

令和元年6月13日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09361

研究課題名(和文)肝細胞癌におけるGal-9のエクソソームを標的とした治療戦略のための基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study on treatment of hepatocellular carcinoma targetted of Gal-9 exosomes

研究代表者

正木 勉 (Masaki, Tsutomu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30335848

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)：我々が、見出した新しい生理活性物質ガレクチン-9 (Gal-9)が、肝細胞癌、胆管細胞癌に対して、抗腫瘍効果があることを示し、その機構としてGal-9が腫瘍細胞内・組織内のmicroRNAを変化させることにより、抗癌作用を有することを証明してきた。本研究の目的は、Gal-9の肝細胞癌の抗腫瘍効果が、腫瘍内のmicroRNAだけではなく、癌細胞からの放出されたエクソソーム(細胞外分泌小胞)内のmicroRNAにも変化を及ぼし、そのmicroRNA分子もまた、抗腫瘍活性を持つ可能性について検討し、Gal-9が、新たな癌抑制機構のエクソソームを標的とした治療戦略に成り得る可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

50～1000nmのエクソソーム(細胞外分泌小胞器官)内には、タンパク質、DNA,mRNA,microRNAなどが内包されている。こうした情報伝達物質は、細胞の起源によって異なるものの、100～300種類の以上のタンパク質、100種類以上のmicroRNAが内包されている。それ故に、エクソソームは情報源を細胞から細胞へ伝搬するデリバリーカーゴ(cargo)となりうる。今回の研究において、Gal-9がエクソソーム内にあるmicroRNA-34によって、抗腫瘍効果をもたらすことが明らかにされ、近い将来において、Gal-9がエクソソームを標的とした新薬剤となり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：Proteins,DNAs,mRNAs,microRNAs,etc.are contained in the 50 to 1000 nm exosome (extracellular secretory vesicle organ). Therefore,exosomes can be a delivery cargo that transmits information sources from cell to cell.We examined the effect on microRNA in exosomes of Gal-9 Small RNA in culture solution of Gal-9 non-added,added Gal-9 sensitive cells(Li-7,HLE,HLF)and resistant cells(HuH-7,HepG2,Hep3B)Total RNA was extracted.By the addition of Gal-9,miR-34 can be detected as a Gal-9 sensitive cell(Li-7,HLE,HLF)by comprehensive analysis of the exosomal microRNA using a microRNA oligo chip.MiR-34 was increased in serum exosomes as liver progressive disease.Furthermore, miR-34 showed migratory effects when it was transfected with miR-34,and further,it was confirmed that cyclin D1 induced from the G1 phase to the S phase of the cell cycle was attenuated.From this, it was found that Gal-9 increases miR-34 in exosomes and is involved in the suppression of cell proliferation.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝細胞癌 Gal-9

