

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09401

研究課題名(和文) 肝癌幹細胞のエキソソーム分泌を介した微小環境調節の新規機序の解明と治療応用

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of tumor microenvironment modulation through exosomes in hepatocellular cancer stem cells

研究代表者

小暮 高之 (Kogure, Takayuki)

東北医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：70400330

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)：癌幹細胞とその微小環境は化学療法耐性の主因と想定され、有望な治療標的である。本研究は、肝癌幹細胞の分泌するエキソソームを介した微小環境の調節機構を解析し、介在する機能性RNAを同定してこのRNA分子の阻害剤の抗腫瘍効果を明らかにすることを目的として遂行した。3次元構造を有する低接着培養ディッシュと幹細胞用培地を用いて複数のヒト肝癌細胞株を培養することにより、肝癌幹細胞(スフェロイド状の細胞集塊)を長期に維持することが可能であった。培養上清を用いて、肝癌幹細胞の分泌するエキソソームを回収し、内包するRNAの抽出およびその解析が可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来法は発現する表面抗原を利用してセルソーターで肝癌組織や肝癌細胞株から肝癌幹細胞を分離して解析に用いていたが、腫瘍微小環境における肝癌幹細胞の研究には一定の期間にその性質を維持した幹細胞を生存させて維持する必要があるため、解析が困難であった。3次元構造を有する低接着培養ディッシュと幹細胞用培地を用いた培養は肝癌幹細胞を長期かつ大量に維持できるため、エキソソームおよび内包するRNAの解析が可能である。ドライバー変異が低頻度である肝細胞癌の抗がん剤治療においては遺伝子異常を標的とした治療開発が困難であるため、腫瘍微小環境の解明は抗がん剤に耐性を示す肝細胞癌治療の改善への足掛かりとなり得る。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells and their microenvironment are a promising therapeutic target for chemotherapy as it is considered to be the main cause of the resistance to cancer chemotherapy. This study aimed to analyze the mechanisms of modulation of the microenvironment mediated by exosomes secreted from hepatocellular carcinoma stem cells and to identify the expression and function of non-coding RNAs involved. A non-adherent culture dish with a three-dimensional structure and stem cell culture medium enabled long-term maintenance of hepatocellular carcinoma stem cells (spheroid-like cell clusters) for more than four weeks. The exosomes secreted by cancer stem cells isolated from the supernatant contained identical non-coding RNAs with snoRNA U43 and 18S ribosomal RNA.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 癌幹細胞 エキソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 【肝細胞癌】

原発性肝癌の本邦での死亡者数は年間 3 万人をこえる。肝癌発症は 50-60 代から急増し、社会的かつ経済的損失が大きい。早期のステージで肝切除などの根治治療を行っても、非常に高い再発率のため多くの患者は進行癌となり、5 年、10 年生存率は 34.8%, 15.3%と非常に低い。肝癌は従来の抗がん剤に耐性をしめす。分子標的薬ソラフェニブは唯一予後を改善するが、予後延長はわずか 3 ヶ月にとどまる。

### (2) 【進行肝癌の治療抵抗性と癌幹細胞】

従来、均一な集団と考えられていた癌組織は、正常組織に類似し、癌幹細胞を頂点とする不均一な細胞集団であることが明らかとなった(図 1 左)。癌幹細胞は非対称分裂により増殖能の高い癌細胞を生み出す一方で、間質細胞に囲まれた微小環境(ニッチ)で緩徐に自己複製を行い、抗がん剤や放射線に著しい耐性をしめす。我々は、肝癌細胞において epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) を発現する細胞群に癌幹細胞が存在することを明らかにした(文献、 )。EpCAM は CD44, CD133 とともに肝癌幹細胞のマーカーとしてコンセンサスを得るに至っている。

### (3) 【癌幹細胞の微小環境(ニッチ)】

癌幹細胞は微小環境(ニッチ)でその形質を維持する。癌幹細胞のみを除去しても、分化した癌細胞が形質転換して癌幹細胞となるため、癌組織の根絶には癌幹細胞とニッチを一体として認識する必要がある(図 1 右)。癌幹細胞がニッチを制御する機構は有望な治療標的である。

### (4) 【肝癌微小環境におけるエクソソームを介した機能性 RNA の輸送】

microRNA などの機能性 RNA の発現異常は、様々な疾患の原因として報告されている。我々は、肝癌の分泌するエクソソームが機能性 RNA を内包して他の細胞へ輸送し、輸送先の細胞で標的遺伝子の発現を調節することを明らかにした。一方、間葉系幹細胞もエクソソームを分泌し、オートクラインによる形質の維持や他の細胞とのクロストークが存在する。癌幹細胞の微小環境においても同様の機構が存在する可能性は高い。我々は、肝癌幹細胞の分泌するエクソソームが癌幹細胞のニッチ(微小環境)の維持に重要な役割を担うであろうとの考えに至った(図 2)。

