

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08606

研究課題名(和文) エクソソーム分泌阻害と抗脈管新生に関わる遺伝子との複合治療による乳癌転移阻止

研究課題名(英文) Combination therapy with inhibition of exosome production and anti-vasculogenesis for suppression of mammary cancer metastasis

研究代表者

柴田 雅朗 (Shibata, Masa-Aki)

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：10319543

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)：癌細胞の分泌するエクソソームには、転移促進、免疫抑制、薬剤耐性をもたらすといった作用が報告されている。そこで、エクソソーム分泌に関わる遺伝子のNeutral sphingomyelinase 2 (nSM2, Smpd3)をsiRNA発現ベクターでノックダウンする遺伝子治療を転移性のマウス乳癌モデルに対して行い、動物個体において、nSM2-siRNAによるエクソソーム分泌阻害が転移抑制をもたらすか否かを解析した。その結果、有意な転移抑制作用がもたらされ、エクソソームを標的とした治療への可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までのところ、化学療法で用いられている一般的な抗癌剤や新世代の分子標的治療薬において、転移を阻止することは極めて困難である。転移は癌による死因の殆どを占め、転移を克服することは癌治療の最大の課題である。癌細胞が転移する以前に、原発腫瘍はエクソソームを分泌し、転移予定先臓器で転移に適した土壌を形成している。従って、転移前に原発巣では転移のステップは既に始まっていると考えられる。今回の研究では転移前の段階でエクソソーム分泌阻害を行い、実験的に転移抑制を示せたことは学術的にも社会的にも極めて意義のあることと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tumor-derived exosomes have been shown to be involved metastatic enhancement, immune suppression and drug resistance. Since nSM2 plays exosome generation, gene therapy using nSM2-siRNA expression vector was conducted on a mouse model of metastatic mammary cancer. The therapeutic approach demonstrated a significant reduction in number of metastasis. The anti-metastatic effects by nSM2-siRNA may be of high clinical significance in mammary cancer.

研究分野：乳癌転移抑制

キーワード：転移抑制 エクソソーム 乳癌 siRNA Smpd3 nSM2 遺伝子治療 マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

化学療法で用いられている一般的な抗癌剤や新世代の分子標的治療薬において、原発腫瘍を完全に制御することは難しく、転移を阻止することは極めて困難である。転移は癌による死因の殆どを占め、転移を克服することは癌治療の最大の課題である。

2. 研究の目的

転移が成立するためには将来転移臓器での微小環境が重要である。癌細胞が転移する以前に、将来転移臓器では血管新生、リンパ管新生、間質の変化、免疫担当細胞の集簇が起き、癌細胞が生着しやすい微小環境、すなわち“前転移ニッチ”が形成される¹⁾。癌細胞が分泌するエクソソームには様々な機能性タンパク質、mRNA や miRNA が包含されており、エクソソームは将来転移臓器で前転移ニッチの形成に関わる²⁾。本研究の当初の目的は、癌細胞が分泌するエクソソームと脈管新生を標的とした複合遺伝子治療を目的としていたが、それぞれの単独治療が難航し、また思うような結果が得られず、最終的には、エクソソーム分泌に関わる遺伝子の *Neutral sphingomyelinase 2* (nSM2) を標的とした遺伝子治療に焦点を絞り、転移性のマウス乳癌モデルを用いて、動物個体での転移抑制効果の有無を解析した。

3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞株

マウス乳癌細胞株 BJMC3879Luc2 (ルシフェラーゼ遺伝子を安定的に組み込んだもの) を用いた。本細胞株を同系マウスに移植するとリンパ節や肺に高率に転移を示し³⁾、ヒト乳癌と極めて類似した転移スペクトラムを示すモデルである。

(2) 有効な siRNA 配列の決定

マウス nSM2 に対するそれぞれ 4 種類の siRNA 配列を Qiagen 社の有するアルゴリズムを用いてデザインした。次いで、BJMC3879Luc2 乳癌細胞にカチオン性脂質の遺伝子導入試薬 (HiPerFect、Qiagen 社) を用いて、遺伝子導入した。対照としては、ヒトにもマウスにも相補性を示さないスクランブル siRNA 配列を用いた。遺伝子導入の 18 時間後にリアルタイム RT-PCR を用いて (Takara Bio 社)、nSM2 の発現レベルを解析した ($\Delta\Delta CT$ 法)。その結果、約 50% 近いノックダウン効率を示した塩基配列を選択し、siRNA の発現ベクター (Takara Bio 社) に組み込んだ。また、対照群としてスクランブル siRNA 配列を有するベクターも作製した。これらの発現ベクターの機能性を確かめるために、siRNA ベクターを BJMC3879Luc2 乳癌細胞にエレクトロポレーションにより遺伝子導入し (amasa 社)、遺伝子導入の 48 時間後にその発現をリアルタイム RT-PCR にて解析した。その結果、対照群と比較して、70% 以上のノックダウン効率を示し (図 1 A)、免疫蛍光染色でもその発現低下を確認した (図 1 B)。