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

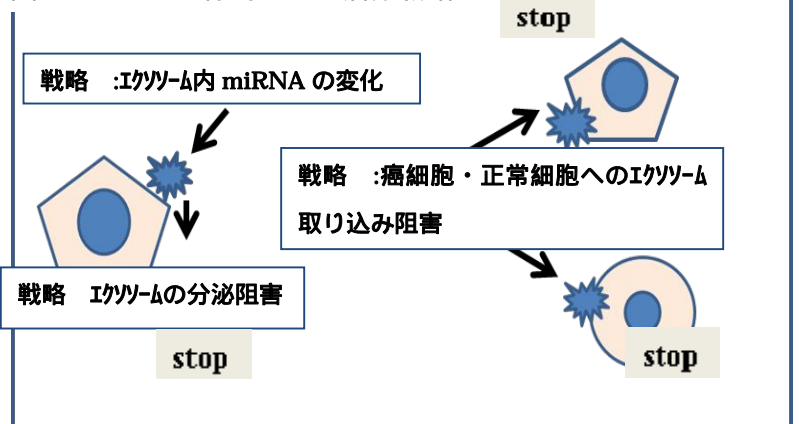
## 1. 研究開始当初の背景

昨今、生活習慣病を背景とした非ウイルス性の肝細胞がんの比率が増え、進行癌で、発見される場合が少なく、その治療法は、困難を極めている。よって新しい視点に立った、進行肝がんの治療法開発は急務である。我々が 1998 年に、生理活性物質として Gal-9 を世界に先駆け同定し、Gal-9 と病態との関連性に関して、T 細胞のみならず自然免疫担当細胞であるマクロファージや樹状細胞の活性化を通して癌免疫の亢進を誘導することを明らかにしてきた。また、我々は癌の進展や治療に関して、Gal-9 は、T 細胞性免疫機構以外の自然免疫を介して働くという新しい考え方を提供することも出来た。最近、我々は、Gal-9 が、肝細胞癌、胆管細胞癌に対して、抗腫瘍効果があることを証明し、さらに、Gal-9 が癌細胞内・癌組織内の miRNA の変化させることにより、癌抑制効果が見られることを見出した。また、癌を含む様々な病態で miRNA は関与していることも報告してきた。

50 ~ 1000nm のエクソソーム(細胞外分泌小胞器官)内には、タンパク質、DNA、mRNA、miRNA などが内包されている。こうした情報伝達物質は、細胞の起源によって異なるものの、100 ~ 300 種類の以上のタンパク質、100 種類以上の miRNA が内包されている。それ故に、エクソソームは情報源を細胞から細胞へ伝搬するデリバリーカーゴ(cargo)となりうる。

miRNA がエクソソーム中に存在し、それが細胞間で伝搬し、癌をはじめとするさまざま病態を引き起こす可能性が示唆されたのは、最近であり、現在エクソソームをターゲットとした治療薬は存在しない。エクソソームをターゲットとした治療戦略は、**図 1**のように、癌細胞内のエクソソーム内の miRNA の動態変化 癌細胞からのエクソソームの分泌を阻害 エクソソームの正常細胞・癌細胞への取り込み阻害である。我々が世界に先駆け見出した生理活性物質での Gal-9 が、癌治療において、エクソソームをターゲットとした - の検討した報告はない。よって、様々な生理活性を持つ Gal-9 が、- のいずれかの機能を有するならば、これまで、我々が報告した Gal-9 の癌抑制機構の新たな機構を解明し、エクソソームを標的とした新薬剤となり得ると考える。

図 1 エクソソームを標的とした治療戦略



## 2. 研究の目的

我々が、見出した新しい生理活性物質 Gal-9 が、肝細胞癌、胆管細胞癌に対して、抗腫瘍効果があることを示し、その機構として Gal-9 が腫瘍細胞内・組織内の miRNA を変化させることにより、抗癌作用を有することを証明してきた。本研究の目的は、Gal-9 の肝細胞癌の抗腫瘍効果が、腫瘍内の miRNA だけではなく、癌細胞からの放出されたエクソソーム(細胞外分泌小胞)内の miRNA にも変化を及ぼし、その miRNA 分子もまた、抗腫瘍活性を持つ可能性について検討をする。さらに Gal-9 が、新たな癌抑制機構のエクソソームを標的とした治療戦略に成り得る可能性についての基礎研究を行うことである。

## 3. 研究の方法

- (1) Gal-9 の非添加、添加の Gal-9 感受性細胞(Li-7, HLE, HLF)と耐性細胞(HuH-7, HepG2, Hep3B)における培養溶液中のエクソソームの単離及び small RNA を含む total RNA の抽出
- (2) Gal-9 の非添加、添加の Gal-9 感受性細胞(Li-7, HLE, HLF)と耐性細胞(HuH-7, HepG2, Hep3B)における 2555 分子の miRNA オリゴチップ(東レ, Human miRNA Oligo 4 arrays ver. 21)を用いた、エクソソーム内 miRNA の網羅的解析とクラスター解析
- (3). 1 と 2 の解析から Gal-9 の投与により変化するエクソソーム内 miRNA の中で、腫瘍抑制効果に関連する miRNA を同定し、そのターゲット遺伝子の同定および、新規のターゲット遺伝子の予測と実験的検証
- (4). Gal-9 感受性細胞(Li-7, HLE, HLF)のエクソソーム同一の癌細胞、同種の正常細胞へのエクソソームの細胞内の取り込みにおける Gal-9 の影響

