

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10969

研究課題名(和文)肉腫におけるエクソソームによる浸潤・転移機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of invasion and metastasis of human sarcomas via tumor-derived exosomes and its application to novel therapies.

研究代表者

森田 卓也(Morita, Takuya)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10743007

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)：肉腫における特異的な分泌型microRNA/exosomeを細胞株、臨床検体から候補を抽出し、さらにvalidation studyを行うことで各肉腫における特異性の高い遺伝子を特定することが可能であった。次に、それら遺伝子の作用機序を確認するためin vivoでも実験を行い肉腫に特徴的な転移もしくは浸潤に関与しているかを検証したところ、この特異的な遺伝子は転移や浸潤を促進する作用をもっていることを確認した。臨床検体との相互性も確認できたため、特異的なバイオマーカー、また治療薬のない肉腫において、今後の検査や治療に繋がる研究であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肉腫には明らかな特異的なバイオマーカーもなく、化学療法などでの根治を期待できる治療薬は無い。本研究では、臨床において肉腫のバイオマーカーの発見ができることにより早期発見、早期治療に繋げることが可能となる。さらには、根本的な治療薬とまではいかないにしても、術前or術後の治療薬として浸潤や転移を抑制することで根治できる可能性が高くなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Infiltrative tumor growth into adjacent soft tissues is a major cause of the frequent recurrence of sarcoma, and no useful biomarkers are available for tumor monitoring. The aim of the present study was to identify fibroblasts.

Serum miRNA expression may represent a novel diagnostic target for monitoring of highly aggressive sarcoma. Furthermore, exosomal miRNA could act as a transfer messenger to adjacent cells and mediate the infiltrative nature of sarcoma, revealing a crosstalk between tumor cells and normal cells in the tumor microenvironment.

研究分野：腫瘍

キーワード：肉腫 microRNA exosome 転移 浸潤 バイオマーカー 治療

## 1. 研究開始当初の背景

### 【研究背景、準備状況、研究の新規性・独自性】

肺癌、胃癌、大腸癌、前立腺癌といった上皮系腫瘍には有用な腫瘍マーカーが存在し、診断や病勢の評価に重要な役割を果たしている。一方で肉腫に関しては標準的に用いられている腫瘍マーカーに乏しく、診断や病勢の評価が容易ではない。特に肉腫の生存率は再発や肺などへの転移に大きく左右されるため、体液を用いて迅速に臨床状態の評価が可能となる腫瘍マーカーの開発は肉腫診療におけるブレイクスルーとなり、患者の生命予後改善に大きく役に立つものになる。

分泌型 microRNA (miRNA) は疾患特異性を有し、体液中で exosome といった細胞外小胞体等に内包され RNase からの分解を逃れていることが明らかにされている。がん新規バイオマーカーとしての意義が高いのみならず、近年では腫瘍周囲微小環境に作用し浸潤・転移にも関与することが分かってきた。

肉腫にはバイオマーカーが無く、手術以外の有効な治療法が少ないという現状で、この分泌型 miRNA や exosome は肉腫診療において診断、新規治療の面で画期的な躍進をもたらす可能性がある。

準備状況としては、患者検体及び miRNA、exosome 抽出技術開発ともに良好な環境が整っている。患者検体は本邦のサルコーマセンターを中心とする多施設より豊富な数を収集可能である。西日本初のサルコーマセンターである当岡山大学整形外科には骨軟部腫瘍患者の受診が集中している。また、本邦で最も患者数の多い国立がんセンターや、四国地方の肉腫診療の拠点施設である四国がんセンター、高知医療センターなどの多施設と連携しており、本研究グループは日本有数の患者検体を使用可能である。また、当科では血液検体を用いた研究を既に行っており、現在も各肉腫組織型における検体のストックは増加している。さらに、国立がんセンター、がん研究会ゲノムセンターといった microRNA や exosome を用いたバイオマーカー研究の最先端をいく施設と共同研究を開始しており、新規バイオマーカーを開発するための環境は極めて良好である。

一方で、分泌型 miRNA/exosome 研究の問題としては血清などの体液や細胞培養液からの抽出と解析方法の煩雑さが議論されている。これらに関して、我々の共同研究施設であるがん研究所および国立がんセンターでは、exosome の簡便かつ純度の高い精製方法や、さらには exosome の抽出なしに数 ul の体液サンプルでサンプル中の exosome を評価可能とする技術が開発されてきており、この技術を応用することで肉腫患者の血清を用いて抽出した exosome を解析し、得られた候補 exosome タンパク質をバイオマーカーとして、最終的には exosome の抽出をせずに少量の患者血清から検出することを目指している。この exosome 解析からバイオマーカーへの応用を行う一連の系は、非常に独創性の高い方法で、最終的には exosome の抽出をせずにごく少量の血清サンプルで検出を行うという非常に画期的な手法となる可能性を秘めている。また現在の所、肉腫のバイオマーカーとして exosome を用いる報告はされていない。将来的な展望として、肉腫の転移や治療抵抗性のメカニズムの解明や、腫瘍由来 exosome を阻害することによる新規治療にも繋がる可能性も期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、肉腫(悪性骨軟部腫瘍)患者の血清などの体液における分泌型 miRNA/exosome の発現・特異性を検証し、これまででない、肉腫の診断および臨床状態の把握を可能とする新規バイオマーカーを開発すること、また miRNA/exosome と肉腫における浸潤・転移機序の関連性を明確にし、関連遺伝子の検索、またそれらを阻害することによる新規治療薬の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