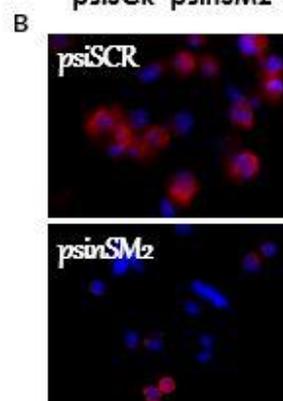
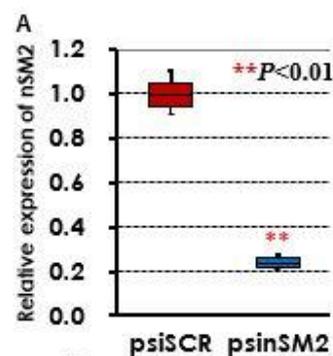


図 1 nSM2-siRNA 発現ベクターによる nSM2 ノックダウン

(3) In vivo siRNA 遺伝子治療実験

6 週齢の BALB/c 系雌マウス (日本 S L C) の鼠径乳腺部皮下に BJMC3879Luc2 細胞を移植し、腫

瘍径が約 0.3~0.5cm になった時点で、nSM2 siRNA 発現ベクター (psinSM2) あるいは対照としてスクランブル配列を有したベクター (psiSCR) を週 1 回の割合で 6 週間、腫瘍内に注射し (腫瘍の大きさに応じて 50~75 μ g)、遺伝子導入した (CUY650-10、ネッパジーン社)。遺伝子導入は 100V、20msec/1 パルス、8 パルス反復の条件で行った⁴⁾。毎週、体重と乳腺腫瘍のサイズを個別別に測定した。乳腺腫瘍はデジタル式キャリパスで短径と長径を計測し、その体積を長径 \times (短径)² \times 0.4 の算出式で求めた⁵⁾。実験開始の 6 週経過中には、マウス 1 匹当たり 3mg の D-ルシフェリン (和光純薬工業) を腹腔内投与し、イソフルレン吸入麻酔下にて、IVIS Imaging system (Xenogen 社) を用いて、生体発光イメージングを行い、得られた発光シグナルからフォトン値を求めた。実験開始の 6 週経過後には、全生存動物を屠殺剖検し、乳腺腫瘍を摘出し、10%緩衝ホルマリン溶液にて固定した。肺およびリンパ節 (腋窩部、大腿部) を採取し、更に肉眼病変部と異常の見られたリンパ節についても採取し、病理組織学的に検索した。また、実験開始の 2 週経過後には中間屠殺を行い、腫瘍組織における nSM2 の発現をリアルタイム RT-PCR 並びに免疫組織学的に解析した。

(4) 統計学的解析

定量的データにおける 2 群間の平均値の差の解析には Mann-Whitney U-test を行った。発生頻度の解析には Fisher の正確確率検定を用いた。

4. 研究成果

(1) 体重推移

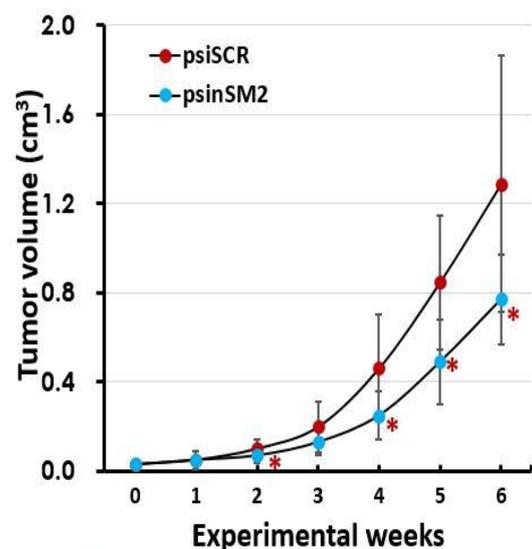
体重は対照群と psinSM2 群との間に有意な差異は認められなかった。

(2) 腫瘍サイズ

腫瘍体積では psinSM2 群において、2 週より有意な増加抑制ないしはその傾向が実験終了まで観察された (図 2)。

(3) 生体発光イメージング

psinSM2 群では、対照群と比較して、移植した乳癌の大きさは小さい傾向にあり、また、転移の拡がりもこの両者の治療群で明らかに抑制傾向にあり (図 3A)、フォトン値で見ると有意な抑制がしめされた (図 3B)。



* $P < 0.05$ as compared with the psiSCR group.