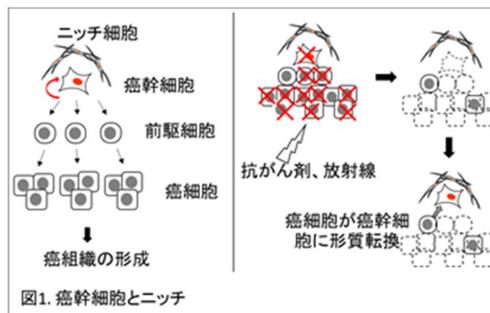


図1. 癌幹細胞とニッチ

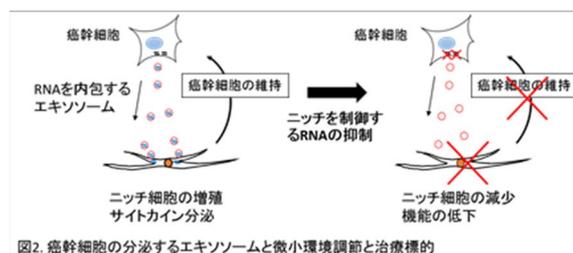


図2. 癌幹細胞の分泌するエクソソームと微小環境調節と治療標的

## 2. 研究の目的

化学療法耐性の主因である癌幹細胞とその微小環境は有望な治療標的である。我々はこれまでに、肝癌の癌幹細胞が EpCAM 陽性分画に存在することを証明し、さらに、肝癌細胞がエクソソームを用いて機能性 RNA を輸送することによりその微小環境を調節することを明らかにした。本研究では、肝癌幹細胞のエクソソームを介した微小環境の調節機構を解明し、介在する機能性 RNA を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝癌幹細胞の培養とエクソソームの抽出

ヒト肝癌細胞株においてセルソーターを用いて表面抗原 EpCAM を発現する細胞を選別し、肝癌幹細胞を分離した。低接着性培養皿と幹細胞培養用特殊培地を用いて肝癌幹細胞の長期培養を行った。ナノ粒子アナライザーを用いて培養上清中のエクソソームの発現を検討した。

(2) 種々の低接着性培養器と特殊培地を用いてセルソーターを用いずに肝癌幹細胞の濃縮と長期培養を試みた。低接着性培養皿、特殊表面加工低接着性マイクロプレート、3次元構造を有する低接着培養ディッシュを用いて肝癌細胞株を長期培養し、その形態を観察した。エクソソーム抽出キット(ExoQuick)を用いて培養上清からエクソソームを回収し、RNA 抽出を行った。

## 4. 研究成果

### (1) EpCAM を用いた肝癌幹細胞の分離と長期培養

癌幹細胞の分離法は確立されつつあるが、癌幹細胞の分泌する液性因子の報告は非常に少ない。分離した癌幹細胞を未分化状態のまま長期培養できないことが解析を困難にしている。乳癌幹細胞(Hinohara K. PNAS 2012)で報告されたスフェロイド培養による培養法(幹細胞用培地を用いて特殊コートされたディッシュ上に培養する方法)に改良を加え、肝癌細胞株から分

離した癌幹細胞の長期培養を行った。肝癌細胞株 PLC/PRF/5, Hep3B, Li7 をセルソーターを用いて EpCAM 陽性細胞、陰性細胞に分離回収し、超低接着表面加工のディッシュに特殊培地を用いて培養し、EpCAM 陽性細胞群にスフェロイド状の細胞集塊形成を認めることを確認した (図 3)。

PLC/PRF/5 細胞の EpCAM 陽性細胞群のスフェロイド培養で得られた肝癌幹細胞の培養上清をナノ粒子アナライザーで解析し、直径  $94 \pm 21$  nm の微小顆粒の存在を確認した (図 4)。しかしながら、この方法では RNA を抽出して検討するのに必要な量のエキソソームを回収する十分な量の培養上清を得ることが出来なかった。