- ✓ 転位肉腫患者血清および高転移肉腫細胞株培養上清から転移に関与するエクソソーム miRNA/タンパクの網羅的解析。浸潤型肉腫も同様に解析。
- ✓ 転移・浸潤型肉腫臨床検体を生着させたマウスモデルを用い、超高転移・高浸潤型細胞株の樹立。
- ✓ *In vitro* における高転移・高浸潤肉腫細胞エクソソームの解析。
- ✓ *In vivo* における高転移・高浸潤肉腫細胞エクソソームの解析。
- ✓ *In vitro* における浸潤能と転移能の評価 (invasion assay, migration assay など)。
- ✓ 浸潤・転移における分泌型 miRNA / エクソソームの標的遺伝子/タンパクの解析。
- ✓ 特異的 miRNA/エクソソーム抑制による治療法の検討

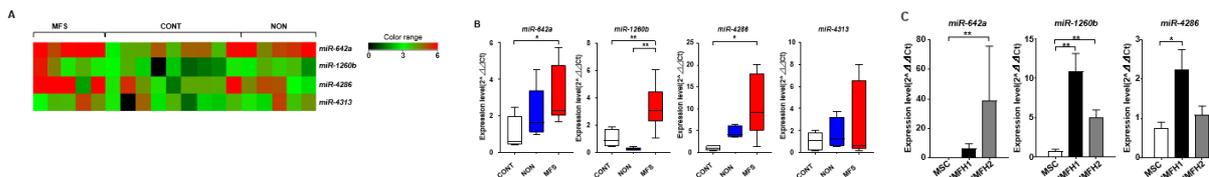
#### 4. 研究成果

粘液線維肉腫(Myxofibrosarcoma;MFS)は高齢者の肉腫で最も多いものの一つであり、診断は画像と生検によるもので行うが、かなり浸潤性が高いため診断時には広範囲に腫瘍が広がっている場合が少ない。特にMRI画像でTail-Like patternと称される所見は筋肉や皮下に腫瘍が浸潤しているもので、悪性度が高く治療に難渋する。治療は広範切除術を行うのみで有効な抗がん剤などは現段階では無く、手術で摘出したにも関わらず高率に再発する(22-79%)ことが報告されている。本研究によりMFSの有用な診断かつ病勢把握のためのバイオマーカーを探求し、さらには浸潤のメカニズムを解明することができたので報告する。

##### ）MFSに特異的な分泌型miR-1260bの同定

患者血清、細胞培養株上清、対照として良性腫瘍患者血清、健康人血清を用いてMicroarrayを行い網羅的解析を行った。(図A)

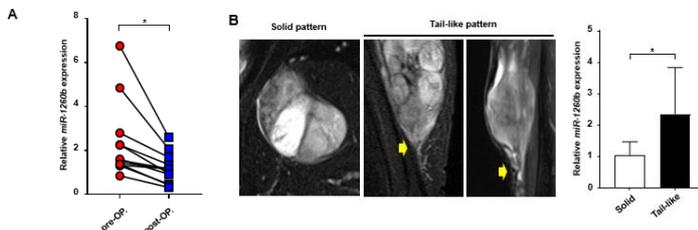
これにより抽出された4候補を患者血清、また細胞株培養上清のRNA抽出を行いRT-PCR施行し、MFS患者血清にmiR-1260bが特異的に高発現していることが示された。(図B,C)



##### ）臨床におけるMFS患者とmiR-1260bの相関性の確認

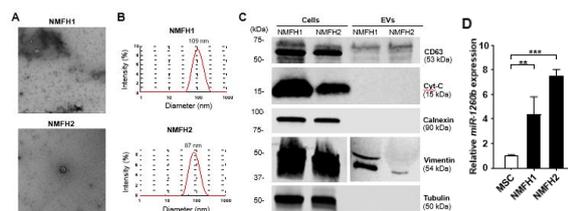
術前・術後にpair血清をRT-PCRにより確認したところ術後で有意にmiR-1260bの発現が低下していた。(図A)

さらにMFS患者におけるMRI画像所見でTail-like patternとsolid patternの患者血清を比較したところTail-like pattern患者血清においてmiR-1260bは有意に高発現であることが示された。(図B)