図 2 体重推移と腫瘍体積の経時的変化

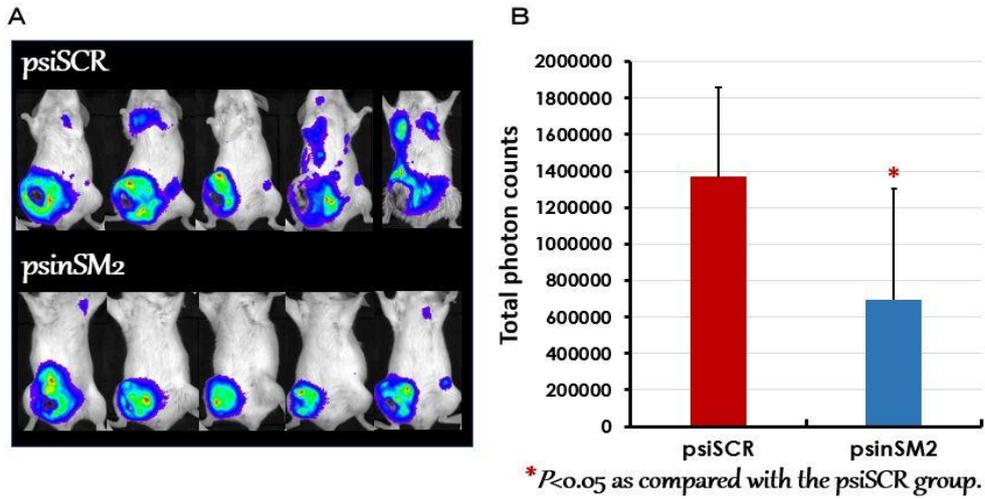


図3 生体発光イメージングとフォトン値

(4) 病理組織学的検索

リンパ節転移は、対照群では全例に転移を観察したが（図 4A）、psinSM2 群（図 4B）では 75% に認められ（図 5A）、マウス 1 匹当たりのリンパ節転移個数で見ると、有意な抑制が示された（図 5B）。転移はリンパ節以外にも、肺、腎臓、副腎、卵巣にも転移が観察され、マウス 1 匹当たりの転移総数でも、psinSM2 群で有意な抑制が観察された（図 5C）。

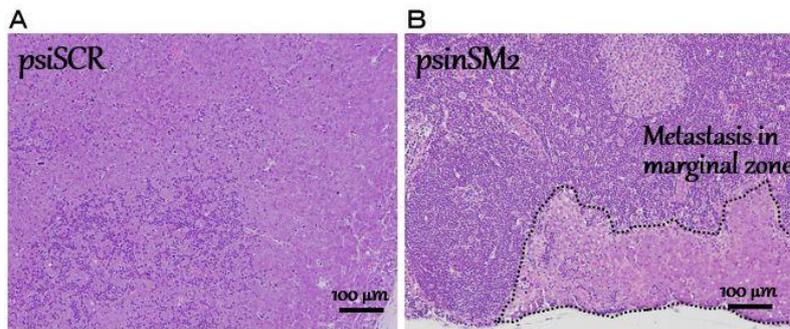


図4 腋窩リンパ節転移の病理組織像

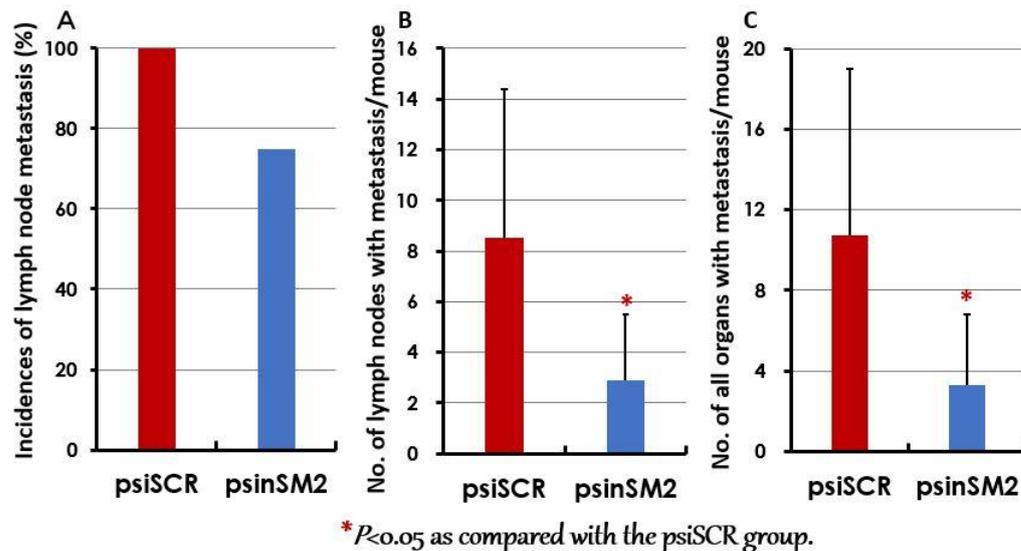


図5 リンパ節転移の発生頻度とマウス1匹当たりの発生個数およびマウス1匹当たりの転移総数

(5) 腫瘍中の nSM2 発現

real-time RT-PCR による腫瘍組織中の nSM2 の発現解析では、psiSCR 群に比較して、psinSM2 群で有意な低下が示された (図 6A)。また、免疫組織染色においても psinSM2 を遺伝子導入した腫瘍組織では、nSM2 の発現が著しく低下している領域が観察された (図 6B)。

