

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02882

研究課題名（和文）腹水中exosomeをターゲットとした新たな治療法の開発

研究課題名（英文）A Novel Therapy for gastrointestinal cancer targeting exosome in malignant ascites

研究代表者

大辻 英吾 (Otsuji, Eigo)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20244600

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌由来exosomeの阻害による細胞間情報伝達阻害に引き起こされる癌細胞の悪性形質変化の解析検討を行ない、腹水中のexosomeを物理的に除去する抗癌効果について検討した。超遠心法を用いて胃癌細胞が分泌するexosomeを物理的に除去すると胃癌細胞の増殖能、遊走能が低下し、腹膜中皮細胞への胃癌細胞の接着能も低下した。腹膜中皮細胞の分泌するexosomeの物理的除去では同様の現象は認めなかった。胃癌細胞株を用いてBALB/cヌードマウスに腹膜播種モデルを作成し、exosomeを含む培地と物理的に除去した培地を腹腔内投与したところ、腹膜播種個数と腫瘍容積に差を認め、exosome除去効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌の進展における癌細胞と周囲組織との相互情報伝達の重要性が数多く報告されており、遺伝情報が細胞間を超えて伝達される可能性が示唆されている。exosomeそのものを阻害することによる抗腫瘍効果について検討した報告は現在乏しく、本研究は新たな挑戦的研究であった。物理的に除去をするだけで抗腫瘍効果が得られたことは驚くべき結果であり、消化管閉塞や難治性腹水など、著しい苦痛を伴うだけでなく現在なお治療困難で予後不良である消化器癌の腹膜播種に対する全く新しい治療戦略となる可能性を有し、これまで難治であった腹膜播種患者に対して極めて大きな福音となると考え得る。

研究成果の概要（英文）：We analyzed and examined the malignant phenotypic changes of cancer cells caused by inhibition of cell-cell communication due to inhibition of cancer-derived exosomes, and examined the anticancer effect of removing exosomes in ascites. Physical removal of exosomes secreted by gastric cancer cells by ultracentrifugation reduced the ability of gastric cancer cells to proliferate and migrate, and also reduced the ability of gastric cancer cells to adhere to peritoneal cells. No similar phenomenon was observed with the removal of exosomes secreted by peritoneal mesothelial cells. A peritoneal dissemination model was created in BALB/c nude mice using a gastric cancer cell line, and a medium without exosome reduced the tumor volume and number when compared with medium with tumor exosome.

研究分野：消化器外科

キーワード：exosome 消化器癌 腹膜播種 難治性腹水

## 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、細胞崩壊のみならず能動的分泌によって体液中に放出され、exosome 等への封入や蛋白分子との結合体形成によって、極めて安定した状態で存在することが証明された(Valadi H et al. Nature Cell Biol:2007, Mitchell PS et al. Proc Natl Acad Sci USA:2008)。これら exosome には microRNA のみならず mRNA、DNA 等の核酸や様々な蛋白、脂質なども封入されており、細胞外に能動的に分泌されるとされている。一方で、exosome のような細胞外小胞体が、他のサイトカイン同様、細胞間の情報交換のメディエーターとして機能していることが証明されつつあり、癌の進展における新たな機序として一躍注目を浴びている(Valadi H et al. Nature Cell Biol:2007, Kosaka N et al. Front Genet:2013)。これまで我々は、exosome に封入された microRNA を含む血漿中 RNA に注目し、消化器癌のバイオマーカーとしての可能性や、化学療法感受性ならびに治療効果判定への臨床応用について研究・報告を行ってきた(Arita T et al. Anticancer Res:2013, Hirajima S et al. Br J Cancer:2013, Kawaguchi T et al. Br J Cancer:2013, Komatsu S et al. Anticancer Res:2013, etc.)。また、細胞から放出された exosome の機能的役割にも着目し、癌細胞株ならびに臨床検体を用いた検討で、癌細胞由来 exosome が周囲の癌細胞や腹膜中皮細胞等に取り込まれ、recipient cell の形質を変化させることで、癌転移に有利な転移環境の構築を行う可能性を報告した(Arita T et al. Oncotarget:2016)。

一方で古くは 1989 年より、血液透析による抗腫瘍効果を謳った論文が発表されており(Lentz M. Journal of biological response modifiers:1989)、炎症性サイトカイン等癌に有利に作用する化学物質や蛋白質の除去による効果と考えられてきた。また近年では血液中の exosome を含む 200nm 以下の小胞体(microvesicles)を hemopurifier と呼ばれるカートリッジによる除去を可能とした論文も報告されている(Marleau AM et al. J Transl Med:2012)。

以上よりこれまでの研究成果や他報告から、癌細胞由来 exosome 阻害による癌進展抑制効果を検討することとした。

### 2. 研究の目的

我々は胃癌の腹膜播種転移に現時点で効果的な治療法が確立されていないことなどから、胃癌細胞由来 exosome に着目し「腹水中 exosome を介した情報伝達を遮断することにより腹膜播種の進展を抑制する」との仮説を立て、分泌抑制、物理的除去、取り込み阻害の機序で、それぞれの癌進展抑制効果を観察し、臨床応用への可能性について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

