

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09347

研究課題名(和文) エクソソーム分泌機構に着目した肝がん薬剤耐性機構の解明および克服

研究課題名(英文) The mechanism of exosome-mediated drug resistance in hepatoma cells

研究代表者

松田 康伸 (Yasunobu, MATSUDA)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40334669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞から分泌される不溶性の微小粒子エクソソーム(20-100 nm)は、細胞-細胞間の新しい情報伝達ツールである。本研究では、肝がんのエクソソーム分泌機構を詳細に解析し、抗がん剤に対する薬剤耐性との関与を調べた。ヒト培養肝がん細胞を抗がん剤で処理した結果、エクソソーム分泌量が3.2-4.5倍に増加した。このエクソソームをがん細胞に添加すると、抗がん剤に対する薬剤耐性を獲得した。エクソソーム内部を解析した結果、細胞生存に重要な働きをするセリンスレオニンキナーゼmTORの活性化型が多く含まれていることを見いだした。以上より、エクソソームは肝がんの薬剤耐性に深く関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝がんは、抗がん剤に耐性を有する悪性疾患である。本研究では、細胞から分泌される微小粒子の一種であるエクソソームに着目し、薬剤耐性との関連性を検討した。研究の結果、肝がんにおいては、細胞生存に重要なキナーゼ蛋白を多く含むエクソソームを分泌することによって抗がん剤に対する耐性を獲得していることが明らかになった。本研究により、エクソソームに着目したがん治療の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been regarded that cells secrete exosome (nano-sized vesicles (20-100 nm)), which participate in various types of cell-cell communication. In this study, we examined the mechanism of exosome secretion in hepatoma cells, and found that exosome exerts drug resistance to anticancer drugs. Our obtained results showed that anticancer drugs (cisplatin and 5-fluorouracil) stimulate the secretion of exosome in human hepatoma cells. When cells were incubated with anticancer drug-treated cells-derived exosome, they acquired strong resistance to anticancer drugs. We found that activated type of mTOR, a serine-threonine kinase which plays a pivotal role in the cell survival, was significantly increased in exosome. Collectively, exosome exerts drug resistance through mTOR signaling in hepatoma cells.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝がん エクソソーム 薬剤耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、アポトーシスを起こした細胞が周囲の生き残った細胞に増殖を促す”代償性増殖”という現象を起こす可能性が注目されている。最近申請者は、肝がんにおける代償性増殖を観察するうちに、20-200 nm サイズの粒子が、強力な代償性増殖の作用を担っていることを初めてみいだした。細胞は、サイトカインやホルモンなどの液性因子だけではなく、非不溶性の粒子も分泌することが現在では明らかにされており、特に“エクソソーム”と呼ばれる200nm以下の微小粒子は、細胞間の情報伝達を担う、新しい形の生体ツールとして注目されている。そこで本研究では、エクソソームと肝がんの代償性増殖の関係をさらに追及することにより、エクソソーム分泌機序に着目したがん治療の可能性について検討を行った

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝がんの膜小胞(エクソソーム)分泌機構・臨床的意義の解明を行い、奏功性の高いがん治療法開発を構築することである。最近、申請者は“抗がん剤シスプラチンで処理した後の肝がんのエクソソームは 分泌量が著増し、他の細胞に対して細胞増殖/薬剤耐性を促進し、内部のセリン・スレオニンキナーゼ mTOR が著明にリン酸化している”という知見を得た。本課題の目的は、予備検討をもとに、(1)肝がんのエクソソームの分泌量・成分が変化する理由を明らかにし、(2)エクソソームを指標にして薬剤耐性を克服できる化学併用療法を探ることである。

### 3. 研究の方法

肝がんのエクソソーム分泌量が抗がん剤で増加する原因を明らかにするため、様々な細胞内シグナル分子を阻害した状態で抗がん剤を添加し、エクソソーム量・活性を測定した。エクソソーム内の mTOR 経路が抗がん剤で活性化(リン酸化)される理由を明らかにするため、mTOR 上流シグナル分子(ATM, Akt etc.) 阻害剤・siRNA 導入細胞のエクソソームを解析した。具体的に以下の実験を行った。