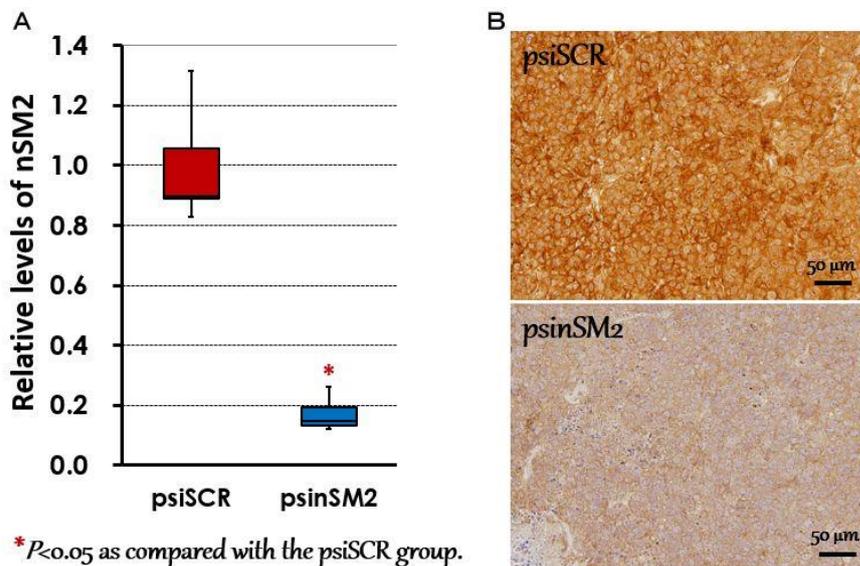


図6 腫瘍組織におけるnSM2-siRNA発現ベクターによるnSM2ノックダウン

<引用文献>

- 1) Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015; 527:329-335.
- 2) Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ. Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; 15:617-638.
- 3) Shibata MA, Shibata E, Morimoto J, Eid NAS, Tanaka Y, Watanabe M, Otsuki Y. An immunocompetent murine model of metastatic mammary cancer accessible to bioluminescence imaging. *Anticancer Res*. 2009; 29:4389-4396.
- 4) Shibata MA, Ambati J, Shibata E, Albuquerque RJ, Morimoto J, Ito Y, Otsuki Y. The endogenous soluble VEGF receptor-2 isoform suppresses lymph node metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. *BMC Med*. 2010; 8:69.
- 5) Shibata MA, Liu M-L, Knudson MC, Shibata E, Yoshidome K, Bandy T, Korsmeyer SJ, Green JE. Haploid loss of bax leads to accelerated mammary tumor development in C3(1)/SV40-TAg transgenic mice: reduction in protective apoptotic response at the preneoplastic stage. *EMBO J*. 1999; 18:2692-2701.

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 柴田雅朗、伊藤裕子、濱岡仁美、谷口高平、二木杉子、近藤洋一	4. 巻 27
2. 論文標題 マウス乳癌転移モデルにおけるリンパ節の転移前ニッチの形成	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 乳癌基礎研究	6. 最初と最後の頁 19-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田雅朗、伊藤裕子、田中義久、濱岡仁美、近藤洋一
2. 発表標題 マウス乳癌転移モデルにおけるリンパ節の転移前ニッチの形成
3. 学会等名 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田雅朗、谷口高平、奥崎大介、伊藤裕子、白岡千夏、生出林太郎、近藤洋一、
2. 発表標題 マウス乳癌転移モデルにおけるリンパ節での転移前および転移後ニッチのVegfsを標的とするmicroRNA網羅的解析
3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田雅朗、谷口高平、奥崎大介、伊藤裕子、白岡千夏、生出林太郎、近藤洋一
2. 発表標題 乳癌転移モデルにおけるリンパ節転移前および転移後微小環境のマイクロRNA発現プロファイル
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田雅朗、伊藤裕子、濱岡仁美、谷口高平
2. 発表標題 Premetastatic niche formation of the lymph nodes in a mouse model of mammary cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
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
研究分担者	伊藤 裕子 (Ito Yuko) (40148432)	大阪医科薬科大学・その他部局等・功労教授 (34401)	
研究分担者	谷口 高平 (Taniguchi Kohei) (70779686)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

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