

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10601

研究課題名(和文) 血球細胞由来exosomeによる癌進展機序の解明と新たな診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of cancer progression by exosome derived from hematopoietic cells

研究代表者

市川 大輔 (ICHIKAWA, Daisuke)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：20347446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：血球細胞由来exosomeが胃癌細胞や中皮細胞に取り込まれることを確認した。赤血球由来のexosomeの添加によって、細胞増殖能に変化は認めなかったが、遊走能や中皮細胞との接着の亢進の可能性が示唆された。一方で血小板由来exosomeの添加では、細胞増殖能には明らかな変化は認めなかったが、遊走能が亢進する可能性が示唆された。また、これら血球由来exosomeの添加によって幾つかの細胞内分子発現の変化も確認された。一方で、血小板との共培養では、血小板が癌細胞を取り囲むように接着することが確認され、機能解析では、遊走・浸潤能の亢進に加えて細胞増殖能の亢進も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、無核である血球細胞に含まれる様々な遺伝情報が細胞外に分泌され、それらが受け側細胞に取り込まれることによって、様々な機能変化を来すことが判明した。実臨床では、担癌状態の末期には様々な血球の異常が認識されており、外科手術においては、術野への多量の血液が暴露することも周知の事実である。これら血球細胞の癌進展への関与についての更なる分子機序の解明によって、全く新たな治療法の開発が期待され、依然、治療成績が不良である高度進行癌患者に対して極めて大きな福音となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Uptake of red blood cell- (RBC) and platelet-derived exosomes into gastric cancer and mesothelial cell lines were confirmed. Increased migration ability was confirmed in cell lines with addition of the RBC-derived exosomes compared with control. Similarly, addition of platelet-derived exosomes resulted in increase of migration ability of gastric cancer cell lines. Further PCR-array based analysis demonstrated that addition of the platelet-derived exosomes generated alteration in some gene expressions in gastric cancer cell lines. On the other hand, co-culture of gastric cancer cell lines with platelet generated adherence of platelet to cancer cells, and the co-culture led increases of proliferation, migration and invasion ability of gastric cancer cell lines.

研究分野：消化器外科

キーワード：消化器癌 exosome

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外 microRNA が、DNA や蛋白等と共に exosome 等の microvesicles に封入され、細胞外でも極めて安定した状態で存在し、細胞間の情報メディエーターとして機能することが報告されており、癌の進展に深く関わる可能性が示唆されている。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、その診断的ならびに治療効果予測因子としての有用性を報告してきた。また、新たな胃癌における腹膜播種進展の機序として、これら microRNA や他の核酸等を含んだ癌細胞由来 exosome が、別の癌細胞に取り込まれることで浸潤能を亢進させる一方で、腹膜中皮細胞へも作用し、細胞表面上の接着因子の発現上昇を介して接着能も亢進させることを報告してきた。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繁に経験されるが、これら血球成分には極めて多量の microRNA が含有されることや、赤血球において exosome 等の microvesicles が能動的に分泌されること等も報告されている。担癌状態では、比較的早期の段階から骨髄中に遊離癌細胞が存在することも以前から知られている。

2. 研究の目的

消化器癌における血球成分を介した新たな癌進展機序の解明と、同知見を基にした新たな癌診断ならびに治療法の開発を目的として、血球成分由来の exosome (赤血球、血小板、白血球由来)の癌細胞や支持細胞への取り込みによる悪性度形質の変化ならびにその分子機序について検討する。また一方で、健常者と様々な病期の担癌患者における血球成分由来の exosome や血球中の核酸や蛋白を比較検討することで、癌病態に即した新たな癌診断法の開発ならびに治療法への応用の可能性も検討する。