- (5). Gal-9 感受性細胞(Li-7, HLE, HLF)と耐性細胞(HuH-7, HepG2, Hep3B)Gal-9 でのエクソソームの分泌量、Gal-9 のエクソソームへの結合の比較実験
- (6). 種々の肝病態(慢性肝炎、肝硬変、肝癌)に分け、血清中のエクソソーム miRNA の量を測定し、得られた情報を患者の臨床症状や病態との相互関係を検討。

(平成28年度の計画)

- (1). 肝癌細胞株における Gal-9 の非添加、添加の培養溶液中のエクソソームの単離およびエクソソーム内の miRNA 抽出
- .Gal-9 無添加の細胞培養液中のエクソソームの単離
  - 肝癌細胞株における Gal-9 の非添加、添加の培養溶液中の miRNA 的解析
  - エクソソーム発現プロファイルの解析

(平成29年度の計画)

- (1). Gal-9 による癌細胞増殖抑制効果に関与するエクソソーム miRNA の同定、そのターゲット遺伝子の予測と実験的検証実験
- Gal-9 の投与により、肝癌細胞株のエクソソーム内に特異的に発現増強、減弱する miRNA のターゲット遺伝子予測
  - エクソソームの細胞外の放出
  - 細胞内への取り込み実験

(平成30年度の計画)

- 平成28年、29年で遂行できなかった実験を行う。
- 慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌患者における血清中のエクソソームの miRNA の網羅的解析を行い、臨床パラメータとの関連性を検討。各々の病態のサンプル数は、治療前の20症例を行い、各病態におけるバイオマーカーの絞り込みを行う。

#### 4. 研究成果

Gal-9 の非添加、添加の Gal-9 感受性細胞(Li-7, HLE, HLF)と耐性細胞(HuH-7, HepG2, Hep3B)における培養溶液中のエクソソームの単離及び small RNA を含む total RNA の抽出した。Gal-9 の添加により、により、miRNA オリゴチップ(東レ, Human miRNA Oligo 4 arrays ver.21)を用いた、エクソソーム内 miRNA の網羅的解析により、miR-34 が、Gal-9 感受性細胞(Li-7, HLE, HLF)において、増加していた。miR-34 は、肝病態の進行に伴い、血清中のエクソソーム内において増量していた。さらに、miR-34 に、miR-34 を遺伝子導入すると細胞増殖抑制作用を示し、さらに、細胞周期の G1 期から S 期に誘導する Cyclin D1 の減弱が認められた。このことから、Gal-9 は、エクソソーム内の miR-34 を増加させ、細胞増殖の抑制に関与していることが判明した。

また、肝癌細胞株 Huh-7 の培養液から単離したエクソソームを蛍光色素 PKH26(赤)で標識し、24 時間後、培養中の正常肝細胞(hNHeps), Huh-7 に添加し、蛍光顕微鏡で観察し、どちらの細胞に取り込みやすいのか検討した。正常細胞にも癌細胞にも取り込まれ癌の悪性化癌の増殖に関連があると考えられる。これらのことから、癌細胞から放出されたエクソソーム内に癌細胞の進展、増殖効果が認められることが判明した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Human microRNAs preferentially target genes with intermediate levels of expression and its formation by mammalian evolution. Iwama H, Kato K, Imachi H, Murao K, Masaki T. PLoS One. 2018 May 24;13(5):e0198142. doi: 10.1371/journal.pone.0198142. eCollection 2018.

MicroRNAs as possible biomarkers for hepatocellular carcinoma. Morishita A, Masaki T. Hepatol Res. 2018 Jun;48(7):499-501. doi: 10.1111/hepr.13078. No abstract available.