実験 肝がんのエクソソーム分泌機構の解析:

i) 最初に“エクソソーム分泌増加の引き金は何か?”という疑問を追及した。肝がん細胞株 HepG2, PLC/PRF/5 に対して、シグナル阻害剤(炎症 = IL-1/IL-6/COX2 阻害剤; 酸化ストレス = 抗酸化剤; 細胞死 = TNF- $\alpha$ /カスパーゼ阻害剤; DNA 修復 = ATM/ATR 阻害剤)存在下でシスプラチン・5-FU を添加して、エクソソーム分泌量を、タンパク定量・表面マーカー(CD63, 81) ELISA・Western blotting で解析した。

ii) 次に、上記実験でエクソソーム量に影響を与えた阻害剤の関連分子を数種選び、それらの特異的 siRNA 導入細胞のエクソソーム量・活性を解析した。解析方法には、表面マーカー(CD63, 81) の ELISA・Western blotting による解析を用いた。

実験 エクソソーム内部の mTOR 活性化機構の解明:

ATM/Akt や実験 で判明したシグナル分子の阻害剤・siRNA 導入細胞のエクソソーム mTOR を Western blot で解析した。また mTOR 阻害剤・siRNA 導入細胞のエクソソームを単離し、肝がんの薬剤耐性への影響を検討した。

### 4. 研究成果

実験の結果、シスプラチン処理後の肝がん細胞からは、強い増殖能をもつエクソソームが分泌されることを見いだした。興味深いことに、同エクソソームを培養肝がん細胞に添加すると、シスプラチンや5-FUの殺細胞効果が24-38%阻害された。エクソソームによる薬剤耐性は予備実験における動物モデルでも検証された。ヒト肝がんを皮下移植したマウスにシスプラチン投与すると、コントロ

ール群の腫瘍縮小率は50-65%だが、シスプラチン処理肝がんのエクソソーム投与群は、縮小率12-20% (p<0.05)と著減した。この理由を探るため、エクソソームの分泌量・成分を解析した結果、肝がんのエクソソームが抗がん剤処理後に3.2-4.5倍に分泌が増加した。さらに60種以上のリン酸化タンパクをWestern blot解析した結果では、シスプラチン処理細胞のエクソソーム内部は、リン酸化型のセリン・スレオニンキナーゼmTOR・下流分子p70S6Kが6-8倍に増加していた。mTORやp70S6Kは生存に中心的役割を果たす分子であり、エクソソームによる薬剤耐性の原因のひとつである可能性は高い。この仮説を実証する目的で、低用量mTOR阻害剤(ラパマイシン)とシスプラチンを併用して肝がん投与した結果、両薬剤を各々単独で投与した場合に比べて、4-7倍に細胞死の増加が認められた。以上より、肝がんは、活性化mTORシグナルを内包するエクソソームを分泌することにより、抗がん剤に対する薬剤耐性を獲得する可能性が示唆された。今後は、エクソソーム内部タンパクを網羅的に解析することにより、さらに多くの薬剤耐性に関与するエクソソーム内部タンパクの探索が必要と考える。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 1 件)

1) 松田康伸、寺井崇二. 肝癌薬剤耐性におけるエクソソームの有用性および課題. Medical Science Digest 43(7):12-15 (2017)

(学会発表)(計 1 件)

1) 大澤まみ、松田康伸、窪田正幸、若井俊文. uPA/FGF-2 経路は肝がん細胞におけるソラフェニブ耐性因子である. 第76回日本癌学会総会 (2017, 09)

(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:

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:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:若井 俊文

ローマ字氏名:(WAKAI, Toshifumi)

所属研究機関名:新潟大学

部局名:医歯学系

職名:教授

研究者番号(8桁):50372470

研究分担者氏名:永橋 昌幸

ローマ字氏名:(NAGAHASHI, Masayuki)

所属研究機関名:新潟大学

部局名:医歯学総合病院

職名:研究准教授

研究者番号(8桁):30743918

研究分担者氏名:小林 隆

ローマ字氏名:(KOBAYASHI, Takashi)

所属研究機関名:新潟大学

部局名:医歯学総合病院

職名:講師

研究者番号(8桁):40464010

研究分担者氏名:山際 訓

ローマ字氏名:(YAMAGIWA, Satoshi)

所属研究機関名:新潟大学

部局名:医歯学総合研究科

職名:特任教授

研究者番号(8桁):10419327

### (2)研究協力者 なし

ては、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。