号：40578978

小西 博貴 (Hirotaka Konishi)
京都府立医科大学・消化器外科・助教
研究者番号：00448739

有田 智洋 (Tomohiro Arita)
京都府立医科大学・消化器外科・助教
研究者番号：00756794

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()