以下の細胞株を用いた検討では、ウシ由来の exosome の影響を無くすため、exosome-depleted FBS を用いる。

Exosome の分泌抑制剤は nSMase2 を使用する。物理的阻害に関しては、超遠心プロトコール(100,000g, 70 分間)により胃癌細胞株(MKN7, MKN45, MKN74, NUGC4, HGC27)培養液中の exosome を除去した培地と再攪拌し exosome を含む培地を使用する。Exosome の取り込み阻害に関しては、サイトカラシン D を使用する。それぞれの阻害効果を Nano Tracking Analysis と CD9、TSG101 を用いた Western blotting assay によって分泌抑制効果の確認を行う。

胃癌細胞由来 exosome 除去効果を各種機能解析で確認する。具体的には、MTT アッセイと細胞周期アッセイによる細胞増殖能、cell culture insert を使用した創傷治癒アッセイによる遊走能、腹膜中皮細胞を用いた接着アッセイによる腹膜中皮細胞への癌細胞の接着能に対する同 exosome 除去効果を検討する。これらの機能解析ではコントロールとして腹膜中皮細胞由来 exosome 除去効果も同方法で確認する。BALB/c ノードマウスを使用した動物実験でも胃癌細胞由来 exosome 除去効果を検証する。

上記で何らかの形質の変化を認めた細胞については、exosome 除去における細胞内分子の変化について microarray 解析を行い、生じた現象に關与する pathway 解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞株の選定

Nano Tracking Analysis により胃癌細胞株(MKN7, MKN45, MKN74, NUGC4, HGC27)と腹膜中皮細胞培養中の exosome 粒子(<200nm)数を測定し培養細胞数で normalize したところ、MKN7 と MKN74 の相対的 exosome 粒子数が多かったため、実験に使用することとした。

#### (2) exosome 分泌抑制剤および取り込み阻害剤の使用

胃癌細胞株(MKN7、MKN74)に nSMase2 を使用し Nano Tracking Analysis で分泌抑制効果を

確認したところ、nSmase2 濃度と培養液中の exosome 粒子数に正の相関は認めず、同一濃度による再現性も認められなかったため、培養条件や nSmase2 投与方法などを再検討中である。取り込み阻害剤であるサイトカラシン D に関しては、溶解液であるジクロロメタンの細胞毒性やアクチン重合阻害剤であることなどから使用を中止し、exosome 取り込み阻害剤の再選定中である。

( 3 ) exosome 物理的除去の確認

胃癌細胞株(MKN7、MKN74)及び正常中皮細胞(MeT-5A)を ExoFBS(exosome-free FBS)にて培養し、培養上清に各細胞株より分泌された exosome を 0.22 $\mu$ m フィルターに通したのちに超遠心法(100,000g、70 分)で exosome を除去した培地と再攪拌した培地を用いて各種解析を行った。Nano Tracking Analysis と exosome マーカーである CD9、TSG101 を用いて western blotting 法を行い、exosome 除去効果を確認した。

( 4 ) 胃癌細胞、腹膜中皮細胞に対する胃癌細胞由来 exosome 除去による癌悪性度への影響の検討

胃癌細胞由来 exosome の物理的除去によって、MTT アッセイで胃癌細胞の増殖能の低下を認め、細胞周期アッセイで細胞周期の変化を認めた。また、cell culture insert を使用した創傷治癒アッセイでは遊走能低下、腹膜中皮細胞を用いた接着アッセイによる腹膜中皮細胞への癌細胞の接着能の低下を胃癌細胞由来 exosome 物理的除去によって確認した。同様の実験を腹膜中皮細胞由来 exosome の物理的除去によって確認したが、癌悪性度に影響は与えなかった。

( 5 ) BALB/c ヌードマウスを用いた exosome 除去による癌悪性度への影響の検討

胃癌細胞株を用いて BALB/c ヌードマウスに腹膜播種モデルを作成し、胃癌細胞由来 exosome を含む培地と除去した培地を腹腔内投与したところ、除去した培地を投与した群で腹膜播種結節の個数と容積の減少を認めた。同様の腹膜播種モデルを用いて、腹腔内洗浄による exosome 除去効果に関して IVIS を用いて検討したところ、腹腔内洗浄群で蛍光強度の低下を認めた。

( 6 ) Exosome 除去による癌細胞形質の変化

現在、microarray 解析中である。

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 0件）

1. 発表者名 有田智洋
2. 発表標題 血液成分由来exosomeの癌形質への影響について
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018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	小西 博貴 (Konishi Hirotaka) (00448739)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  (24303)	
研究分担者	有田 智洋 (Arita Tomohiro) (00756794)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  (24303)	
研究分担者	小松 周平 (Komatsu Shuhei) (40578978)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師  (24303)	

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
---------	---------