Serum miRNAs Predicting Sustained HBs Antigen Reduction 48 Weeks after Pegylated Interferon Therapy in HBe Antigen-Negative Patients. Fujita K, Mimura S, Iwama H, Nakahara M, Oura K, Tadokoro T, Nomura T, Tani J, Yoneyama H, Morishita A, Oryu M, Himoto

T, Nishitsuji H, Shimotohno K, Omata M, Masaki T. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 2; 19(7). pii: E1940. doi: 10.3390/ijms19071940.

Fibrosis Staging Using Direct Serum Biomarkers is Influenced by Hepatitis Activity Grading in Hepatitis C Virus Infection. Fujita K, Kuroda N, Morishita A, Oura K, Tadokoro T, Nomura T, Yoneyama H, Arai T, Himoto T, Watanabe S, Masaki T. *J Clin Med*. 2018 Sep 11; 7(9). pii: E267. doi: 10.3390/jcm7090267.

MicroRNA profile of hepatic epithelioid hemangioid endothelioma: A case report. Morishita A, Iwama H, Yoneyama H, Sakamoto T, Fujita K, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Fujihara S, Nishiyama N, Kobara H, Mori H, Yamamoto N, Okano K, Suzuki Y, Ibuki E, Haba R, Himoto T, Masaki T. *Oncol Lett*. 2017 Mar; 13(3):1655-1659. doi: 10.3892/ol.2017.5643. Epub 2017 Jan 25.

Therapeutic potential of the antidiabetic drug metformin in small bowel adenocarcinoma. Chiyo T, Kato K, Iwama H, Fujihara S, Fujita K, Tadokoro T, Ohura K, Samukawa E, Yamana Y, Kobayashi N, Matsunaga T, Nishiyama N, Ayaki M, Yachida T, Morishita A, Kobara H, Mori H, Masaki T. *Int J Oncol*. 2017 Jun; 50(6):2145-2153. doi:10.3892/ijo.2017.3971. Epub 2017 Apr 20.

Effects of galectin-9 on apoptosis, cell cycle and autophagy in human esophageal adenocarcinoma cells. Akashi E, Fujihara S, Morishita A, Tadokoro T, Chiyo T, Fujikawa K, Kobara H, Mori H, Iwama H, Okano K, Suzuki Y, Niki T, Hirashima M, Masaki T. *Oncol Rep*. 2017 Jul; 38(1):506-514. doi:10.3892/or.2017.5689. Epub 2017 Jun 1.

Galectin-9 ameliorates fulminant liver injury. Tadokoro T, Morishita A, Sakamoto T, Fujihara S, Fujita K, Mimura S, Oura K, Nomura T, Tani J, Yoneyama H, Iwama H, Himoto T, Niki T, Hirashima M, Masaki T. *Mol Med Rep*. 2017 Jul; 16(1):36-42. doi: 10.3892/mmr.2017.6606. Epub 2017 May 18.

Galectin-9: An anticancer molecule for gallbladder carcinoma. Tadokoro T, Morishita A, Fujihara S, Iwama H, Niki T, Fujita K, Akashi E, Mimura S, Oura K, Sakamoto T, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Himoto T, Hirashima M, Masaki T. *Int J Oncol*. 2016 Mar; 48(3):1165-74. doi:10.3892/ijo.2016.3347. Epub 2016 Jan 19.

Galectin-9 suppresses the proliferation of gastric cancer cells in vitro. Takano J, Morishita A, Fujihara S, Iwama H, Kokado F, Fujikawa K, Fujita K, Chiyo T, Tadokoro T, Sakamoto T, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Kobara H, Mori H, Niki T, Hirashima M, Masaki T. *Oncol Rep*. 2016 Feb; 35(2):851-60. doi: 10.3892/or.2015.4452. Epub 2015 Nov 26.