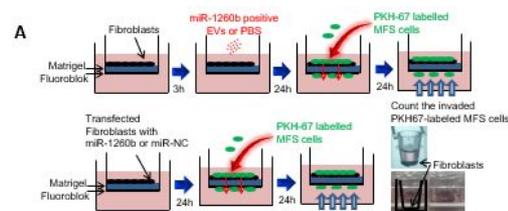
##### ）エクソソームの抽出、エクソソーム内のmiR-1260bの確認

培養上清株から超遠心法、EV-second法により抽出したエクソソームを確認し(図A-C)、内包されるmicroRNAを確認したところ、MFS由来エクソソームにはmiR-1260bが高発現していることが示された。(図D)

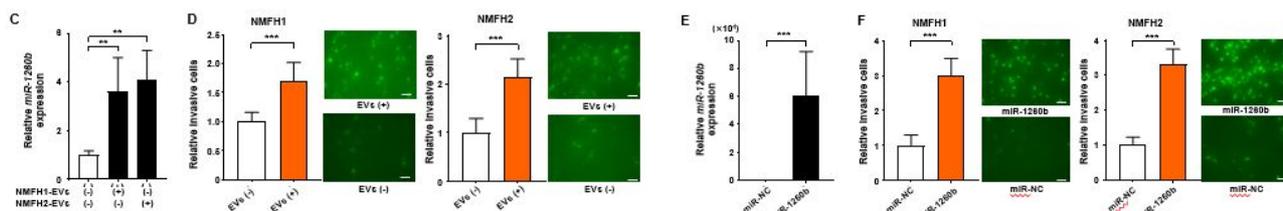


##### ）Functional assayによる浸潤機序の解明

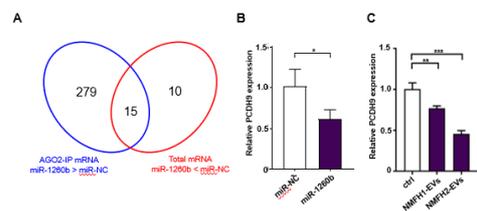
エクソソームに内包され運搬されるmicroRNAは腫瘍周囲の微小環境に変化をもたらす、腫瘍の転移や浸潤を引き起こしていることは報告されている。MFS細胞と線維芽細胞を用い、腫瘍周囲環境を作成しinvasion assayを行った。(図A)



線維芽細胞にMFS由来エクソソームを投与することにより線維芽細胞を浸潤する腫瘍細胞が増加した。(図C,D) さらに直接線維芽細胞にmiR-1260bを投与(transfection)することにより腫瘍細胞の浸潤が有意に増加した。(図E,F) しかし直接腫瘍細胞にエクソソームやmiR-1260bを投与しても腫瘍細胞の浸潤は増加しなかった。つまり、MFS由来のエクソソーム/miR-1260bは腫瘍周囲の微小環境を変化させ浸潤能を増加させていることが示された。

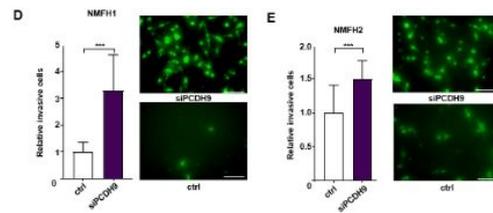


) miR-1260b は線維芽細胞の PCDH9 を target として作用し腫瘍浸潤能を増強させる  
 この分泌型 miR-1260b の target 遺伝子を確認するため protein assay、RT-PCR を施行し、この特異的 miRNA により線維芽細胞で発現が低下する接着因子が PCDH9 であることを同定した。(図 A-C)



さらに線維芽細胞の PCDH9 を抑制することにより、腫瘍の浸潤が増強することが示された。(図 D,E)

MFS 腫瘍から分泌される miR-1260b やそれを内包するエクソソームにより腫瘍周囲正常細胞の接着因子である PCDH9 が阻害され、腫瘍の浸潤が進行していることが判明し、これら miR-1260b を阻害することにより腫瘍の浸潤は抑制される、つまりは今後治療薬としての作用が十分期待できる結果となった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森田 卓也
2. 発表標題 粘液線維肉腫における分泌型microRNA-1260bは腫瘍周囲微小環境に作用し浸潤を促進する
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田 卓也
2. 発表標題 Characterization of microRNA profiling in the serum of myxofibrosarcoma patients
3. 学会等名 第50回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森田 卓也
2. 発表標題 Circulating microRNA-1260b as novel biomarkers for Myxofibrosarcoma promote invasion to modulate
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田 卓也
2. 発表標題 粘液線維肉腫における分泌型microRNAは腫瘍の浸潤性と関連しているか
3. 学会等名 第32回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2017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	魚谷 弘二 (Uotani Koji) (30708087)	独立行政法人国立病院機構四国がんセンター(臨床研究センター)・その他部局等・レジデント  (86301)	
研究分担者	尾崎 敏文 (Ozaki Toshifumi) (40294459)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  (15301)	
研究分担者	國定 俊之 (Kunisada Toshiyuki) (80346428)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授  (15301)	
研究分担者	藤原 智洋 (Fujiwara Tomohiro) (80639211)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  (15301)	