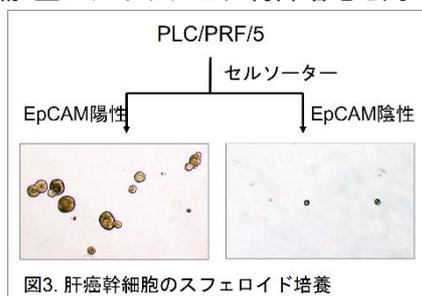


図3. 肝癌幹細胞のスフェロイド培養

(2) エキソソームの大量回収を目的に肝癌幹細胞の細胞集塊の大量培養の方法を検討した。セルソーターを用いずに特殊表面加工プレートに幹細胞用特殊培地を用いて肝癌細胞株 (PLC/PRF/5, HepG2, Hep 3 B) を 2 - 4 週間培養し、形成された細胞集塊を回収して新たなプレートに播種することを繰り返してスフェロイド状の細胞集塊数の増加を試みた。この方法で 10 cm の培養ディッシュ当たり  $1.5 - 2.3 \times 10^3$  個程度の細胞集塊が得られた。この培養上清よりエキソソームを回収して RNA を抽出した。エキソソーム中に比較的安定して存在する snoRNA U43, 18S ribosomal RNA を定量 PCR で検出するも、単層培養由来のエキソソーム中の発現量と比較して癌幹細胞由来のエキソソーム中のその発現量が極めて低く、抽出したエキソソームおよび RNA は収量あるいは品質において解析に十分ではなかった。複数の肝癌細胞で同様の結果であったため、幹細胞の培養方法の問題と推測された。

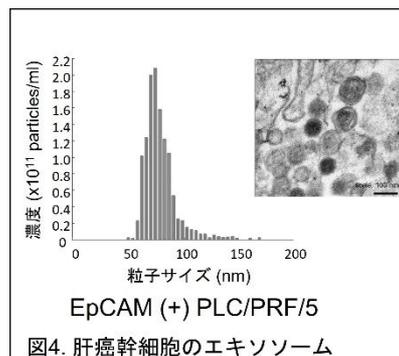


図4. 肝癌幹細胞のエキソソーム

(3) 低接着性の U 字型マイクロプレートを用いた肝癌幹細胞の培養とエキソソーム回収  
低接着性の U 字型 96 および 384 ウェルマイクロプレートに肝癌細胞 (HepG2, PLC/PRF/5) を特殊培地を用いて培養した。培養開始 3 - 7 日後から各ウェルに細胞集塊が出現し、一定のサイズで維持できる事が明らかとなった。大量培養を行い培養上清からエキソソームを回収して RNA を抽出したが、snoRNA U43, 18S ribosomal RNA の発現量は極めて低く、解析に十分なサンプルを取得するのは困難であった。

(4) 3 次元構造を有する低接着培養ディッシュを用いた肝癌幹細胞の培養とエキソソーム回収  
3 次元構造を有する低接着培養ディッシュを用いて肝癌細胞 (HepG2, PLC/PRF/5) を培養した。培養開始 3 - 4 日目からスフェロイド状の細胞集塊が形成され、10 cm の培養ディッシュ当たり約  $1.7 \times 10^4$  個程度の細胞集塊が得られ、4 週間まで問題なく生存状態を維持出来ることが明らかとなった。HepG2 で大量培養を行いこの培養上清からエキソソームを回収して抽出した RNA において、snoRNA U43, 18S ribosomal RNA は単層培養由来のエキソソームと比べてそれぞれ  $0.71 \pm 0.08$  倍、 $0.82 \pm 0.13$  倍の発現を示した。これらはエキソソームのドナー細胞 (スフェロイド) の発現と比べ、それぞれ  $0.0071$  倍、 $0.067$  倍だった。

3 次元構造を有する低接着培養ディッシュと幹細胞用培地を用いてヒト肝癌細胞株を培養することにより、肝癌幹細胞 (スフェロイド状の細胞集塊) を長期に維持して、分泌するエキソソームをおよび内包する RNA の解析が可能であることが明らかとなった。

#### < 引用文献 >

Kimura O, Takahashi T, Ishii N, Inoue Y, Ueno Y, Kogure T, Fukushima K, Shiina M, Yamagiwa Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Iwasaki T, Kawagishi N, Shimosegawa T, Sugamura K. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci*. 2010 Oct;101(10):2145-55. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01661.x.

Kimura O, Kondo Y, Kogure T, Kakazu E, Ninomiya M, Iwata T, Morosawa T, Shimosegawa T. Expression of EpCAM increases in the hepatitis B related and the treatment-resistant hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:172913. doi: 10.1155/2014/172913.

ErbB receptor tyrosine kinase/NF- B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 24;109(17):6584-9. doi: 10.1073/pnas.1113271109.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mari Satoh, Takayuki Kogure, Masanori Takahashi, Kouji Okada, Kennichi Satoh
2. 発表標題 MicroRNA-491-5p is involved in the resistance to lenvatinib induced under hypoxia in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 The Liver Meeting 2021 (Annual meeting of American Association for the Study of Liver Disease) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 賢治 (Kenji Takahashi) (00736332)	旭川医科大学・大学病院・助教  (10107)	
研究分担者	嘉数 英二 (Eiji Kakazu) (20509377)	東北大学・大学病院・助教  (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------