〔学会発表〕(計 11 件)

慢性肝疾患における血清ガレクチン9濃度の診断的意義の検討

藤田浩二、樋本尚志、正木 勉 第104回日本消化器病学会総会 2018年

フェニブ抵抗性肝細胞癌に対する新規治療薬としてのマイクロRNAの有効性

森下朝洋、谷 丈二、正木 勉 第22回日本肝臓学会大会 2018年

miR-762はDAA治療経過中のゲノタイプ1型HCV排除に際して血清中に増加する

米山弘人、森下朝洋、藤田浩二、野村貴子、坂本鉄平、田所智子、大浦杏子、谷 丈二、出口章広、樋本尚志、三村志麻、正木 勉 第22回日本肝臓学会大会 2018年

C型肝炎起因性肝細胞癌におけるバイオマーカーとしての血清miR-125a-5pの有用性  
大浦杏子、田所智子、藤田浩二、三村志麻、坂本鉄平、野村貴子、森下朝洋、米山弘人、正木 勉 第22回日本肝臓学会大会 2018年

食道腺癌におけるガレクチン9の増殖抑制効果の検討

明石瑛美子、藤原新太郎、森下朝洋、田所智子、千代大翔、正木 勉 第60回日本消化器病学会大会 2018年

膵臓癌に対する術前化学放射線療法におけるmicroRNAの網羅的解析を用いた治療効果判定の検討

加藤清仁、鎌田英紀、波間大輔、山名浩喜、辻真一郎、山下拓磨、小林聖幸、藤森崇行、正木 勉 第60回日本消化器病学会大会 2018年

炎症性腸疾患の診断、鑑別における血清microRNAのバイオマーカーとしての同定

谷内田達夫、藤森絢子、小林伸也、千代大翔、西山典子、小原英幹、森 宏仁、岩間久和、

舩形 尚、正木 勉 第 110 回日本消化器病学会四国支部例会・第 121 回日本消化器内視鏡学会四国支部例会 2018 年

Serum Concentration of Galectin-9 Correlates to Liver Fibrosis.

Fujita K, Morishita A, Yoneyama H, Niki T, Nishimoto N, Himoto T, Masaki T

APASL STC 2017 2017 年

Galectin-9 による食道扁平上皮癌のアポトーシスの誘導と作用機序

千代大翔、藤原新太郎、森下朝洋、藤田浩二、山名佳美、大浦杏子、寒川英里、田所智子、小林伸也、松永多恵、西山典子、綾木麻紀、谷内田達夫、小原英幹、森 宏仁、正木 勉  
第 103 回日本消化器病学会総会 2017 年

Nonalcoholic Steatohepatitis(NASH)進展および発癌抑制に対する Galectin-9 の有効性と機序についての検討

森下朝洋、田所智子、正木 勉 第 53 回日本肝臓学会総会 2017 年

Serum galectin-9 levels are correlated to liver fibrosis regardless of chronic inflammation or hepatocellular carcinoma

Fujita K, Niki T, Himoto T, Masaki T AASLD2017 2017 年

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：谷 丈二

ローマ字氏名：Tani Joji

所属研究機関名：香川大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：00596075

研究分担者氏名：小原 英幹

ローマ字氏名：Kobara Hideki

所属研究機関名：香川大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：10612476

研究分担者氏名：岩間 久和

ローマ字氏名：Iwama Hisakazu

所属研究機関名：香川大学

部局名：総合生命科学研究センター

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20398035

研究分担者氏名：森 宏仁

ローマ字氏名：Mori Hirohito

所属研究機関名：香川大学

部局名：医学部  
職名：客員教授  
研究者番号（8桁）：20568844

研究分担者氏名：藤田 浩二  
ローマ字氏名：Fujita Koji  
所属研究機関名：香川大学  
部局名：医学部  
職名：病院助教  
研究者番号（8桁）：50749421

研究分担者氏名：森下 朝洋  
ローマ字氏名：Morishita Asahiro  
所属研究機関名：香川大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：60423430

研究分担者氏名：野村 貴子  
ローマ字氏名：Nomura Takako  
所属研究機関名：香川大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：70645415

研究分担者氏名：米山 弘人  
ローマ字氏名：Yoneyama Hirohito  
所属研究機関名：香川大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：80294750

## (2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、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。