3. 研究の方法

本研究は山梨大学医学部の倫理委員会の審査を受け、承認を得た後に行われた。

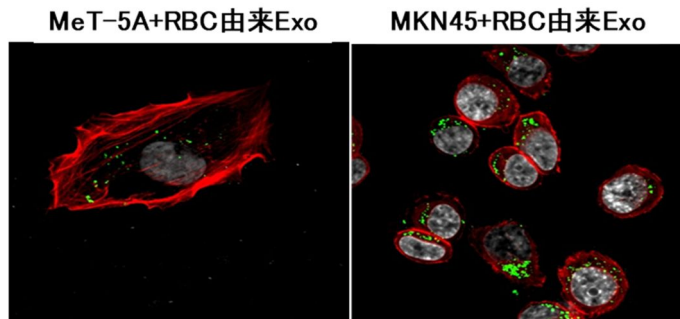
- (1) 胃癌患者ならびに健常対照者から説明同意のもと採血し、同血液から赤血球を遠心分離した。それらを短期培養した後、細胞培養液をフィルターに通して濾過した後、超遠心法により exosome の分離を行った。これらを PKH26 によるラベリングを行い、胃癌細胞株培養液中に添加し、その取り込みを観察した。
- (2) 続いて、これら赤血球細胞由来 exosome を胃癌細胞株ならびに中皮細胞株への添加した後、細胞増殖能や、遊走・浸潤能解析を行い、また同様に、中皮細胞株への exosome の添加の後、中皮細胞との接着能について解析した。これらの結果と exosome の非添加群との比較検討から、赤血球由来 exosome による癌進展の関与について検討した。
- (3) 赤血球と同様に、胃癌患者ならびに健常対照者から説明同意のもと末梢血液を採取し、低速の遠心分離による血漿成分の分離の後、ACD 溶液ならびに CFT 溶液による洗浄を行い、各々の血小板濃縮溶液を精製した。短期培養後に超遠心法による exosome の分離を行い、Nanosight による確認も行い、PKH によるラベリングによる胃癌細胞株への取り込みの確認も行った。
- (4) 上記 2) 同様に、血小板由来 exosome の添加による胃癌細胞株の機能解析を施行した。
- (5) 血小板について、共培養による変化についても観察することとし、上記 3) で収集した血小板溶液を胃癌細胞株へ添加した後、その接着状況について観察した。
- (6) また、共培養による形態変化の有無の観察、ならびに機能解析も行い、血小板の癌進

展における影響について検討した。

- (7) これら血球由来exosomeの添加の有無別の細胞内分子発現を検討するため、PCR arrayによる解析を施行した。

4. 研究成果

- (1) 赤血球の短期培養によって、赤血球由来exosomeが収集可能であり、胃癌細胞株(MKN45, MKN74)や中皮細胞株(MeT-5A)への添加で各々の細胞内へのexosome顆粒の取りこみが確認された(右図)。



- (2) 赤血球細胞由来exosomeの添加では、明らかな形態学的な変化は認めなかった。機能解析では、胃癌細胞への添加によって細胞増殖能やMatrigellに対する浸潤能では明らかな差を認めなかったが、創傷治癒アッセイによる細胞遊走能解析において、赤血球由来exosome添加による亢進が認められた。また、中皮細胞との接着も軽度上昇しており、接着能の亢進の可能性も示唆されたが、中皮細胞への赤血球由来exosomeの添加のみでは、癌細胞と中皮細胞との接着能に明らかな差を認めなかった。
- (3) 血小板由来exosomeについて、Nano sightによる解析でその存在と収集が確認でき、胃癌細胞株への取り込みも確認できた。一方、胃癌細胞株への添加によって、明らかな形態学的変化は認めなかった。
- (4) 機能解析では、血小板由来exosomeの添加によって、細胞増殖能には明らかな差を認めなかったが、胃癌細胞株(NUGC-3)を用いた解析では遊走能の亢進を認めた。また、この添加の有無による細胞内によって、幾つかの細胞内分子発現の変化が認められた。
- (5) 血小板との共培養では、胃癌細胞株(NUGC-3)培養液中への血小板溶液の添加によって、PBS洗浄では容易に剥がれない接着が確認された。一方、形態学的には明らかな変化は認めなかった。
- (6) 共培養による胃癌細胞株(NUGC-3)を用いた機能解析では、細胞増殖能の解析では、胃癌細胞株培養液中への血小板の添加によって、経時的な増殖能の有意な上昇を認め、遊走能・浸潤能解析でも血小板の添加による亢進を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maruyama S, Furuya S, Shiraishi K, Shimizu H, Saito R, Akaike H, Hosomura N, Kawaguchi Y, Amemiya H, Kawaida H, Sudo M, Inoue S, Kono H, Ichikawa D.	4. 巻 41
2. 論文標題 Inhibition of apoptosis by miR-122-5p in alphafetoprotein producing gastric cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2595,2600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2019.7023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山 傑, 齊藤 亮, 芦沢直樹, 中山裕子, 清水浩紀, 市川大輔
2. 発表標題 胃癌患者での血小板由来microparticleの検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019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